



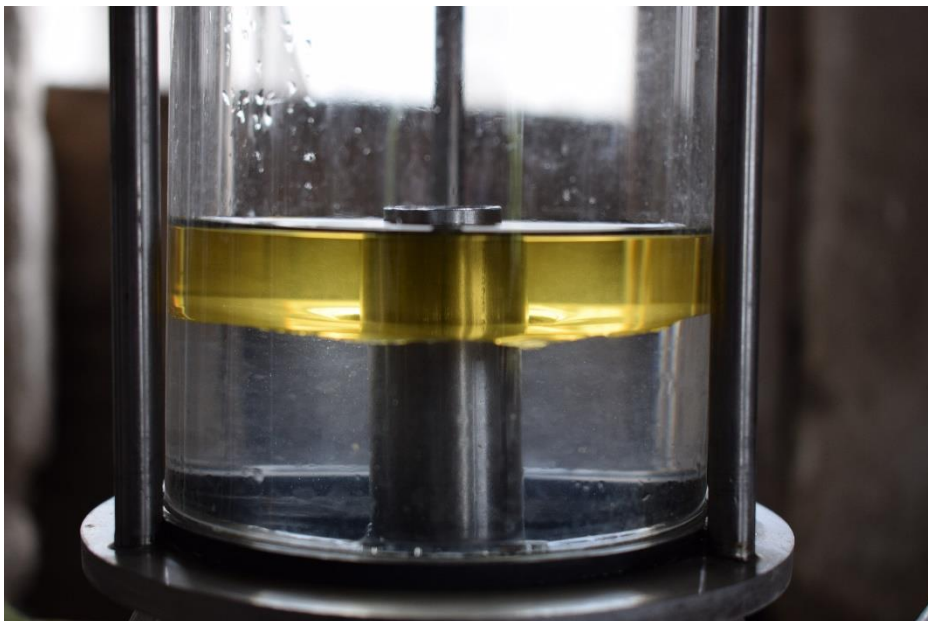
ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αντιμικροβιακή δράση αιθέριων ελαίων αρωματικών  
φαρμακευτικών φυτών.

Αλέξανδρος Μπαϊράμης του Ηλία



Λάρισα 2023

Αντιμικροβιακή δράση αιθέριων ελαίων αρωματικών  
φαρμακευτικών φυτών.

Antimicrobial activity of essential oils derived from  
aromatic pharmaceutical plants.

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή.**

**Μόσιαλος Δημήτριος (επιβλέπων):** Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Αμούτζιας Γρηγόρης:** Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορική με έμφαση στην Μικροβιολογία του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Στάγκος Δημήτριος:** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## Ευχαριστίες

Θερμά ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μόσιαλο Δημήτριο για την ευκαιρία που μου έδωσε, συμπεριλαμβάνοντάς με στην επιστημονική του ομάδα, να ασχοληθώ με ένα θέμα το οποίο είχε άμεση συνάφεια με τις προσωπικές μου ασχολίες και για την αμέριστη βοήθεια του και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω και τα μέλη της επιτροπής, τον κ. Αμούτζια Γρηγόρη αναπληρωτή Καθηγητή Βιο-πληροφορικής και τον κ. Στάγκο Δημήτριο επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών.

Ακόμα ένα μεγάλο ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη της επιστημονικής ομάδας του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία που αναπτύχθηκε με όλα τα μέλη της και την εξαιρετική καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφερε η Χριστίνα Τσαντήλα υποψήφια διδάκτορας.

Τέλος ευχαριστώ τους γονείς μου που με στηρίζουν σε ότι κάνω και στη σύντροφο μου Αθανασία Μπέλλου που με υπομένει καθ' όλη τη διάρκεια αυτή.

## Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια αυξανόμενη ανάγκη για νέους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Μια πηγή εξεύρεσης τέτοιων ουσιών είναι και τα αρωματικά φαρμακευτικά φυτά και ιδιαίτερα τα φυτά της οικογενείας των Χειλανθών (*Lamiaceae*). Στην Ελλάδα υπάρχουν αρκετά τέτοια ενδημικά είδη με εξέχον την ελληνική *ρίγανη*, αλλά και πληθώρα άλλων όπως το *φασκόμηλο* και το *φλισκούνη* που εξετάστηκαν στην παρούσα ερευνα. Αυτά τα φυτά είναι πλούσια σε αιθέρια έλαια τα οποία παραλαμβάνονται με την διαδικασία της απόσταξης, η οποία δίνει και ως παραπροϊόν τα ανθόνερα. Τα αιθέρια έλαια είναι μείγματα πτητικών ουσιών τερπενίων με αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δράσεις ενώ την ίδια ώρα μικρή ποσότητα τέτοιων ουσιών περνάει στα ανθόνερα με την διαδικασία της απόσταξης. Σε αυτή την ερευνά μελετήθηκε η αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων και των αντίστοιχων ανθόνερων έναντι του *Streptococcus mutans*, ενός Gram θετικού βακτηρίου εποικιστή της στοματικής κοιλότητας του ανθρώπου που αποτελεί μια από τις αίτιες δημιουργίας της οδοντικής πλάκας, καθώς επίσης και την αντιμυκητιακή δράση των αιθέριων ελαίων και των ανθόνερων ενάντια στην *Candida albicans* ενός μύκητα εποικιστή του ανθρωπίνου οργανισμού, δυνητικά παθογόνου.

Για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των αιθέριων ελαίων και των ανθόνερων, χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) και για βακτηριοκτόνο δράση χρησιμοποιήθηκε η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) όπως και για την μυκητοκτόνο δράση η *in vitro* μέθοδος προσδιορισμού της ελάχιστης μυκητοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Fungicidal Concentration, MFC). Τα ανθόνερα δεν εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση πλην του ανθόνερου *ρίγανης* το οποίο είχε MBC και MFC 35% v/v. Στα αιθέρια έλαια η εικόνα ήταν διαφορετική με όλα τα αιθέρια έλαια να δείχνουν τιμές MBC και MFC στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν, πλην του αιθέριου ελαίου *φασκόμηλου* το οποίο δεν έδειξε MFC ακόμη και στην μέγιστη συγκέντρωση που εξετάστηκε 0,5% v/v. Από τα τρία αιθέρια έλαια που εξετάστηκαν, η *ρίγανη* είχε την πιο ισχυρή δράση ενάντια στους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν με MBC και MFC 0,05% v/v. Ακόμα χρησιμοποιήθηκε η καρβακρόλη σε καθαρή μορφή η οποία αποτελεί το βασικό συστατικό του αιθέριου ελαίου *ρίγανης* και τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά του αιθέριου ελαίου με τιμή MBC και MFC σε συγκέντρωση 0,0315% v/v. Συμπερασματικά, τα αιθέρια έλαια παρουσίασαν ανασταλτική και μικροβιοκτόνο δράση έναντι του βακτηρίου και του μύκητα που εξετάστηκε. Επίσης, το ανθόνερο της *ρίγανης* εμφάνισε μικροβιοκτόνο δράση. Αν ληφθεί υπόψιν ότι πολλές φορές τα ανθόνερα θεωρούνται παραπροϊόντα της διαδικασίας της απόσταξης, ανοίγει ο δρόμος για την πιθανή εφαρμογή τους ως εν δυνάμει αντιμικροβιακοί παράγοντες. Τα άλλα δυο ανθόνερα αν και δεν έδειξαν αντιμικροβιακή δράση θα μπορούσαν να

μελετηθούν περαιτέρω έναντι άλλων μικροοργανισμών ή και την αντιοξειδωτική τους δράση.

## Abstract

In recent years there has been an increasing necessity for new antimicrobial agents. A source of finding such substances are aromatic medicinal plants and especially plants of the Lamiaceae family. In Greece there are several such endemic species with the Greek *oregano* be the most dominant, but also a multitude of others such as the *sage* and the *pennyroyal* that we examine in our research. These plants are rich in essential oils which we obtain through the distillation process, which also gives us floral waters (hydrosols) as a by-product. Essential oils are mixtures of volatile terpene substances with antioxidant and antimicrobial effects, while at the same time a small amount of such substances pass into the floral waters during the distillation process. In this research we study the antibacterial activity of essential oils and the corresponding floral waters against *Streptococcus mutans*, a gram-positive bacterium colonizing the human oral cavity which is one of the causes of dental plaque. As well as the antifungal activity of essential oils and hydrosols against *Candida albicans*, a potentially pathogenic human colonizing fungus. To assess the antimicrobial ability of essential oils and hydrosols, the in vitro method of determining the minimum inhibitory concentration (MIC) was used and for bactericidal activity, the in vitro method of determining the minimum bactericidal concentration (MBC) as well as for the fungicidal activity the in vitro method for determining the minimum fungicidal concentration (MFC). Hydrosols failed to achieve antimicrobial activity except *oregano* hydrosol which achieved a minimum bactericidal concentration MBC and a minimum fungicidal concentration MFC of 35% v/v. In essential oils the results were totally different with all essential oils achieving MBC and MFC values at the concentrations tested, except *sage* essential oil which failed to achieve MFC up to the highest concentration tested 0.5% v/v. by the three essential oils tested, *oregano* had the most potent activity against the microorganisms we tested with MBC and MFC at a concentration of 0.05% v/v. Carvacrol was also used in pure form which is the main component of *oregano* essential oil and the results it gave us were similar to those of the essential oil with MBC and MFC value at a concentration of 0.0315% v/v. In conclusion, the essential oils showed inhibitory and microbicidal activity against both bacterial strain and the fungus we examined. Also, the hydrosol of *oregano*, which achieved a germicidal effect. If we take into consideration that hydrosols are often considered waste from the distillation process, the way is opened for its possible application in various fields as a candidate antimicrobial agent. The other hydrosols,

although they failed to have an antimicrobial effect, could be further studied for their antioxidant activity as well as against other microorganisms.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	Σελ.
Περίληψη	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	9
1.2 Αρωματικά Φαρμακευτικά Φυτά Α.Φ.Φ.	12
1.2.1 <i>Ρίγανη (Origanum vulgare hirtum)</i>	12
1.2.2 <i>Φασκόμηλο (Salvia officinalis)</i>	14
1.2.3 <i>Φλισκούνη (Mentha pulegium)</i>	16
1.3 Αιθέρια Έλαια και ανθόνερα	18
1.3.1 Αιθέρια Έλαια, προέλευση και φυσιολογικός ρόλος	18
1.3.2 Σύνθεση και χημική σύσταση	19
1.3.3 Παραλαβή αιθέριων ελαίων	21
1.3.4 Ανθόνερα	22
1.4 Κυριότερες χημικές ενώσεις των προς εξέταση αιθέριων ελαίων.	23
1.4.1 Αιθέριο έλαιο <i>Ρίγανης</i>	23
1.4.2 Αιθέριο έλαιο <i>Φασκόμηλο</i>	24
1.4.3 Αιθέριο έλαιο <i>Φλισκούνη</i>	24
1.5 Μικροοργανισμοί προς μελέτη	25
1.5.1 <i>Streptococcus mutans</i>	25
1.5.2 <i>Candida albicans</i>	26
1.6 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών συστατικών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών GC-MS	27
1.7 Σκοπός της παρούσας εργασίας	28
2.1 Υλικά και μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων	29
2.1.1 Υλικά	29
2.1.2 Αρχικά δείγματα	29
2.1.3 Μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων	32
2.1.3.1 Ανθόνερα	32
2.1.3.2 Αιθέρια έλαια	33
2.1.4 Τελικά δείγματα προς εξέταση	33



2.2	Πειραματικοί μέθοδοι	35
2.2.1	Μέθοδος εκτίμησης της αντιμικροβιακής ικανότητας των αιθέριων ελαίων και των ανθόνερων μέσω της μικροτιτλοποίησης (microtiter plates) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC	35
2.2.1.1	Αρχή της μεθόδου	35
2.2.1.2	Πειραματική διαδικασία - <i>Streptococcus mutans</i>	35
2.2.1.3	Πειραματική διαδικασία - <i>Candida albicans</i>	38
2.2.2	Μέθοδος εκτίμησης της αντιμικροβιακής ικανότητας των αιθέριων ελαίων και των ανθόνερων μέσω μικροτιτλοποίησης (microtiter plates) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης MBC και ελάχιστης μυκητοκτόνου συγκέντρωσης MFC	41
2.2.2.1	Αρχή της μεθόδου	41
2.2.2.2	Πειραματική διαδικασία - <i>Streptococcus mutans</i>	41
2.2.2.3	Πειραματική διαδικασία - <i>Candida albicans</i>	42
3.	Αποτελέσματα	44
3.1	Αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC και ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης MBC για το βακτήριο <i>Streptococcus mutans</i>	44
3.2	Αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC και ελάχιστης μυκητοκτόνου συγκέντρωσης MFC για τον μύκητα <i>Candida albicans</i>	45
4.	Συζήτηση	48
	Βιβλιογραφία	51
	Ευρετήριο εικόνων	55
	Ευρετήριο πινάκων	57

## 1.Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια αυξανόμενη ανάγκη για νέους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Αυτό προκύπτει από δύο κυρίως λόγους, την συνεχή ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά και την ανάγκη εξεύρεσης συντηρητικών τροφίμων τα οποία δεν θα έχουν αρνητική επίδραση στην υγεία των καταναλωτών.

Η θεραπεία με αντιβιοτικά είναι μια από τις πιο σημαντικές θεραπείες που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση μολυσματικών ασθενειών και έχει συμβάλει τα μέγιστα στην ανθρώπινη υγεία από την έναρξη της(Υαρ et al., 2014). Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά θεωρείται πλέον ως μία από τις κορυφαίες προκλήσεις της δημόσιας υγείας που αντιμετωπίζει ο 21ος αιώνας. Η αυξανόμενη μικροβιακή αντοχή κορυφώθηκε τις τελευταίες δεκαετίες, μερικές μόνο δεκαετίες μετά την ανακάλυψη και τη χρήση αντιβιοτικών στις αρχές του 20ου αιώνα, Η υπερβολική και κακή χρήση αντιβιοτικών στον άνθρωπο, αλλά και στην κτηνιατρική οδήγησαν στην εμφάνιση και τη διάδοση ανθεκτικών βακτηρίων(Meyer et al., 2013). Ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την αυξανόμενη εξάπλωση της αντοχής στα αντιβιοτικά είναι η υπερβολική έκθεση των βακτηρίων σε αντιβιοτικά(Υαρ et al., 2014). Ωστόσο, η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά είναι ένα αρχαίο και φυσικό φαινόμενο. Πρόσφατα βρέθηκαν γονίδια 30.000 ετών που κωδικοποιούν ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες, τη βανκομυκίνη και την τετρακυκλίνη σε ιζήματα μόνιμου παγετού στο βόρειο τμήμα του Καναδά(Meyer et al., 2013). Στο παρελθόν η αναζήτηση φυσικών προϊόντων είχε σχεδόν εγκαταλειφθεί, εν μέρει επειδή είχε πάψει να εντοπίζει νέους δυνητικούς πελάτες, ήταν χρονοβόρα και δεν εφάρμοζε καλά σε συστήματα ελέγχου υψηλής απόδοσης. Ωστόσο, υπάρχει νέα τάση της χρήσης φυτικών φαρμάκων παγκοσμίως. Η εκμετάλλευση φυσικών προϊόντων για ιατρικές χρήσεις είναι συνεχώς αυξανόμενη στις μέρες μας(Υαρ et al., 2014). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι παρόμοια εικόνα εμφανίζεται και στην αυξανόμενη αντοχή σε αντιμυκητιακά φάρμακα. Η αντιμυκητιακή ανθεκτικότητα είναι ένα αυξανόμενο πρόβλημα με τον μύκητα *Candida*, έναν ζυμομύκητα που ανήκει στους ασκομύκητες. Η *Candida albicans* έχει αναπτύξει μηχανισμούς αντοχής στα φάρμακα με διάφορες στρατηγικές για να υπερνικήσει τις επιδράσεις διαφόρων κατηγοριών φαρμάκων. Η *Candida albicans* είναι ευκαιριακός μύκητας που ευθύνεται για ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις που στοιχίζουν εκατομμύρια ζωές κάθε χρόνο παγκοσμίως(Dhasarathan et al., 2021).

Η δεύτερη ανάγκη για αναζήτηση αντιμικροβιακών παραγόντων προκύπτει από το γεγονός ότι σήμερα τα περισσότερα προϊόντα τροφίμων έχουν συντηρητικά. Ο σκοπός είναι γενικά η διατήρηση των φυσικών χαρακτηριστικών της τροφής και η αύξηση της διάρκειας ζωής των τροφίμων αναστέλλοντας τη φυσική γήρανση και τον

αποχρωματισμό που μπορεί να εμφανιστεί κατά την προετοιμασία του φαγητού όπως την ενζυμική αντίδραση ροδίσματος στα μήλα μετά την κοπή τους καθώς και την μικροβιακή αλλοίωση(Sharma, 2015). Η πλειοψηφία των συντηρητικών που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι τεχνητά και όχι φυσικά. Αρκετά από αυτά είναι τοξικά και αρκετά άλλα έχουν δυνητικά απειλητικές για τη ζωή παρενέργειες. Οι ερευνητές έχουν αναφέρει ότι τεχνητά συντηρητικά όπως νιτρικά, βενζοϊκά, θειώδη, σορβικά, parabens, φορμαλδεΐδη, ΒΗΤ, ΒΗΑ και πολλά άλλα μπορούν να προκαλέσουν σοβαρούς κινδύνους για την υγεία όπως υπερευαισθησία, αλλεργία, άσθμα, υπερκινητικότητα, νευρολογική βλάβη και καρκίνο (Anand & Sati, 2013). Τα τελευταία χρόνια έχει εμφανιστεί μεγάλο ενδιαφέρον για τη χρήση βιοδραστικών φυτικών εκχυλισμάτων ή φυτικών ενώσεων ως φυσικά αντιμικροβιακά στα τρόφιμα λόγω της δυνατότητας επέκτασης του φάσματος δράσης τους σε συμφωνία με τις ρυθμιστικές αρχές για την ασφάλεια τροφίμων για χρήση ως συντηρητικά. Έρευνες που αφορούν στην χρήση των αιθέριων ελαίων για συντήρηση προϊόντων διατροφής προκειμένου να ενισχυθεί η διάρκεια ζωής τους έχουν πραγματοποιηθεί με επιτυχία τα τελευταία χρόνια. Ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει αιθέρια έλαια, είτε σε καθαρές μορφές είτε σε φόρμουλες για να ενισχύσουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων σε διάφορα μέσα αποθήκευσης όπως αυτά από χαρτόνι, κασσίτερο, γυαλί, πολυαιθυλένιο ή φυσικά υφάσματα και έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση της διάρκειας ζωής. Τα αιθέρια έλαια των αρωματικών φαρμακευτικών φυτών έχουν αντιμικροβιακές και συντηρητικές ιδιότητες γιατί αποτελούνται από μια ποικιλία ενεργών συστατικών όπως τερπένια, τερπενοειδή, και πολυφαινόλες που έχουν μεγάλη σημασία στη βιομηχανία τροφίμων. Έτσι, οι διάφορες ιδιότητες των αιθέριων ελαίων προσφέρουν τη δυνατότητα χρήσης φυσικών, ασφαλών, φιλικών προς το περιβάλλον, οικονομικά αποδοτικών, ανανεώσιμων και εύκολα βιοαποδομήσιμων αντιμικροβιακών ουσιών για τη συντήρηση των προϊόντων διατροφής στο εγγύς μέλλον(Pandey et al., 2017).

## 1.2 Αρωματικά Φαρμακευτικά Φυτά Α.Φ.Φ.

Αρωματικά φυτά θεωρούνται τα φυτά που η παρουσία των αιθέριων ελαίων τους δίνει ένα ιδιαίτερο άρωμα και αυτά τα αιθέρια έλαια μπορούν να παραληφθούν με διάφορες μεθόδους . Με τον όρο αιθέρια έλαια εννοούνται πτητικές ενώσεις που προσδίδουν στο φυτό μια χαρακτηριστική οσμή. Φαρμακευτικά φυτά αποκαλούνται τα φυτά που οι δραστικές ουσίες που περιέχουν χρησιμοποιούνται για πρόληψη και για θεραπεία ασθενειών. Τα αρωματικά - φαρμακευτικά φυτά αποτελούσαν πάντα αντικείμενο εμπορίου με σημαντικά οικονομικά οφέλη. Ωστόσο η σπουδαιότητά τους περιορίστηκε σημαντικά με την παρασκευή συνθετικών χημικών ουσιών. Η προσπάθεια μείωσης της χρήσης χημικών προσθέτων στα τρόφιμα, και μείωσης της χρήσης συνθετικών φαρμάκων ανανέωσε το ενδιαφέρον για τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, έτσι ώστε σήμερα η παγκόσμια βιομηχανία τροφίμων, ποτών, καλλυντικών και φαρμάκων επιστρέφει ξανά στη φύση, με αποτέλεσμα όλο και περισσότερο να χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των προϊόντων τους, ουσίες φυτικής προέλευσης. Η συστηματική μελέτη πολλών φυτών ανακάλυψε πολλές νέες ουσίες και χρήσεις, π.χ. αρωματοθεραπεία. Η Ασία παραμένει ακόμα η κυρίαρχη παραγωγός περιοχή πολλών αρωματικών - φαρμακευτικών φυτών. Ωστόσο, οι καλλιεργούμενες εκτάσεις συνεχώς αυξάνονται στη Δύση. Οι Η.Π.Α. είναι πλέον ο κύριος αγοραστής και ακολουθούν η Γερμανία, η Ιαπωνία και η Γαλλία, ενώ τα μεγαλύτερα κέντρα εμπορίου είναι το Αμβούργο, η Νέα Υόρκη και το Τόκιο (Μαλούπα et al., 2015).

### 1.2.1 Ρίγανη (*Origanum vulgare ssp hirtum*)

Η ρίγανη η << Ελληνική >> όπως συνηθίζεται να αναφέρετε παγκόσμιος είναι το είδος *Origanum vulgare ssp hirtum* το οποίο συναντάται κυρίως αυτοφυές στην Ελλάδα αλλά και στην νοτιά βαλκανική χερσόνησο(Vokou et al., 1993).Είναι αυτοφυής σε χαμηλά έως μεσαία υψόμετρα σε ηλιόλουστα θαμνώδη και χέρσα μέρη σε όλη την Ελλάδα ενώ ευδοκμεί σε ημιορεινές περιοχές. Η *Origanum vulgare ssp hirtum* ανήκει στην οικογένεια των Λαμίδων ή Χειλανθών. Το γένος *Origanum* έχει ένα μεγάλο αριθμό υποειδών (taxa) 49, καθώς και φυσικά υβρίδια. Η *Origanum vulgare ssp hirtum* είναι πολυετές φυτό με όρθιο βλαστό ύψους 30 έως 80 εκατοστών. Έχει μικρά φύλλα έμμισχα ωοειδή και τα άνθη της είναι μικρά λευκά(Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010). Στις μέρες μας καλλιεργείται ευρέως σε όλο τον κόσμο ως φαρμακευτικό, μπαχαρικό, καλλωπιστικό και μελισσοκομικό φυτό που περιέχει αιθέρια έλαια πλούσια σε καρβακρόλη και θυμόλη. Η περιεκτικότητα του φυτού σε

αιθέριο έλαιο ποικίλει και μπορεί να είναι από 1.1% εως 8.2% σε ξηρό βότανο(Król et al., 2019). Τα κυρία συστατικά της *Origanum vulgare ssp hirtum* είναι τα φαινολικά μονοτερπένια θυμόλη και καρβακρόλη ακολουθούμενα από τις πρόδρομές τους ουσίες π-κυμένιο και γ-τερπινένιο(Węglarz et al., 2020). Η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο της *ρίγανης* καθώς και η σύνθεση του δύναται να μεταβάλλεται κατά την διάρκεια του κύκλου ανάπτυξης του φυτού. Το αιθέριο έλαιο της *ρίγανης* μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην αρωματοποιία ή συντηρητικό στη βιομηχανία τροφίμων για βελτίωση της γεύσης και παράταση του χρόνου αποθήκευσης των διαφόρων προϊόντων διατροφής, ως μυκητοκτόνα, ως εντομοκτόνα στην αρωματοποιία και είδη προσωπικής υγιεινής(Król et al., 2019). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ελληνική *ρίγανη* περιλαμβάνεται στην ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία και συνιστάται ως φάρμακο για τη θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών, προσωρινή απώλεια της όρεξης και την τόνωση της έκκρισης χολής(Węglarz et al., 2020).



Εικόνα 1. α)Κοντινή φωτογραφία φύλλων *ρίγανης Origanum vulgare ssp hirtum* όπου διακρίνονται οι ελαιοφόροι αδένες κατά την περίοδο του χειμώνα που το φυτό έχει περιορισμένη ανάπτυξη.



Εικόνα 1. β) Ανθοί ρίγανης *origanum vulgare ssp hirtum*.



Εικόνα 1. Γ) Φυτό ρίγανης *Origanum vulgare ssp hirtum* σε πλήρη άνθηση λίγο πριν την συγκομιδή για απόσταξη. Αρχές Αυγούστου.

Πηγή: προσωπικό αρχείο.

### 1.2.2 Φασκόμηλο (*Salvia officinalis*)

Το φασκόμηλο ανήκει στην οικογένεια των Λαμίδων ή Χειλανθών. Αποτελεί το μεγαλύτερο γένος ανάμεσα στην οικογένεια των Χειλανθών (Labiatae) με περισσότερα από 900 είδη σε όλων τον κόσμο (Abu-Darwish et al. 2013). Το φασκόμηλο είναι ένας ορθόκλαδος θάμνος το ύψος του οποίου φτάνει τα 40 με 80 εκατοστά και πλάτος 45 με 60 εκατοστά, ενώ είναι έντονα αρωματικό. Ο βλαστός

είναι ξυλώδης ενώ τα άνθη του είναι ιώδη μπλε. Τα φύλλα του φυτού είναι στενόμακρα γκριζοπράσινα με πολλά τριχίδια και έντονο άρωμα. Φύεται σε βραχώδη ξηρά εδάφη και σε υψόμετρο από 0 έως 300 μέτρα υψόμετρο ενώ ανθίζει από τον Απρίλιο μέχρι τον Ιούνιο (Κατσιώτης 2010). Τα πιο κοινά είδη είναι η *Salvia officinalis* (κοινό φασκόμηλο) η *Salvia fruticose* (φασκόμηλο το ελληνικό) , *Salvia scarlea* (φασκόμηλο το διαυγές) , *Salvia miltiorrhiza* (κινεζικό φασκόμηλο). Πολλά είδη *Salvia* είναι ενδημικά στις περιοχές γύρο από την λεκάνη της μεσόγειου ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για την θεραπεία μιας σειράς προβλημάτων όπως κυκλοφορικές διαταραχές, υπερβολική εφίδρωση φλεγμονή στόματος και λαιμού, προβλήματα μνήμης, βρογχίτιδα (Lopresti 2017). Τα φυτά του φασκόμηλου διακρίνονται παραδοσιακά για τις αντιοξειδωτικές τους δράσεις και την ικανότητά τους να ενισχύουν την λειτουργία «της σκέψης και του εγκεφάλου», για βελτίωση της μνήμης και επιταχύνουν τις αισθήσεις (Abu-Darwish et al. 2013). Τα φυτά του φασκόμηλου είναι μια πλούσια πηγή πολυφαινολικών ενώσεων με περισσότερες από 160 αναγνωρισμένες πολυφαινόλες, που περιλαμβάνουν μια σειρά από φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή (Lopresti 2017). Το φασκόμηλο έχει αιθέριο έλαιο το οποίο παράγεται από εκκριτικά τριχίδια τα οποία βρίσκονται κυρίως στο κάτω μέρος τις επιφανείας των φύλλων. Τα πιο σημαντικά συστατικά του αιθέριου ελαίου είναι οι μονοτερπενικές κετόνες α και β - θουγιόνη και η καμφορά τα οποία μπορούν να είναι από 30 έως 60 % του αιθέριου ελαίου και η αναλογία τους χαρακτηρίζει τους διαφόρους τύπους των αιθέριων ελαίων φασκόμηλου. Η τοξικότητα αυτών των ουσιών το κάνουν να αντενδείκνυται για εσωτερική λήψη. Άλλες ουσίες που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο είναι 1,8-κινεόλη, α-χουμουλένιο, καρυοφυλλένιο και λιναλοόλη. Λόγω των ιδιοτήτων του αιθέριου ελαίου του, χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία σε καλλυντικά στη βιομηχανία τροφίμων ως βελτιωτικό οσμής και γεύσης, κατά της ουλίτιδας και ως απωθητικό εντόμων (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010).



Εικόνα 2. α) Κοντινή φωτογραφία φύλλου φασκόμηλου όπου διακρίνονται οι ελαιοφόροι αδένες.



Εικόνα 2. β) Άνθη *Salvia officinalis*.



Εικόνα 2. γ) Φυτά φασκόμηλου (*Salvia officinalis*) σε πλήρη άνθηση έτοιμα για συγκομιδή και απόσταξη. Αρχές Μαΐου

Πηγή: προσωπικό αρχείο.

### 1.2.3 Φλισκούνη (*Mentha pulegium*)

Το φλισκούνη ή αλλιώς *Mentha pulegium* είναι ένα βότανο το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθων (Labiatae) ή Λαμίδων (Lamiaceae) (Luís & Domingues, 2021). Είναι ένα από τα τέσσερα πιο σημαντικά εμπορικά είδη Μέντας. Μπορεί να βρεθεί σε όλη τη νοτιοδυτική και κεντρική Ευρώπη από την Ιρλανδία και Κεντρική Πολωνία προς Ουκρανία. Βρίσκεται σε αφθονία στην Ιβηρική χερσόνησο και στις χώρες της Βόρειας Αφρικής που συνορεύουν με τη Μεσόγειο Θάλασσα όπως η



Αλγερία, το Μαρόκο και η Τυνησία. Στην Ελλάδα μεγαλώνει στην άγρια φύση και είναι διάσπαρτο σε όλη τη χώρα. Το *φλισκούνι* είναι περισσότερο γνωστό για το αιθέριο έλαιό του, το οποίο λαμβάνεται με υδροαπόσταξη ή απόσταξη με ατμό από τα φυτά σε πλήρη άνθηση (Kanakis et al., 2012). Τα ξηρά μέρη από το *Φλισκούνι* και το αιθέριο έλαιο του έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική, γαστρονομία, στη παραγωγή καλλυντικών και στην αρωματοθεραπεία. Μάλιστα αναφορές έχουν δείξει ότι το αιθέριο έλαιο από το *φλισκούνι* εμφάνισε αντιβακτηριακή δράση έναντι πολλών βακτηριακών στελεχών. Επίσης, το τοξικολογικό προφίλ από το *φλισκούνι* έχει επίσης υποβληθεί σε εκτενή έρευνα, και αρκετά συστατικά, ιδιαίτερα τερπενοειδή όπως η πουλεγόνη, εμφανίζουν δράση ηπατοτοξική και εκτρωτική (Luís & Domingues, 2021). Το αιθέριο έλαιο από το *Φλισκούνι* χρησιμοποιείται στη παραδοσιακή ιατρική ως αντισπασμωδικό, αντιεμετικό, τονωτικό της καρδιάς και ηρεμιστικό (Kanakis et al., 2012).



Εικόνα 3. Ανθισμένο φυτό φλισκούνι

Πηγή: προσωπικό αρχείο.

## 1.3 Αιθέρια Έλαια και ανθόνερα

### 1.3.1 Αιθέρια Έλαια, προέλευση και φυσιολογικός ρόλος

Τα αιθέρια έλαια είναι μείγματα πτητικών δευτερογενών μεταβολιτών όπως μονοτερπενίων και άλλων που δίνουν χαρακτηριστική οσμή σε ορισμένα φυτά. Το *φασκόμηλο*, ο βασιλικός, η μέντα είναι τέτοια παραδείγματα (Lincoln & Zeiger, 2012). Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικά σε κανονική θερμοκρασία, εύφλεκτα, και δεν αφήνουν σημάδια σε διηθητικό χαρτί, σε αντίθεση με τα έλαια που αφήνουν. Είναι διαλυτά στην αλκοόλη και στον αιθέρα και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες ενώ διαλύονται ελάχιστα στο νερό. Το χρώμα τους μπορεί να είναι από άχρωμο έως υποκίτρινο εκτός από ελάχιστες εξαιρέσεις όπως το αιθέριο έλαιο χαμομήλι που είναι μπλε (Σουλελής, 2000). Το αιθέριο έλαιο μπορεί να βρίσκεται σε ελαιοφόρους αδένες στην επιφάνεια των φύλλων του φυτού όπως π.χ. στα φύλλα βασιλικού ενώ μπορεί να βρίσκονται και εντός των φύλλων όπως στα φύλλα του ευκαλύπτου (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010). Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων προέρχονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό των φυτών. Τα φυτά παράγουν τους δευτερογενείς μεταβολίτες ή αλλιώς φυσικά προϊόντα, αυτοί μεταβολίτες είναι ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών οργανικών ενώσεων. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι ουσίες που παράγονται μόνο σε επιμέρους ιστούς του φυτού σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης και σε συγκεκριμένα είδη φυτών. Δεν απαιτούνται για την ομαλή διεξαγωγή φυσιολογικών λειτουργιών του φυτού, όπως είναι η αύξηση τους και η ανάπτυξη τους. Ο ρόλος τους είναι να προστατεύουν τα φυτά έναντι φυτοφάγων ζώων, εντόμων και παθογόνων μικροοργανισμών ενώ παρέχουν προστασία από αβιοτικούς παράγοντες. Ακόμα προσελκύουν επικονιαστές και ζώα που συμβάλουν στην διασπορά των σπερμάτων. Τέλος λειτουργούν και ως παράγοντες συμβίωσης με μικροοργανισμούς και ως παράγοντες ανταγωνισμού μεταξύ των φυτών. οι κυρίες ομάδες δευτερογενών μεταβλητών είναι τρεις (Lincoln & Zeiger, 2012) :

- Τερπένια :

Κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων και αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών.

- Φαινολικές ενώσεις :

Ενώσεις που προέρχονται από το μονοπάτι του σικιμικού οξέος με πρόδρομο μόριο το αμινοξύ φαινυλαλανίνη. Πρόκειται για μια λειτουργική υδροξυλομάδα πάνω σε έναν αρωματικό δακτύλιο. Οδηγούν στον

σχηματισμό φλαβονών, φλαβονόλες, ταννίνες και ισοφλαβόνες. Βρίσκονται σε επιδερμικά κύτταρα φύλλων και βλαστών.

- Αζωτούχες ενώσεις :

Συντίθενται από αμινοξέα, περιλαμβάνονται ευρέως γνωστές ενώσεις όπως καφεΐνη μορφίνη και νικοτίνη. Οι κατηγορίες ουσιών που τις απαρτίζουν είναι τα αλκαλοειδή, οι κυανογόνοι γλυκοζίτες, τα γλυκοζινολικά και τα μη πρωτεϊνικά αμινοξέα.

### 1.3.2 Σύνθεση και χημική σύσταση

Τα αιθέρια έλαια αποτελούν μείγματα πτητικών τερπενίων. Τα τερπένια αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών. Ο σχηματισμός τερπενίων γίνεται με την σύντηξη ομάδων ισοπρενοειδών με πέντε άτομα άνθρακα. Υπάρχουν δυο οδοί για την βιοσύνθεση τερπενίων η οδός του μεβαλονικού οξέος όπου τρία μόρια ακέτυλο-CoA ενώνονται διαδοχικά για να σχηματίσουν μεβαλονικό οξύ. Το μεβαλονικό οξύ στη συνέχεια πυροφωσφορυλιώνεται ,αποκαρβοξυλιώνεται και αφυδατώνεται για να σχηματιστεί διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) το οποίο αποτελεί την ενεργοποιημένη δομική μονάδα των τερπενίων αποτελούμενη από πέντε άτομα άνθρακα. Η άλλη οδός ονομάζεται οδός της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης η οποία διεξάγεται στους χλωροπλάστες και σε άλλα πλαστίδια. Η οδός αυτή οδηγεί σε σχηματισμό IPP από ενδιάμεσους μεταβολίτες της γλυκόλυσης ή του φωτοσυνθετικού κύκλου ανάγωγης του άνθρακα. Το διφωσφορικό πεντενύλιο (IPP) και το ισομερές του διφωσφορικό διμεθυλαλλίλιο (DMAPP) είναι οι ενεργοποιημένες δομικές μονάδες πέντε ατόμων άνθρακα που ενώνονται μεταξύ τους και βιοσυνθέτουν τα τερπένια(Lincoln & Zeiger, 2012).



### 1.3.3 Παραγωγή (ή Εξαγωγή) αιθέριων ελαίων

Η παραλαβή των αιθέριων ελαίων από το φυτό υλικό γίνεται με διάφορους τρόπους, οι πιο γνωστοί είναι με απόσταξη και με εκχύλιση.

Η απόσταξη είναι η πιο απλή οικονομική μέθοδος των αιθέριων ελαίων σχεδόν από όλα τα αρωματικά φυτά. Είναι αρχαία μέθοδος κατά την οποία ετερογενή μείγματα τα διάφορα συστατικά παραλαμβάνονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από το σημείο βρασμού του καθενός. Για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου τοποθετείται το φυτικό υλικό που πρόκειται να αποσταχθεί στον άμβυκα όπου διοχετεύεται ατμός μέσα από το φυτικό υλικό. Οι ατμοί αυτοί στη συνέχεια διοχετεύονται μέσω του απαγωγού σωλήνα στον ψυκτήρα όπου υγροποιούνται. Το απόσταγμα ρέει στο φλωρεντιανό (διαχωριστικό δοχείο) όπου διαχωρίζεται το νερό από το αιθέριο έλαιο. Κατά την συμπύκνωση λόγω διαφορετικού ειδικού βάρους του νερού από το αιθέριο έλαιο τα δυο υγρά διαχωρίζονται και σχηματίζονται οι δυο φάσεις, μια του αιθέριου ελαίου και μια του νερού. Το νερό που είναι αποτέλεσμα της απόσταξης και αποτελεί την υδατική φάση η οποία είναι εμπλουτισμένη με το φυτικό άρωμα αποτελεί το ανθόνερο το οποίο είναι ένα επιπλέον χρήσιμο προϊόν. Να σημειωθεί ότι είναι ο μονός τρόπος παραλαβής ανθόνερου καθώς σε άλλες μεθόδους δεν γίνεται χρήση νερού. Η απόσταξη ανάλογα με τον τρόπο που γίνεται διακρίνεται σε τρεις μεθόδους οι οποίες μπορεί να έχουν και διαφορετικό αποτέλεσμα στο τελικό προϊόν.

#### ➤ Απόσταξη με υδρατμούς

Σε αυτή την μέθοδο δεν εισάγεται καθόλου νερό στον άμβυκα αλλά ατμός ο οποίος παράγεται σε ατμογεννήτριες. Η εισαγωγή του ατμού γίνεται από τον πυθμένα του άμβυκα με πίεση μεγαλύτερη της ατμοσφαιρικής ενώ με κατάλληλη δομή ο ατμός διαχέεται από όλη την επιφάνεια του πυθμένα. Το αιθέριο έλαιο που παράγεται είναι καλύτερης ποιότητας σε σχέση με τις άλλες δυο μεθόδους και έχει σχετικά μεγάλη απόδοση. Τέλος χρησιμοποιείται κατεξοχήν στην βιομηχανία.

#### ➤ Απόσταξη με νερό και υδρατμούς

Σε αυτή την μέθοδο το νερό τοποθετείται εντός του άμβυκα και το φυτικό υλικό τοποθετείται υψηλότερα διαχωρισμένο με ένα πλέγμα ώστε να μην έρχεται σε επαφή το νερό με το φυτικό υλικό αλλά μόνο υδρατμοί. Συνήθως γίνεται σε μικρής κλίμακας αποστάξεις ενώ μειονέκτημα είναι η μεγάλη διάρκεια απόσταξης και η μικρότερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο σε σχέση με την μέθοδο με τους υδρατμούς.

### ➤ Απόσταξη με νερό

Σε αυτή την μέθοδο το φυτικό υλικό βρίσκεται μέσα στο νερό το οποίο βράζει και άρα έρχονται σε άμεση επαφή. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε άνθη πορτοκαλιάς, ροδοπέταλα κ.α. λόγω του ότι τέτοια υλικά πρέπει να αιωρούνται ελεύθερα στο νερό κατά την απόσταξη καθώς δεν μπορούν να αποταχθούν με υδρατμούς γιατί σχηματίζουν συμπαγείς μάζες από όπου δεν μπορεί να περάσει ο ατμός. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η απλή εφαρμογή της και ότι είναι οικονομική ενώ μειονεκτεί στον μεγάλο χρόνο απόσταξης.

Εκτός από την απόσταξη η εκχύλιση σε διαλύτες είναι μια κοινή μέθοδος παραλαβής των αιθέριων ελαίων. Η εκχύλιση μπορεί να γίνει σε οργανικούς διαλύτες αρκετά πτητικούς όπως ο πετρελαϊκός αιθέρας ο οποίος μετά την εκχύλιση απομακρύνετε μέσω εξάτμισης σε χαμηλή θερμοκρασία σε κενό αέρος. Το προϊόν που συλλέγετε ονομάζετε κονκρέτα και αποτελείται κατά κύριο λόγο από το αιθέριο έλαιο του φυτού. Σε σχέση με το απεσταγμένο αιθέριο έλαιο το εκχυλισμένο αντιπροσωπεύει το πραγματικό άρωμα του φυτού αλλά λόγω μεγάλου κόστους της μεθόδου εφαρμόζεται μόνο σε υψηλής προστιθέμενης αξίας φυτικά υλικά. Τέλος η μέθοδος εκχύλισης με υπερκρίσιμα υγρά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραλαβή αιθέριων ελαίων. Αποτελεί την πιο εύχρηστη μέθοδο με μικρούς χρόνους εκχύλισης ελάχιστα εργαστηριακά έξοδα ενώ το κόστος του διαλυτού που είναι το CO<sub>2</sub> είναι πολύ μικρό. Παρόλα αυτά η εγκατάσταση μιας βιομηχανικής κλίμακας μονάδας εκχύλισης είναι πολύ υψηλού κόστους.

### 1.3.4 Ανθόνερα

Τα ανθόνερα αποτελούν την υδατική φάση, από τη μέθοδο παραγωγής αιθέριου ελαίου με απόσταξη. Ποσότητα μικρότερη από 1 g/L συστατικών αιθέριων ελαίων διαλύεται στο ανθόνερο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Είναι αυτό που τους δίνει τη συγκεκριμένη βιολογική δραστηριότητα και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Η χημική τους σύνθεση και οι δραστικές ενώσεις μπορεί να αποκλίνουν από το διαχωρισμένο αιθέριο έλαιο. Τα ανθόνερα εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση, η οποία εξαρτάται από το κύριο συστατικό τους και την απόλυτη διαλυτή ποσότητα. Τα ανθόνερα βρίσκουν εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και αρωμάτων (Ασίμονιό et al., 2020). Συχνά θεωρούνται παραπροϊόντα της διαδικασίας της απόσταξης. Η εκμετάλλευση τέτοιων παραπροϊόντων μπορεί να αποτελέσει μια βιώσιμη προσέγγιση, σύμφωνα με τις αρχές της κυκλικής οικονομίας, ενώ σύγχρονος να αντιμετωπίσει τα περιβαλλοντικά

ζητήματα που προκύπτουν από τη δημιουργία αυτής της τεράστιας ποσότητας αποβλήτων (Politi et al., 2020).



α) δοχείο παραγωγής ατμού.

β) καζάνι ατμοαπόσταξης και ψυκτήρας υγροποίησης.

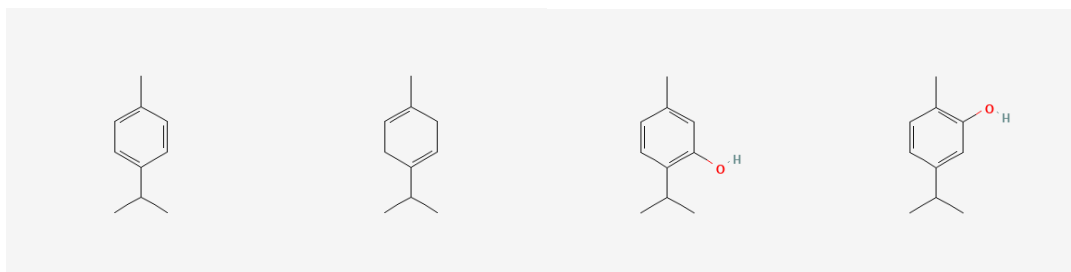
Εικόνα 5. Συγκρότημα ατμοαπόσταξης χωρητικότητας 200lt

Πηγή: προσωπικό αρχείο.

## 1.4 Κυριότερες χημικές ενώσεις των προς εξέταση αιθέριων ελαίων.

### 1.4.1 Αιθέριο έλαιο ρίγανης

Το αιθέριο έλαιο ρίγανης παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις ως προς την σύσταση του. Τα σημαντικότερα συστατικά της *Origanum vulgare ssp hirtum* είναι το π-κυμενιο, γ-τερπενινένιο, θυμόλη και καρβακρόλη (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010). το π-κυμενιο, γ-τερπενινένιο θεωρούνται ότι είναι πρόδρομες ουσίες της θυμόλη και καρβακρόλης.



α) Π-κυμένιο

β) γ-τερπενινένιο

γ) θυμόλη

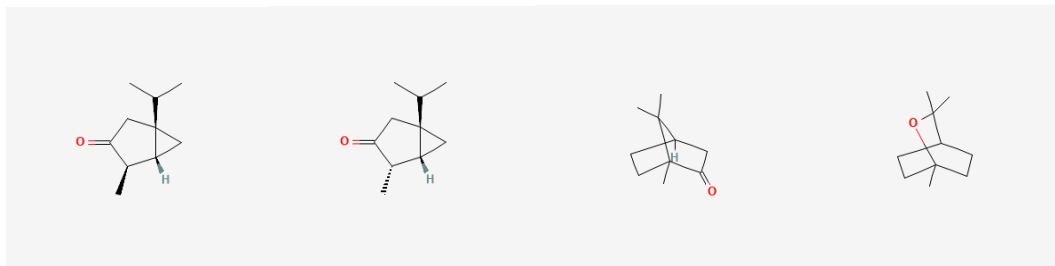
δ) καρβακρόλη

Εικόνα 6.

πηγή: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

### 1.4.2 Αιθέριο έλαιο Φασκόμηλο

Τα κυρία συστατικά του αιθέριου ελαίου *φασκόμηλου* είναι α και β θουγιόνη που μπορεί να αποτελούν και το 50% του αιθέριου ελαίου. Άλλα σημαντικά συστατικά είναι η 1-8 κινεόλη και η καμφορά (Κατσιώτης & Χατζοπούλου, 2010).



α) α-θουγιόνη

β) β-θουγιόνη

γ) καμφορά

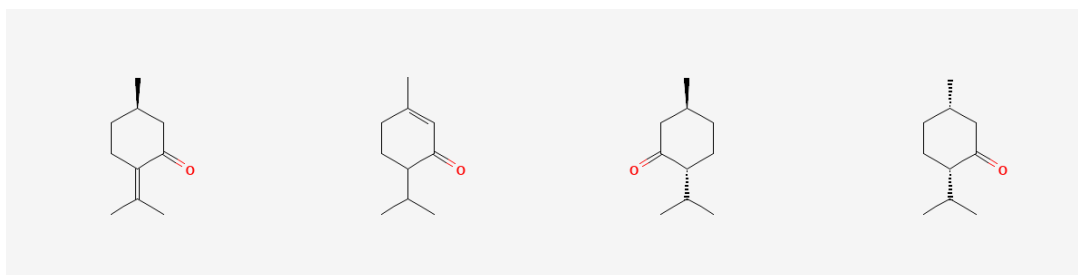
δ) 1-8 κινεόλη

Εικόνα 7.

πηγή: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

### 1.4.3 Αιθέριο έλαιο Φλισκούνη

Τα κύρια συστατικά του αποσταγμένου αιθέριου ελαίου είναι η πουλεγόνη, η μενθόνη, η ισομενθόνη και η πιπεριτόνη. Αρκετές διάφορες υπάρχουν στην ποσότητα αιθέριου ελαίου που περιέχει το φυτό του *φλισκουινιού* αλλά και στην σύνθεση τους μεταξύ φυτών που προέρχονται από διαφορετικές χώρες. Το μεγαλύτερο ποσοστό ωστόσο καταλαμβάνει η πουλεγόνη (Kanakakis et al., 2012).



α) πουλεγόνη

β) πιπεριτόνη

γ) μενθόνη

δ) ισομενθόνη

Εικόνα 8.

πηγή: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>



## 1.5 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ

### 1.5.1 *Streptococcus mutans*

Ο *Streptococcus mutans* είναι ένα Gram θετικό, προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο το οποίο αποτελεί βασική αιτία της δημιουργίας βακτηριακής πλάκας των δοντιών. Αποτελεί φυσικό εποικιστή της ανθρώπινης στοματικής κοιλότητας . Επίσης μπορεί να είναι αιτία για άλλες ασθένειες όπως ενδοκαρδίτιδα, μια φλεγμονή των βαλβίδων της καρδιάς που μπορεί να είναι απειλητική για την ζωή του ασθενούς. Ο *Streptococcus mutans* είναι ένα οξυγαλακτικό βακτήριο που βασίζεται αποκλειστικά στην ζύμωση για παραγωγή ενέργειας παράγοντας γαλακτικό οξύ. Έχει τη δυνατότητα να μεταβολίζει ένα μεγάλο εύρος υδατανθράκων σε οργανικά οξέα. Το γαλακτικό οξύ που παράγει από τη ζύμωση είναι η αιτία που καταστρέφει το σμάλτο των δοντιών . Επίσης ο *Streptococcus mutans* έχει την δυνατότητα να παράγει μεγάλες ποσότητες από εξωκυτταρικά πολυμερή γλυκόζης, γλυκάνες. Για να το καταφέρει αυτό διαθέτει τρεις γλυκοτρανσφεράσες τις GtfB ,GtfC και GtfD οι οποίες χρησιμοποιούν τη γλυκόζη από την σουκρόζη για να συνθέσουν αυτά τα πολυμερή. Πιο συγκεκριμένα η GtfB συνθέτει μη υδατοδιαλυτές γλυκάνες γλύκανες πλούσιες σε α1-3 δεσμούς , η GtfC συνθέτει μίξη από υδατοδιαλυτές και μη υδατοδιαλυτές γλυκάνες πλούσιες σε α 1-6 δεσμούς και τέλος η GtfD συνθέτει κυρίως δεξτράνη. Αυτά τα εξωκυτταρικά πολυμερή γλυκόζης βοηθούν τον *Streptococcus mutans* να προσκολληθεί στις σκληρές επιφάνειες των δοντιών και να δημιουργηθεί ένας βιομένας στο οποίο συμμετέχουν και άλλα μικρόβια της στοματικής κοιλότητας τα οποία δεν έχουν την δυνατότητα παράγωγης εξωκυττάρων πολυμερών γλυκόζης. Το σύνολο των μικροοργανισμών αυτών αποτελούν την οδοντική πλάκα (Forssten et al., 2010; Lemos et al., 2019). Οι ασθένειες των δοντιών των οποίων ο *Streptococcus mutans* αποτελεί βασικό παράγοντα έχουν σημαντικό παγκόσμιο οικονομικό αντίκτυπο: το 2010 η άμεση θεραπεία αντιστοιχούσε στο 4,6% του παγκόσμιου κόστους υγείας(Kastenbom et al., 2019).

### 1.5.2 *Candida albicans*

Η *Candida albicans* είναι ένας ζυμομύκητας ο οποίος περιλαμβάνεται στην φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπου. Τα είδη της *Candida* έχουν ωοειδείς μορφές όπως οι ζύμες ενώ η *Candida albicans* σχηματίζει βλαστικούς σωλήνες και τελικά χλαμυδοκονία με παχύ τοίχωμα. Η *Candida albicans* μπορεί να έχει αρκετούς φαινοτύπους που εναλλάσσονται από τις τυπικές λείες λεύκες αποικίες με εκβλαστώνοντα κύτταρα που μοιάζουν με ζύμες, έως αποικίες αποτελούμενες από μορφές ψευδό-υφών και υφών. Η συχνότητα αλλαγής φαινοτύπων είναι μεγάλη και πιθανώς οφείλετε σε αλλαγές στο μικροπεριβάλλον. Αυτή η μετατροπή δικαιολογεί την ικανότητα της *Candida albicans* να επιβιώνει σε διαφορετικούς μικροτόπους με διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό ξενιστή (Murray, n.d.). Ως φυσικός αποικιστής του ανθρώπου που εντοπίζεται στον γαστρεντερικό σωλήνα από το στόμα έως το ορθό μπορεί να προκαλέσει ευκαιριακές λοιμώξεις. Η λοιμογόνος δράση της εξαρτάται κυρίως από την κατάσταση του ξενιστή και το επίπεδο ανοσοκαταστολής του. Μπορεί να προκαλέσει από τοπική επιφανειακή λοίμωξη του βλεννογόνου ή επιδερμική καντιντίαση μέχρι γενικευμένη αιματογενούς διασποράς καντινταμία η οποία μπορεί να την διασπείρει σε πολλά όργανα στόχους όπως καρδιά, ήπαρ και άλλα. Αυτή η κατάσταση είναι επικίνδυνη για την ζωή του ασθενούς και η θνησιμότητα μπορεί να αγγίξει το 50%. Παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα λοίμωξης είναι ο διαβήτης, η λοίμωξη με AIDS, τεχνητές οδοντοστοιχίες, οι θεραπείες με αντιβιοτικά, η αντινεοπλασματική θεραπεία και η ενδονοσοκομιακή νοσηλεία. Η φαρμακευτική αντιμετώπιση της *Candida albicans* συνήθως γίνεται με αζόλες (Millsop & Fazel, 2016; Tangarife-Castaño et al., 2011). Σημαντική επίσης είναι και η συνεχώς αυξανόμενη ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν διάφορα στελέχη της *Candida albicans* στους διαθέσιμους αντιμυκητιακούς παράγοντες τα τελευταία χρόνια. Επίσης έρευνες έχουν αναδείξει το τεράστιο πρόβλημα που υπάρχει με τις νοσοκομειακές λοιμώξεις ασθενών με *Candida albicans* με αύξηση των θανάτων, αύξηση των ημερών νοσηλείας, αύξηση κόστους δημοσίας υγείας. Ενδεικτικό μιας έρευνας, στην Αυστραλία μόνο υπήρξαν 4583 νοσηλείες λόγω ασπεργίλλωσης και 57.758 νοσηλείες για καντιντίαση από το 1995 έως το 1999, με αποτέλεσμα 813.398 νοσοκομειακές κλίνες, με κόστος 563 εκατομμύρια δολάρια Αυστραλίας και 4967 θανάτους (Slavin et al., 2004; Wan Ismail et al., 2020).

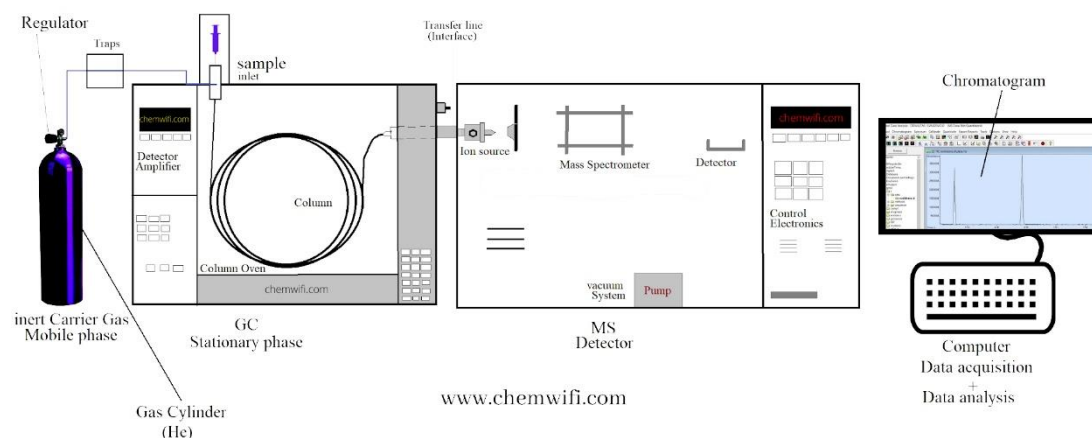
## 1.6 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των πτητικών συστατικών με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών GC-MS

Για την ανάλυση των αιθέριων ελαίων, μια μέθοδος που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο είναι η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομέτρά μαζών GC-MS. Πρόκειται για μια συνδυαστική μέθοδο. Για τον προσδιορισμό των πτητικών συστατικών χρησιμοποιείται η χρωματογραφία αέριου-υγρού. Ως στατική φάση χρησιμοποιείται το ίδιο το δείγμα, καθώς κολλάει στα τοιχώματα της στήλης και το φέρον αέριο, παρασύρει τα συστατικά μέσα από την στήλη. Εξαιτίας της τάσης ατμών των συστατικών και της συγγένειας των συστατικών με την στήλη, τα συστατικά ρέουν με διαφορετική ταχύτητα και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να έχουν και διαφορετικό χρόνο έκλουσης. Ο χρόνος αυτός είναι χαρακτηριστικός για την κάθε ουσία. Ο φασματογράφος μάζας βοηθάει στην ταυτοποίηση της ουσίας. Λόγω του ότι πολλές ουσίες εκλύονται σε παρόμοιους χρόνους, λόγω φθοράς της στήλης εξαιτίας της χρήσης, τα συστατικά εκλύονται σε μεγαλύτερους χρόνους ή σε μικρότερους. Παρά το ότι δύο συστατικά μπορεί να έχουν παρόμοιο χρόνο έκλουσης, διαφέρει ο τρόπος θραυσματοποίησης, επομένως είναι εύκολη η ταυτοποίηση (Λιοδάκης, 2001).

Τα πλεονεκτήματα της αέρια χρωματογραφίας είναι:

- εύκολη στο χειρισμό
- έχει μεγάλη ευαισθησία
- δεν απαιτεί πολύ χρόνο
- διαχωρίζει συστατικά που άλλες μέθοδοι δεν μπορούν.

### Fundamental of GC-MS (Diagram)



Εικόνα 9 . Σχηματική απεικόνιση διάταξης GS-MS. Πηγη: <https://www.chemwifi.com/>

## 1.7 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων και των παραγόμενων κατά την διαδικασία της απόσταξης ανθόνερων αυτών. Η επιλογή των φυτών των οποίων τα αιθέρια έλαια εξετάστηκαν έγινε με γνώμονα την ενδημικότητα στην Ελλάδα. Οι μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν είναι αρκετά μελετημένοι, έχουν άμεση σχέση με την ανθρώπινη υγεία, διαθέτουν διαφορετική βιολογία (ένα βακτηριακό στέλεχος αλλά και ένας μύκητας) ενώ πολύ συχνά δείχνουν εντελώς διαφορετική αντοχή σε αντιμικροβιακές ουσίες. Τέλος σε όλη την μελέτη έχει ληφθεί υπόψιν η οικονομική διάσταση του θέματος, με βάση την κυκλική οικονομία, την ρεαλιστική εφαρμογή πιθανών θετικών αποτελεσμάτων καθώς και τον οικονομικό αντίκτυπο πιθανών εφαρμογών.

## **2. Υλικά και μέθοδοι**

### **2.1.1. Υλικά μεθόδων**

- Τρυβλία Petri (90mm)
- Τετράγωνα τρυβλία petri (120 mm)
- Μικροπλάκες 96-θέσεων (96-wells microplates)
- Θρεπτικό υλικό Brain Heart Infusion Broth (CONDA)
- Θρεπτικό υλικό Sabouraud dextrose agar (NEOGEN)
- Θρεπτικό υλικό Brain Heart Infusion Agar (CONDA)
- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640 Broth medium (BIOSERA)
- Θρεπτικό υλικό Plate Count Agar (LAB M)
- Tween-20 (BDH chemicals)
- Carvacrol 98% (Sigma Aldrich)
- Χλωραμφαινικόλη (SERVA)
- Λαβίδα
- Φάκελος δημιουργίας αναερόβιων συνθήκων (Anaeroen)
- Γυάλα διατήρησης αναερόβιων συνθήκων AnaeroJar AG25
- Ρεζαζουρίνη
- Αυτόματες πιπέτες
- Ανάστροφο μικροσκόπιο
- Κυψελίδες
- Κρίκος εμβολιασμού
- Φασματοφωτόμετρο
- Microplate replicator
- Επωαστήρας

### **2.1.2 Αρχικά δείγματα**

Τα αρχικά δείγματα αποτελούνταν από αιθέρια έλαια και τα αντίστοιχα ανθόνερά τους. Τα αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- Αιθέριο έλαιο *Ρίγανης (Origanum vulgare ssp hirtum)* και το ανθόνερο αυτού.
- Αιθέριο έλαιο *Φασκόμηλου (Salvia officinalis)* και το ανθόνερο αυτού.
- Αιθέριο έλαιο *Φλισκούνη (Mentha pulegium)* και το ανθόνερο αυτού.

Η παραλαβή των αιθέριων ελαίων και των ανθόνερων από το φυτικό υλικό έγινε με την μέθοδο της ατμοαπόσταξης σε άμβυκα χωρητικότητας 200 λίτρων. Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν καλλιεργούνται στην ίδια περιοχή στην Μαγνησία στους πρόποδες του Πηλίου όρους υψομ. 60μ. Η *ρίγανη* και το *φασκόμηλο* είναι ξερικές καλλιέργειες ενώ το *φλισκούνη* ποτιζότανε 2 φορές την εβδομάδα σε περιόδους ξηρασίας. Και τα τρία βότανα συγκομίστηκαν σε πλήρη άνθηση και αποστάχθηκαν αμέσως. Η *ρίγανη* συγκομίστηκε τον Ιούλιο και αποστάχθηκε για τρεις ώρες συνεχόμενα (Zheljazkon et al., 2012). Το *Φασκόμηλο* συγκομίστηκε τον Μάιο και αποστάχθηκε για δυο ώρες συνεχόμενα (Miguel et al., 2011). Το ίδιο και για το *φλισκούνη* που συγκομίστηκε τον Σεπτέμβριο (Zheljazkon & Astatkie, 2012). Η ανάλυση της χημικής σύστασης τους έγινε από το εργαστήριο Χημείας, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου, Σχολή Επιστημών Τροφίμων και Διατροφής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Υπεύθυνος καθηγητής Πέτρος Ταραντίλης. Η ανάλυση έγινε με την μέθοδο ποιοτικού και (%) ποσοτικού προσδιορισμού των πτητικών συστατικών με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών GC-MS.

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα :

#### Ανάλυση Αιθέριο έλαιο *ρίγανης*

A/A	Συστατικό	%
1	α-πινένιο	1,9
2	μυρκένιο	2,0
3	α-τερπινένιο	1,6
4	ο-κυμένιο	11,6
5	γ-τερπινένιο	8,4
6	θυμόλη	1,8
7	καρβακρόλη	63,0
8	Z-καρνοφυλλένιο	1,9

### Ανάλυση Αιθέριο έλαιο φασκόμηλου

A/A	Συστατικό	%
1	α-πινένιο	2,9
2	καμφένιο	2,0
3	β-πινένιο	10,0
4	1,8-κινεόλη	15,8
5	α-θουγιόνη	25,1
6	β-θουγιόνη	5,0
7	καμφορά	2,9
8	βορνεόλη	5,1
9	Z-καρυοφυλλένιο	7,8
10	α-χουμουλένιο	7,8

### Ανάλυση Αιθέριο έλαιο φλισκούνι

A/A	Συστατικό	%
1	3-οκτανόλη	2,5
2	μενθόνη	7,8
3	ισομενθόνη	7,7
4	πουλεγόνη	62,1
5	πιπεριτενόνη	11,3

### Ανάλυση Ανθόνερο ρίγανης

A/A	Συστατικό	%
1	καρβακρόλη	97,3

### Ανάλυση Ανθόνερο φασκόμηλου

A/A	Συστατικό	%
1	1,8-κινεόλη	32,6
2	α-θουγιόνη	22,4
3	β-θουγιόνη	3,4
4	καμφορά	11,3
5	βορνεόλη	22,6
6	τερπινεν-4-όλη	3,0

### Ανάλυση Ανθόνερο φλισκούνι

A/A	Συστατικό	%
1	μενθόνη	2,6
2	ισομενθόνη	1,0
3	πουλεγόνη	50,6
4	πιπεριτενόνη	32,4

Πίνακας 1. Αναλύσεις GC-MS των προς εξέταση δειγμάτων.

#### 2.1.3 Μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων

Για την μελέτη των δειγμάτων υπήρξαν κάποιες προεργασίες για να αντιμετωπιστούν κάποια τεχνικά προβλήματα στην εφαρμογή των μεθόδων.

##### 2.1.3.1 Ανθόνερα

Τα ανθόνερα τα οποία λαμβάνονται από την απόσταξη των αιθέριων ελαίων είναι αδύνατο από την στιγμή που παραλαμβάνονται μέχρι και την στιγμή που θα



χρησιμοποιηθούν για την εξέταση της αντιμικροβιακής τους δράσης να βρίσκονται σε αποστειρωμένο περιβάλλον. Λόγω της πολύ μεγάλης περιεκτικότητας σε νερό και της μικρής διάλυσης σε αυτό πτητικών ενώσεων είναι πάρα πολύ πιθανό να υπάρχουν σε λανθάνουσα μορφή μικροοργανισμοί οι οποίοι θα επηρεάσουν τα αποτελέσματα των πειραμάτων. Για αυτόν ακριβώς το λόγο επιλέχθηκε και εφαρμόστηκε αποστείρωση με φιλτράρισμα από φίλτρο αποστείρωσης 0,22μm. Η μη ύπαρξη επιμολύνσεων ελέγχθηκε με απλή επίστρωση 50 μl από το κάθε φιλτραρισμένο ανθόνερο σε τρυβλία με θρεπτικό Plate count agar.

### 2.1.3.2 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια και οι ουσίες οι οποίες τα συνθέτουν είναι ελάχιστα έως καθόλου διαλυτές στο νερό. Αυτό αποτελεί πρόβλημα για την μέθοδο ελέγχου σε υγρή καλλιέργεια που ακολουθήθηκε και περιγράφεται παρακάτω. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα διαλύθηκαν τα αιθέρια έλαια στο νερό με την βοήθεια κάποιου κατάλληλου γαλακτοματοποιητή. Επιλέχθηκε το tween-20 σε αναλογία ίσα μέρη αιθέριο έλαιο με ίσα μέρη γαλακτοματοποιητή σε διάλυση σε απιονισμένο αποστειρωμένο νερό σε στείρες συνθήκες. Το tween-20 είναι πολυοξυαιθυλένο σορβιτολεστέρας που ανήκει στην οικογένεια των πολυσορβικών. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την carvacrol (καρβακρόλη)(Uludag et al., 2018).

### 2.1.4 Τελικά δείγματα προς εξέταση

- Ανθόνερα : Εφόσον φιλτραρίστηκαν με φίλτρα αποστείρωσης 0,22μm τα ανθόνερα χρησιμοποιήθηκαν αυτούσια και οι αραιώσεις γίναν στη συνέχεια με το κατά περίπτωση θρεπτικό υλικό.
- Αιθέρια έλαια : Τα διαλύματα των αιθέριων ελαίων παρασκευάστηκαν με 0,5ml από κάθε αιθέριο έλαιο με Tween-20 σε αναλογία 1:1 και διαλύθηκαν σε απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό με vortex για 5' min και έδωσαν ένα αρχικό stock διάλυμα σε συγκέντρωση 0.5% v/v. Με τον ίδιο τρόπο έγινε ένα πειραματικό διάλυμα αιθέριου ελαίου *ρίγανης* που αντικαταστάθηκε το νερό με ανθόνερο *φασκόμηλου* και *φλισκουνιού* σε αναλογία 70/30.
- Καρβακρόλη: Η αρχική καρβακρόλη διαλύθηκε σε απιονισμένο, αποστειρωμένο νερό με Tween-20 σε αναλογία 1:1 και τελική συγκέντρωση 0,315% v/v η οποία αποτελεί κατά προσέγγιση την κατ'αναλογία

συγκέντρωση της καρβακρόλης στο αιθέριο έλαιο *ρίγανης* του υπό μελέτη δείγματος. Η περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου *ρίγανης* σε καρβακρόλη σύμφωνα με την ανάλυση είναι 63% πράγμα που αντιστοιχεί σε 0,315% καρβακρόλη.  $63 \times 0,5 / 100 = 0,315\% \text{ v/v}$ .

Η καρβακρόλη ήταν της εταιρίας Sigma Aldich καθαρότητας 98%.

- Μίξη ανθόνερων: Ανθόνερο *ρίγανης*, *φασκόμηλου*, *φλισκουιού* σε αναλογία 0,6 *ρίγανη* +0,2 *φασκόμηλο* +0,2 *φλισκούνη* = 1 βασισμένη στα αρχικά αποτελέσματα της ερευνάς.

## 2.2 Πειραματικοί μέθοδοι

**2.2.1 Μέθοδος εκτίμησης της αντιμικροβιακής ικανότητας των αιθέριων ελαίων και ανθόνερων σε πλάκες μικροτιτλοποίησης (microtiter plates) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC (Minimum Inhibitory Concentration)**

### 2.2.1.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε *in vitro* για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) έγινε σε αποστειρωμένες μικροπλάκες (microplates) πολυστερίνης 96 θέσεων (Committee et al., 2003). Η MIC ορίστηκε ως η μικρότερη συγκέντρωση του εξεταζόμενου δείγματος, στην οποία δεν παρατηρείται καμιά ανάπτυξη, δηλαδή δεν παρουσιάζεται θολερότητα η οποία παρατηρείται οπτικά, ενώ η επιβεβαίωση του αποτελέσματος έγινε σε microplate reader (ELx808 Absorbance Microplate Reader, BioTek), συνδεδεμένο με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η ανάλυση των οπτικών απορροφήσεων των καλλιέργειών έγινε με το λογισμικό Gen5™ Data Analysis Software (Biotek). Στην ανάλυση των δειγμάτων των αιθέριων ελαίων, λόγω γαλακτωματοποίησης του δείγματος η MIC καθορίστηκε οπτικά με την μη ανάπτυξη θολερότητας σε σχέση με το θετικό control και επιβεβαιώθηκε με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου.

### 2.2.1.2 Πειραματική διαδικασία - *Streptococcus mutans*

Η καλλιέργεια του *Streptococcus mutans* προετοιμάστηκε χρησιμοποιώντας stock γλυκερόλης που διατηρείται στους -80°C. Το αρχικό στέλεχος του βακτηρίου ήταν ευγενική χορηγία της Κ. Λίζας Κουλαουζίδου (Καθηγήτρια Οδοντικής Χειρουργικής – Βιοϋλικών, Διευθύντρια Εργαστηρίου Βασικών Οδοντιατρικών Επιστημών ΑΠΘ). Με μικροβιολογικό κρίκο και σε αποστειρωμένο περιβάλλον λήφθηκε μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από την καλλιέργεια stock και μεταφέρθηκε σε vial που περιέχει 5 ml θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion Broth. Τα vials τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα 24 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια η καλλιέργεια

αραιώθηκε μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος θολερότητας ίση με 0.5 McFarland (περίπου  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml). Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600nm έγινε σε φασματοφωτόμετρο μέχρι να επιτευχθεί τελική τιμή 0.132 που αντιστοιχεί σε 0.5 McFarland (περίπου  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml). Ακολούθησε αραιώση 1/10 σε θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion Broth για την τελική συγκέντρωση περίπου ( $1,5 \times 10^7$  cfu /ml).

Στη συνέχεια για κάθε δείγμα ανθόνερου παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις με συγκεντρώσεις :

Συγκέντρωση ανθόνερου % v/v									
100	90	80	70	60	50	40	30	20	10

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις εξέτασης ανθόνερων - *Streptococcus mutans* .

Το πείραμα επαναλήφθηκε με αραιώσεις +10%v/v,+5% v/v, -5% v/v, -10% v/v από την τιμή MIC που βρέθηκε αρχικά για μεγαλύτερη ακρίβεια της τελικής τιμής MIC.

Για κάθε δείγμα αιθέριου ελαίου παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις με συγκεντρώσεις :

Συγκέντρωση αιθέριου ελαίου % v/v										
0,5	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0,025

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις εξέτασης αιθέριων ελαίων - *Streptococcus mutans*.

Για κάθε μίξη παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις με συγκεντρώσεις όμοιες με τις συγκεντρώσεις των ανθόνερων πλην του πειραματικού διαλύματος αιθέριου ελαίου ρίγανης που αντικαταστάθηκε το νερό με ανθόνερο φασκόμηλου και φλισκουνιού σε αναλογία 70/30 οι οποίες ήταν όμοιες με τις αραιώσεις των αιθέριων ελαίων. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την καρβακρόλη (θετικό control για τα αιθέρια ελαία). Στη πλάκα μικροτιτλοποίησης χρησιμοποιήθηκε για κάθε δείγμα ο αντίστοιχος αριθμός αραιώσεων, εις τριπλούν, στις οποίες προστέθηκαν 10μl ( $1,5 \times 10^4$  CFUs) καλλιέργειας και 190 μl από την κάθε αραιώση του εκάστοτε υπό εξέταση δείγματος. Σε 3 πηγαδάκια (θετικό control) προστέθηκαν 10μl ( $1,5 \times 10^4$  CFUs) καλλιέργειας και 190 μl Brain Heart Infusion Broth. Σε 3 πηγαδάκια (αρνητικό control) 200 μl Brain Heart Infusion Broth. Επίσης για το γαλακτοματοποιητή tween 20 υπήρξε αρνητικό και θετικό control σε 3 επαναλήψεις με προσθήκη 10μl καλλιέργειας ( $1,5 \times 10^4$  CFUs), 40μl tween-20 και 150 μl Brain Heart Infusion Broth (θετικό control) και 50μl tween-20 και 150 μl Brain Heart Infusion Broth (αρνητικό control). Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα αποτελέσματα με δυο τρόπους.

A. Για τα ανθόνερα όπου δεν υπήρχαν περιορισμοί ακολουθήθηκαν τα εξής.

Αρχικά η μικροπλάκα αφού φορτώθηκε τοποθετήθηκε στο ELx808 Absorbance Microplate Reader σε χρόνο t=0h και έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600nm. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και καταγράφηκαν από το λογισμικό Gen5™ Data Analysis Software. Στη συνέχεια η μικροπλάκα επωάστηκε στους 37 °C για 24ώρες. Μετά από την επώαση των 24 ωρών έγινε μια δεύτερη ανάγνωση από το Absorbance Microplate Reader σε χρόνο t=24h.

Οι δυο μετρήσεις συγκρίθηκαν και προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC στην οποία δεν υπήρξε βακτηριακή ανάπτυξη με βάση τα εξής: Η οπτική πυκνότητα (OD) για το κάθε πηγαδάκι προκύπτει από την αφαίρεση της μέτρησης για t=24h από τη μέτρηση για t=0h.

$$\text{OD test well} = \text{t24h test} - \text{t0h test}$$

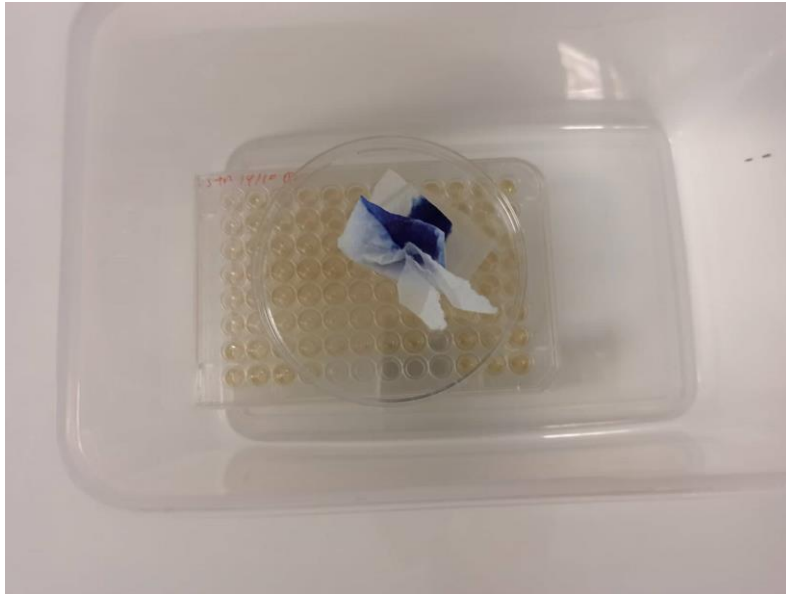
$$\text{OD of corresponding control well} = \text{t24h control} - \text{t0h control}$$

Η αναστολή της ανάπτυξης για το κάθε δείγμα και για τις 3 επαναλήψεις των αραίωσεων υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$\text{Αναστολή } 100\% = 1 - (\text{OD test well} / \text{OD of corresponding control well}) \times 100$$

- B. Για τα δείγματα που περιείχαν αιθέρια έλαια δεν ήταν δυνατή η μέτρηση με το ELx808 Absorbance Microplate Reader. Ο κύριος λόγος που δεν κατέστη αυτό δυνατό ήταν η γαλακτώδης εμφάνιση του διαλύματος που είχε σαν αποτέλεσμα την αδυναμία μέτρησης με το ELx808 Absorbance Microplate Reader. Τα αποτελέσματα μετρήθηκαν οπτικά και ενισχύθηκαν με την παρατήρηση σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC ορίστηκε η τιμή στην οποία δεν υπήρχε καμία οπτική παρατήρηση ανάπτυξης του βακτηρίου μετά την επώαση στους 37° C για 24ώρες παρατηρώντας με το ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο.

Όλες οι επωάσεις για τον *Streptococcus mutans* έγιναν σε αναερόβιες συνθήκες και χρησιμοποιήθηκε φάκελος δημιουργίας αναερόβιων συνθήκων σε ειδική ερμητικά κλειστή γυάλα που διαθέτει το εργαστήριο ειδικά για αυτό το σκοπό. Η επιτυχία της δημιουργίας αναερόβιων συνθήκων επιβεβαιώνονταν με προσθήκη απορροφητικού χαρτιού εμποτισμένου με ρεζαζουρίνη η οποία λειτουργούσε σαν δείκτης λόγω της ιδιότητας της να αλλάζει χρώμα. Κάτω από την παρουσία οξυγόνου έχει χρώμα μπλε ενώ υπό την απουσία οξυγόνου αλλάζει σε χρώμα ροζ (Tsadila et al., 2021).



Εικόνα 10. Ρεζαζουρίνη σε απορροφητικό χαρτί τοποθετημένο σε τρυβλίο για την επιβεβαίωση δημιουργίας αναερόβιων συνθήκων.

### 2.2.1.3 Πειραματική διαδικασία - *Candida albicans*.

Οι καλλιέργεια της *Candida albicans* προετοιμάστηκε χρησιμοποιώντας καλλιέργεια (glycerol stock) που διατηρείτε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Το αρχικό στέλεχος του μύκητα ήταν προσφορά του καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του ΑΠΘ Τιμολέων-Αχιλλέα Βυζαντιάδη. Η δοκιμή ευαισθησίας για την *Candida albicans* στα δείγματα πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο M27-A2 (Pfaller et al., 2002) με ορισμένες τροποποιήσεις. Με μικροβιολογικό κρίκο και σε αποστειρωμένο περιβάλλον λήφθηκε μια μικρή ποσότητα μύκητα από την καλλιέργεια stock και μεταφέρθηκε σε τρυβλία με Sabouraud dextrose agar, με χλωραμφαινικόλη (chloramphenicol) είναι αντιβιοτικό ευρέος φάσματος με άριστη διεισδυτικότητα που παρουσιάζει βακτηριοστατική δράση κυρίως κατά των αρνητικών κατά Gram, των θετικών κατά Gram βακτηρίων για την αποφυγή βακτηριών επιμολύνσεων. Η χλωραμφαινικόλη η οποία ήταν σε αιθανολικό stock διάλυμα  $25\text{mg/ml}$  προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό σε τελική συγκέντρωση  $50\mu\text{g/ml}$ . Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα 24 ώρες στους  $35^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια με μικροβιολογικό κρίκο συλλέχθηκαν 5 αποικίες και αραιώθηκαν σε vial που περιέχει 5 ml saline 0.85%v/v μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος θολερότητας ίση με 0.5 McFarland. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα  $530\text{nm}$  έγινε σε φασματοφωτόμετρο μέχρι να επιτευχθεί τελική τιμή 0.132 που αντιστοιχεί σε 0.5 McFarland (περίπου  $1-5 \times 10^6$  cfu/ml). Ακολούθησε αραιώση 1/20 σε θρεπτικό υπόστρωμα RPMI 1640 Broth medium για την τελική συγκέντρωση περίπου ( $2,5 \times 10^5$  cfu/ml).

Στη συνέχεια για κάθε δείγμα ανθόνερου παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις με συγκεντρώσεις :

Συγκέντρωση ανθόνερου % v/v									
100	90	80	70	60	50	40	30	20	10

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις εξέτασης ανθόνερων - *Candida albicans*.

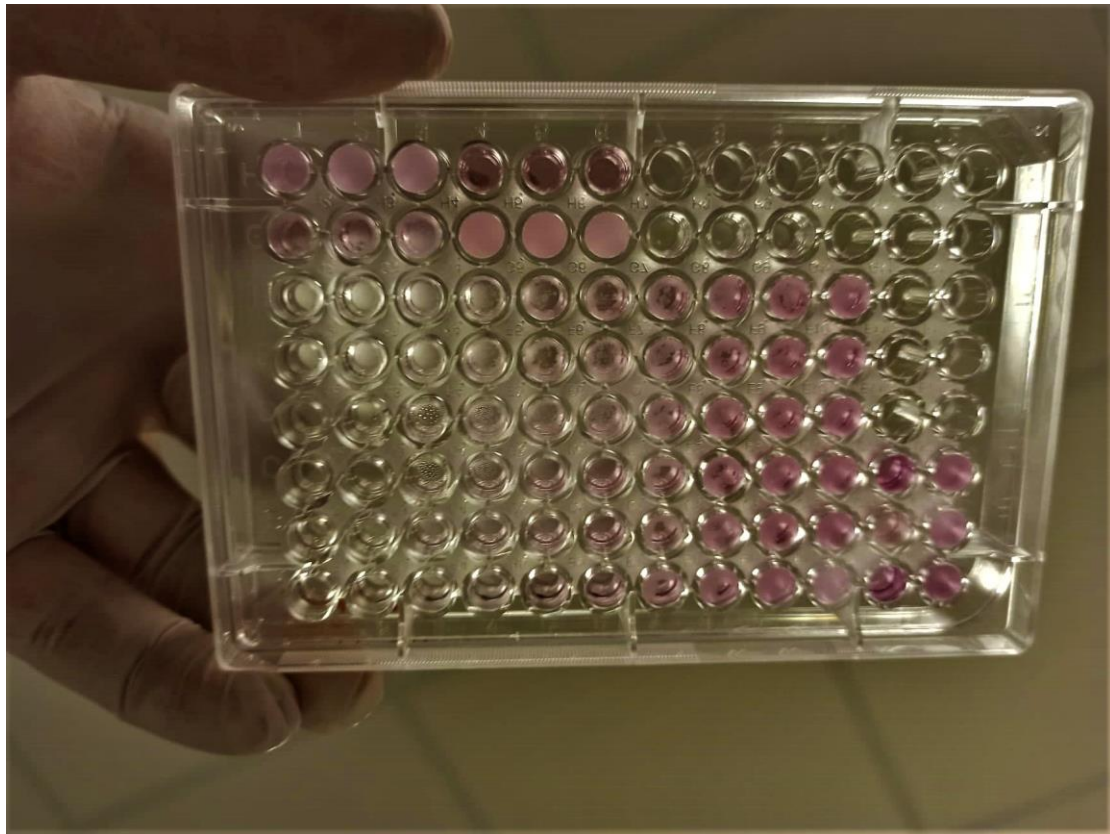
Το πείραμα επαναλήφθηκε με αραιώσεις +10%v/v,+5% v/v, -5% v/v, -10% v/v από την τιμή MIC που βρέθηκε αρχικά για μεγαλύτερη ακρίβεια της τελικής τιμής MIC.

Για κάθε δείγμα αιθέριου ελαίου παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις με συγκεντρώσεις :

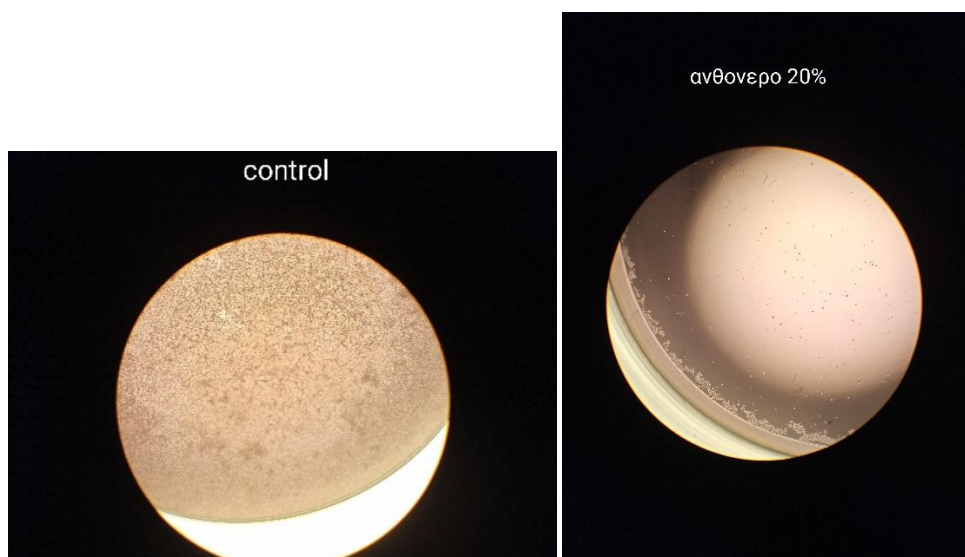
Συγκέντρωση αιθέριου ελαίου % v/v										
0,5	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0,025

Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις εξέτασης αιθέριων ελαίων - *Candida albicans*.

Για κάθε μίξη παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις με συγκεντρώσεις όμοιες με τις συγκεντρώσεις των ανθόνερων πλην των μιγμάτων με την περιεκτικότητα αιθέριου ελαίου οι οποίες ήταν όμοιες με τις αραιώσεις των αιθέριων ελαίων. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την καρβακρόλη (θετικό control για τα αιθέρια ελαία). Στη πλάκα μικροτιτλοποίησης χρησιμοποιήθηκε για κάθε δείγμα ο αντίστοιχος αριθμός αραιώσεων, εις τριπλούν στις οποίες προστέθηκαν 10μl ( $2,5 \times 10^3$  CFUs) καλλιέργειας και 190 μl από την κάθε αραιώση του εκάστοτε υπό εξέταση δείγματος. Σε 3 πηγαδάκια (θετικό control) προστέθηκαν 10μl ( $2,5 \times 10^3$  CFUs) καλλιέργειας και 190μl RPMI Broth medium. Σε 3 πηγαδάκια (αρνητικό control) 200 μl RPMI Broth medium. Επίσης για το γαλακτοματοποιητή tween-20 υπήρξε αρνητικό και θετικό control σε 3 επαναλήψεις με προσθηκη 10μl ( $2,5 \times 10^3$  CFUs) καλλιέργειας 40μl tween-20 και 150 μl RPMI 1640 Broth medium (θετικό control) και 50μl tween-20 και 150 μl RPMI 1640 Broth medium (αρνητικό control). Στη συνέχεια η μικροπλάκα επώαστηκε στους 35° C για 48 ώρες. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα μετρήθηκαν οπτικά και ενισχύθηκαν με την παρατήρηση σε ανάστροφο οπτικό μικροσκόπιο.



Εικόνα 11. Microtiter plate όπου διακρίνονται οπτικά τα (πηγαδάκια) στα οποία υπάρχει ανάπτυξη της *Candida albicans*.



α) εικόνα θετικού control ανάπτυξης

β) εικόνα ανάπτυξης σε τιμή μικρότερη της MIC στο ανθόνερο *ρίγανης*

Εικόνα 12 . Φωτογραφία μέσα από το ανάστροφο μικροσκόπιο microtiter plate ανάπτυξης *Candida albicans*.



**2.2.2 Μέθοδος εκτίμησης της αντιμικροβιακής ικανότητας των αιθέριων ελαίων και των ανθόνερων μέσω μικροτιτλοποίησης (microtiter plates) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης MBC (Minimum Bactericidal Concentration) και ελάχιστης μυκητοκτόνου συγκέντρωσης MFC (Minimum Fungicidal Concentration)**

### **2.2.2.1 Αρχή της μεθόδου**

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε *in vitro* για τον προσδιορισμό της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) και ελάχιστης μυκητοκτόνου συγκέντρωσης (MFC) έγινε σε αποστειρωμένες μικροπλάκες (microplates) πολυστερίνης 96 θέσεων και εν συνέχεια ακολούθησε μεταφορά μιας μικρής ποσότητας δείγματος από κάθε θέση (πηγαδάκι) σε τετράγωνα τρυβλία 120mm με κατάλληλο θρεπτικό άγαρ με την βοήθεια microplate replicator (BoeckelScientific, Pennsylvania,USA). Η MBC και MFC τιμή προσδιορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του προς εξέταση δείγματος στην οποία δεν παρατηρήθηκαν αναπτυσσόμενες αποικίες (Tsavea & Mossialos, 2019).



Εικόνα 13. microplate replicator

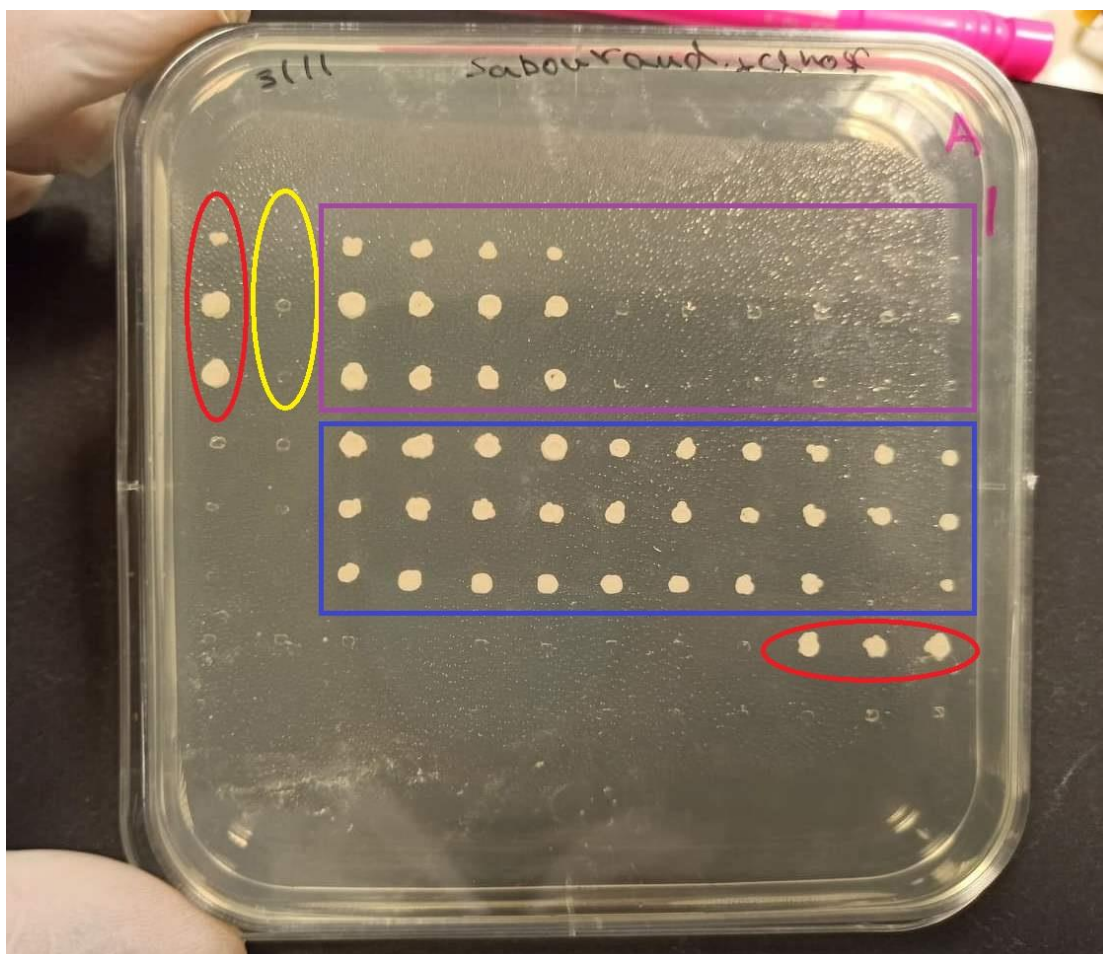
### **2.2.2.2 Πειραματική διαδικασία MBC - *Streptococcus mutans***

Στο τέλος της διαδικασίας προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), μετά την επώαση των 24 ωρών, με την βοήθεια ενός microplate replicator μεταφέρθηκε μια μικρή ποσότητα δείγματος από όλα τα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης σε τετράγωνα τρυβλία των 120mm που περιέχουν Brain Heart Infusion Agar. Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37°C

για 24 ώρες υπό αναερόβιες συνθήκες και έπειτα παρατηρήθηκε η εμφάνιση αποικιών στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία δεν υπήρξε ανάπτυξη βακτηρίων (θανάτωση) καθορίστηκε ως MBC.

### 2.2.2.3 Πειραματική διαδικασία MFC - *Candida albicans*

Στο τέλος της διαδικασίας προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), μετά την επώαση των 48 ωρών, με την βοήθεια ενός microplate replicator μεταφέρθηκε μια μικρή ποσότητα δείγματος από όλα τα πηγαδάκια της πλάκας μικροτιτλοποίησης σε τετράγωνα τρυβλία των 120mm που περιείχαν Sabouraud dextrose agar με χλωραμφαινικόλη (cloramphenicol) για την αποφυγή βακτηριών επιμολύνσεων. Στη συνέχεια τα τρυβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 35°C για 48 ώρες και έπειτα παρατηρήθηκε η εμφάνιση αποικιών στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία δεν υπήρξε ανάπτυξη μυκήτων (θανάτωση) καθορίστηκε ως MFC.



Εικόνα 14. Τρυβλίο 120mm με εφαρμογή της ελάχιστης μυκητοκτόνου δράσης MFC.

Στην εικόνα 14 φαίνονται τα αποτελέσματα από την εφαρμογή του microplate replicator σε ένα τετράγωνο τρυβλίο 120mm. Με κόκκινο κύκλο ορίζεται το θετικό control ανάπτυξης της *Candida albicans*, στον κίτρινο το αρνητικό control που επιβεβαιώνει ότι δεν υπήρξε επιμόλυνση και από δεξιά προς τα αριστερά μειούμενες οι συγκεντρώσεις των υπό εξέταση δειγμάτων σε τρεις επαναλήψεις. Στο πάνω δείγμα με το ροζ χρώμα είναι ξεκάθαρο ότι επιτυγχάνετε ελάχιστη μυκητοκτόνος δράση MFC στην έκτη κατά σειρά συγκέντρωση. Στο δεύτερο δείγμα με μπλε χρώμα φαίνεται ότι δεν υπάρχει αντιμυκητιακή δράση MFC.

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC και ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης MBC για το βακτήριο *Streptococcus mutans*.

Με τη μέθοδο της μικροτιτλοποίησης προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση των ανθόνερων, των αιθέριων ελαίων και των μειγμάτων αυτών που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης του *Streptococcus mutans*. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης για να καθοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται για τη θανάτωση του *Streptococcus mutans*. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πίνακες 6 και 7 με τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης MBC.

Όπως φαίνεται στα αποτελέσματα για τις αραιώσεις με τα ανθόνερα εντοπίστηκε μια αξιοσημείωτη τιμή MIC της τάξης του 25% v/v καθώς και τιμή MBC 35% v/v για το ανθόνερο της *ρίγανης* σε αντίθεση με τα άλλα δυο δοκιμαζόμενα ανθόνερα τα οποία δεν κατάφεραν να αναστείλουν την ανάπτυξη του *Streptococcus mutans*. Το δείγμα με την ανάμιξη ανθόνερου *ρίγανης* 60%, ανθόνερου *φασκόμηλου* 20% και ανθόνερου *φλισκούνη* 20% έδωσε την αναμενομένη κατά προσέγγιση σύμφωνα με τη συγκέντρωση του ανθόνερου *ρίγανης* τιμή MIC και MBC η οποία ήταν 60% v/v.

*Streptococcus mutans* MIC και MBC, ανθόνερα.

Δείγματα	MIC Σε συγκέντρωση %v/v	MBC Σε συγκέντρωση %v/v
Ανθόνερο <i>Origanum vulgare hirtum</i>	25%	35%
Ανθόνερο <i>Salvia officinalis</i>	Δεν υπήρξε αναστολή.	Δεν υπήρξε θανάτωση.
Ανθόνερο <i>Mentha pulegium</i>	Δεν υπήρξε αναστολή.	Δεν υπήρξε θανάτωση.
Μείγμα ανθόνερων ΡΦΦ	60%	60%

Πίνακας 6. Αποτελέσματα MIC και MBC *Streptococcus mutans* για τα ανθόνερα.

Η εικόνα είναι εντελώς διαφορετική για τις αραιώσεις των αιθέριων ελαίων όπου σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις εμφανίζεται και MIC και MBC και για τα τρία αιθέρια έλαια. Και σε αυτή την περίπτωση όμως το αιθέριο έλαιο της *ρίγανης* έχει επιτύχει τις καλύτερες τιμές MIC και MBC με μόλις 0,05% v/v ενώ ακολουθεί το

αιθέριο έλαιο του *φασκόμηλου* με 5 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση τιμή MIC 0,25% v/v και 7 φορές μεγαλύτερη τιμή συγκέντρωσης MBC. Το αιθέριο έλαιο *φλισκούνη* κατάφερε να αναστείλει και να θανατώσει το *Streptococcus mutans* σε αρκετά μεγαλύτερη τιμή συγκέντρωσης 0,45% v/v. Η καρβακρόλη έδειξε να συμβαδίζει με το αιθέριο έλαιο *ρίγανης* με τιμή συγκέντρωσης MIC και MBC 0,0315% v/v που αντιστοιχεί κατά προσέγγιση στην περιεκτικότητα καρβακρόλης του αιθέριου ελαίου *ρίγανης* που δοκιμάστηκε. Τέλος στην μίξη αιθέριου ελαίου *ρίγανης* με ανθόνερα φάνηκε να μην επηρεάζεται η δράση του αιθέριου ελαίου ούτε αρνητικά ούτε θετικά.

*Streptococcus mutans* MIC και MBC, αιθέρια έλαια.

Δείγματα	MIC Σε συγκέντρωση %v/v	MBC Σε συγκέντρωση %v/v
Αιθέριο έλαιο <i>Origanum vulgare hirtum</i>	0,05%	0,05%
Αιθέριο έλαιο <i>Salvia officinalis</i>	0,25%	0,35%
Αιθέριο έλαιο <i>Mentha pulegium</i>	0,45%	0,45%
Carvacrol	0.0315%	0.0315%
Αιθέριο έλαιο <i>Origanum vulgare hirtum</i> σε διάλυμα ανθόνερών 70/30 φασ./φλισκ.	0,05%	0,05%

Πίνακας 7. Αποτελέσματα MIC και MBC *Streptococcus mutans* για τα αιθέρια έλαια.

### 3.2 Αποτελέσματα ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC και ελάχιστης μυκητοκτόνου συγκέντρωσης MFC για τον μύκητα *Candida albicans*.

Με τη μέθοδο της μικροτιτλοποίησης προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση των ανθόνερων, των αιθέριων ελαίων και των μίξεων αυτών που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης της *Candida albicans*. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της ελάχιστης μυκητοκτόνου συγκέντρωσης και καθορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται για τη θανάτωση της *Candida albicans*. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πίνακες 8 και 9 με τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC και της ελάχιστης μυκητοκτόνου συγκέντρωσης MFC.

Όπως διαπιστώθηκε για τις αραιώσεις με τα ανθόνερα τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με τη περίπτωση του *Streptococcus mutans*. Και στην περίπτωση του μύκητα *Candida albicans* το ανθόνερο *ρίγανης* ήταν το μόνο που εμφάνισε αξιοσημείωτες τιμές MIC και MFC στη συγκέντρωση 35% v/v και με μόνη διαφορά ότι στην περίπτωση του μύκητα οι δυο τιμές συμπίπτουν. Τα ανθόνερα από το *φλισκούνη*

και από το *φασκόμηλο* δεν κατάφεραν και σε αυτή την περίπτωση να πετύχουν αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα. Το δείγμα με την ανάμιξη ανθόνερου *ρίγανης* 60%, ανθόνερου *φασκόμηλου* 20% και ανθόνερου *φλισκούνη* 20% έδωσε την αναμενομένη σύμφωνα με τη συγκέντρωση του ανθόνερου *ρίγανης* τιμή MIC και MBC η οποία ήταν 60% v/v.

*Candida albicans* MIC και MFC, ανθόνερα.

Δείγματα	MIC Σε συγκέντρωση %v/v	MFC Σε συγκέντρωση %v/v
Ανθόνερο <i>Origanum vulgare hirtum</i>	35%	35%
Ανθόνερο <i>Salvia officinalis</i>	Δεν υπήρξε αναστολή.	Δεν υπήρξε θανάτωση.
Ανθόνερο <i>Mentha pulegium</i>	Δεν υπήρξε αναστολή.	Δεν υπήρξε θανάτωση.
Μείγμα ανθόνερων ΡΦΦ	60%	60%

Πίνακας 8. Αποτελέσματα MIC και MBC *Candida albicans* για τα ανθόνερα.

Η εικόνα είναι εντελώς διαφορετική για τις αραιώσεις των αιθέριων ελαίων όπου σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις διαπιστώθηκε και MIC και MBC και για τα τρία αιθέρια έλαια. Και σε αυτή την περίπτωση όμως το αιθέριο έλαιο της *ρίγανης* εμφάνισε τις χαμηλότερες τιμές MIC και MBC με μόλις 0,05% v/v μια τιμή η οποία συμπίπτει και με τα αποτελέσματα στο *Streptococcus mutans*. Ένα σημαντικό εύρημα ήταν ότι παρατηρήθηκε αναστροφή της αντιμικροβιακής δράσης των άλλων δυο αιθέριων ελαίων σε σχέση με την αντιμικροβιακή δράση που εμφάνισαν στο *Streptococcus mutans* με το αιθέριο έλαιο από το *φλισκούνη* αυτή τη φορά να πετυχαίνει καλύτερα αποτελέσματα από αιθέριο έλαιο *φασκόμηλο*. Έτσι μετά την πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ενάντια της *Candida albicans*, του αιθέριου ελαίου *ρίγανης*, την αμέσως επόμενη πιο ισχυρή δράση πέτυχε το αιθέριο έλαιο *φλισκούνη* με τιμή MIC η οποία συμπίπτει και με την τιμή MFC στη συγκέντρωση 0,25% v/v. Το αιθέριο έλαιο από το *φασκόμηλο* έδειξε την μικρότερη δράση με τιμή MIC στη συγκέντρωση 0,40% v/v ενώ δεν κατάφερε να επιτύχει την θανάτωση της *Candida albicans*, μέχρι την συγκέντρωση που εξετάστηκε. Η καρβακρόλη έδειξε να συμβαδίζει με το αιθέριο έλαιο *ρίγανης* με τιμή συγκέντρωσης MIC και MFC 0,0315% v/v που αντιστοιχεί κατά προσέγγιση στην περιεκτικότητα καρβακρόλης του αιθέριου ελαίου *ρίγανης* που δοκιμάστηκε. Τέλος και στην περίπτωση του μύκητα η μίξη αιθέριου ελαίου *ρίγανης* με ανθόνερα φάνηκε να μην επηρεάζει την δράση του αιθέριου ελαίου ούτε αρνητικά ούτε θετικά.

*Candida albicans* MIC και MFC, αιθέρια έλαια.

Δείγματα	MIC Σε συγκέντρωση %v/v	MFC Σε συγκέντρωση %v/v
Αιθέριο έλαιο <i>Origanum vulgare hirtum</i>	0,05%	0,05%
Αιθέριο έλαιο <i>Salvia officinalis</i>	0,40%	Δεν κατάφερε θανάτωση του μύκητα μέχρι την μεγίστη τιμή που εξετάσαμε 0,5% v/v MBC>0.5%v/v
Αιθέριο έλαιο <i>Mentha pulegium</i>	0,25%	0,25%
Carvacrol	0.0315%	0.1315%
Αιθέριο έλαιο <i>Origanum vulgare hirtum</i> σε διάλυμα ανθόνερών 70/30 φασ./φλισκ.	0,05%	0,05%

Πίνακας 9. Αποτελέσματα MIC και MBC *Candida albicans* για τα αιθέρια ελαία.

## 4. Συζήτηση

Η προσπάθεια εύρεσης νέων αντιμικροβιακών παραγόντων είτε για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά (Dhasarathan et al., 2021; Meyer et al., 2013) είτε της αναζήτησης ουσιών με λιγότερες παρενέργειες είναι συνεχής στις μέρες μας (Cunha, 2001; Kyriakidis et al., 2017). Τα αιθέρια έλαια έχουν προταθεί για πολλές εφαρμογές όπως αντιμυκητιακά, μετασυλλεκτικά συντηρητικά, έναντι φυτοπαθογόνων βακτηρίων, ως συντηρητικά τροφίμων και ακόμη και ως δραστικές ενώσεις για ενεργές συσκευασίες (Božik et al., 2017; Pandey et al., 2017; Pola et al., 2016). Στην παρούσα εργασία επιβεβαιώθηκε αυτή η δράση των αιθέριων ελαίων και μάλιστα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Αυτό δίνει εξαιρετικές προοπτικές για εφαρμογή των αιθέριων ελαίων σε μεγάλης κλίμακας εφαρμογές, καθώς οι συγκεντρώσεις από 0,05% v/v έως 0,45% v/v βακτηριοκτόνου δράσης των αιθέριων ελαίων που εξετάστηκαν αποτελούν μια πολύ ρεαλιστική προσέγγιση για δυνητικές εφαρμογές στην βιομηχανία, την αγροδιατροφή και την υγεία. Αναφέρεται ως ρεαλιστική προσέγγιση γιατί πρέπει να ληφθεί υπόψιν η τιμή πώλησης αυτών των αιθέριων ελαίων, η διαθεσιμότητα από πλευράς παραγωγής και η δυνατότητα συνεχούς παραγωγής των κατάλληλων αιθέριων ελαίων καθώς πρόκειται για ένα προϊόν γεωργίας. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση της αντιμυκητιακής δράσης όπου οι συγκεντρώσεις που επιτεύχθηκαν ήταν η ελάχιστη μυκητοκτόνη δράση από 0,05% v/v έως 0,25% v/v για τα αιθέρια ελαία της *ρίγανης* και του *φλισκουνιού* ενώ αν και το αιθέριο έλαιο *φασκόμηλο* δεν έδειξε ελάχιστη μυκητοκτόνη δράση στις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκε, κατάφερε να αναστείλει την ανάπτυξη της *Candida albicans*. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι την πιο ισχυρή δράση την έχει το αιθέριο έλαιο *ρίγανης*. Η αντιμικροβιακή δράση της *ρίγανης* έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια σε αρκετές μελέτες (Chouhan et al., 2017; Lu et al., 2018; P. Pozzatti et al., 2008) να υποδεικνύουν και αντιβακτηριακή δράση αλλά και αντιμυκητιακή ενώ φαίνεται να έχει την πλέον ισχυρή δράση ανάμεσα σε αρκετά μελετημένα αιθέρια έλαια (Krol et al., 2019). Σε προηγούμενη μελέτη που έγινε εξετάζοντας την αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου *ρίγανης* με συγκρίσιμη συγκέντρωση της κύριας δραστικής ουσίας (64.86 % καρβακρόλη) ως προς την σύνθεση του αιθέριου ελαίου (63% καρβακρόλη) ενάντια σε ένα στέλεχος *Staphylococcus aureus* ανθεκτικό στη μεθικιλίνη διαπιστώθηκε και σε αυτήν την περίπτωση ισχυρή αντιμικροβιακή δράση με MIC και MBC 0,4 mg / mL. Επιπλέον σε αυτή την μελέτη έγινε μια προσέγγιση για τον τρόπο δράσης του αιθέριου ελαίου *ρίγανης* η οποία έδειξε επίδραση στην διαπερατότητα του κυτταρικής μεμβράνης προκαλώντας μη αναστρέψιμη βλάβη καθώς και πιθανή επίδραση στον μεταβολισμό του κυττάρου μέσω επίδρασης στους μεταβολίτες και στα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος (Cui et al., 2019). Ακόμα έρευνα για τον πιθανό τρόπο δράσης της κύριας δραστικής ουσίας του αιθέριου ελαίου *ρίγανης*, της



καρβακρόλης ενάντια στελέχη *Candida albicans* έδειξε πιθανή δράση ενάντια στο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου το οποίο οδηγεί σε απόπτωση (Chaillot et al., 2015). Περεταίρω έρευνα χρειάζεται ωστόσο καθώς ο ακριβής μηχανισμός δράσης των κύριων δραστικών ουσιών δεν είναι ξεκάθαρος ούτε στο αιθέριο έλαιο *ρίγανης* ούτε ιδιαίτερα στα αιθέρια έλαια *φασκόμηλου* και *φλισκούνη* όπου οι έρευνες που έχουν διεξαχθεί είναι λιγότερες. Το χαρακτηριστικό του αιθέριου ελαίου *ρίγανης* να επιτυγχάνει ταυτόχρονα και σε πολύ μικρή συγκέντρωση και αντιβακτηριδιακή δράση και αντιμυκητιακή δίνει μεγάλο πλεονέκτημα έναντί των άλλων δυο αιθέρων ελαίων που εξετάστηκαν. Χαρακτηριστικό είναι ότι το αιθέριο έλαιο *φασκόμηλο* είχε πολύ πιο ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση και μικρή αντιμυκητιακή κάτι το οποίο συμφωνεί και με προηγούμενες έρευνες στις οποίες το αιθέριο έλαιο *φασκόμηλου* είχε χαμηλή αντιμυκητιακή δράση (P. Pozzatti et al., 2010; P. Pozzatti et al., 2008) ενώ το ακριβώς αντίθετο συνέβη με το αιθέριο έλαιο *φλισκούνη* το οποίο επίσης έχει δειχτεί σε προηγούμενη ερεύνα η αντιμυκητιακή δράση του να είναι συνυφασμένη με την κυρία δραστική ουσία πουλεγόνη(Oumzil et al., 2002).

Τα ανθόνερα αν και θεωρούνται ως παραπροϊόντα της διαδικασίας απόσταξης διαθέτουν ενεργά συστατικά που τους προσδίδουν αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Ασίμονιό et al., 2020; Politi et al., 2020). Εφόσον μετατραπούν αυτά τα παραπροϊόντα σε μια κερδοφόρα εφαρμογή, προκύπτουν δύο οφέλη. Αφενός το διαχειριστικό κόστος των απορριφθέντων υγρών και αφετέρου το κέρδος από την εμπορική εφαρμογή του προϊόντος. Στην έρευνα αυτή διαπιστώθηκε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση από το ανθόνερο *ρίγανης* με 35% v/v MBC και MFC. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αρκετά ελπιδοφόρα αν αναλογιστούμε το γεγονός ότι στο ανθόνερο βρίσκετε μια μικρή ποσότητα διαλυμένων δραστικών ουσιών. Μια πολύ σημαντική διαπίστωση επίσης είναι ότι από την ανάλυση του ανθόνερου *ρίγανης* διαπιστώθηκε ότι το 97.3% των ουσιών που υπάρχουν διαλυμένες στο ανθόνερο *ρίγανης* είναι η καρβακρόλη. Ο συνδυασμός περιορισμένης χημικής πολυπλοκότητας με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κάνει την οποία προσπάθεια εφαρμογής του ανθόνερου *ρίγανης* πολύ πιο εύκολη. Τα άλλα δυο ανθόνερα δεν κατάφεραν να αναστείλουν την ανάπτυξη των προς εξέταση μικροοργανισμών. Ωστόσο η μίξη που δημιουργήσαμε με 60% ανθόνερο *ρίγανης* 20% ανθόνερο *φασκόμηλου* και 20% δεν επηρέασε την αντιμικροβιακή απόδοση που αναμέναμε από το ανθόνερο της *ρίγανης*.

Εν κατακλείδι το συμπέρασμα που πηγάζει από τα αποτελέσματα είναι ότι τα αιθέρια έλαια έχουν σημαντική αντιμικροβιακή δράση. Ένας παράγοντας ωστόσο που επηρεάζει αρνητικά την καθολική εφαρμογή των αποτελεσμάτων τέτοιον μελετών είναι η πολύ σημαντική παραλλακτικότητα της σύνθεσης των αιθέρων ελαίων. Για αυτό το λόγο θα πρέπει να δοθεί πολύ μεγάλη σημασία στη μελέτη ξεχωριστά των ουσιών που απαρτίζουν τα αιθέρια έλαια καθώς και στον ακριβή τρόπο δράσης αυτών των ουσιών. Για παράδειγμα στην περίπτωση της *ρίγανης*

υπάρχουν τρεις διαφορετικοί χημειότυποι : καρβακρόλης-θυμολης, θυμόλης και καρβακρόλης(Fleisher & Sneer, 1982). Θα πρέπει λοιπόν να εξεταστεί ποιος χημειότυπος δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα καθώς και σε ποια ουσία η ποιες ουσίες οφείλτε η δράση του. Η ελληνική βιοποικιλότητα μας έχει χαρίσει απλόχερα την πρώτη ύλη την οποία εμείς μέσα από έρευνα μπορούμε να μετουσιώσουμε σε πραγματικά χρήσιμες, φιλικές προς το περιβάλλον και τον άνθρωπο εφαρμογές.

## Βιβλιογραφία

- Aćimović, M., Tešević, V., Smiljanić, K., Cvetković, M., Stanković, J., Kiprovski, B., & Sikora, V. (2020). Hydrolates: By-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses. *Advanced Technologies*, *9*(2), 54–70. <https://doi.org/10.5937/savteh2002054a>
- Anand, S. P., & Sati, N. (2013). Artificial Preservatives and Their Harmful Effects: Looking Toward Nature for Safer Alternatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research IJPSR*, *4*(7), 2496–2501. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4\(7\).24960-01](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4(7).24960-01)
- Božik, M., Císarová, M., Tančinová, D., Kouřimská, L., Hleba, L., & Klouček, P. (2017). Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus* spp. in oats with improved consumer acceptability. *Industrial Crops and Products*, *98*, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.044>
- Chaillot, J., Tebbji, F., Remmal, A., Boone, C., Brown, G. W., Bellaoui, M., & Sellam, A. (2015). The monoterpene carvacrol generates endoplasmic reticulum stress in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(8), 4584–4592. <https://doi.org/10.1128/AAC.00551-15>
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, *4*(3), 58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>
- Committee, E., Testing, S., Microbiology, C., & Escmid, I. D. (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, *9*(8), ix–xv. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>
- Cui, H., Zhang, C., Li, C., & Lin, L. (2019). Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Industrial Crops and Products*, *139*(May), 111498. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111498>
- Cunha, B. A. (2001). ANTIBIOTIC SIDE EFFECTS. *Medical Clinics of North America*, *85*(1), 149–185. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(05\)70309-6](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(05)70309-6)
- Dhasarathan, P., Alsalhi, M. S., Devanesan, S., Subbiah, J., Ranjitsingh, A. J. A., Binsalah, M., & Alfuraydi, A. A. (2021). Journal of Infection and Public Health Drug resistance in *Candida albicans* isolates and related changes in the structural domain of Mdr1 protein. *Journal of Infection and Public Health*, *14*(12), 1848–1853. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.11.002>
- Fleisher, A., & Sneer, N. (1982). Oregano spices and *Origanum* chemotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *33*(5), 441–446.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740330508>

- Forssten, S. D., Björklund, M., & Ouwehand, A. C. (2010). Streptococcus mutans, caries and simulation models. *Nutrients*, 2(3), 290–298. <https://doi.org/10.3390/nu2030290>
- Kanakis, C. D., Petrakis, E. A., Kimbaris, A. C., Pappas, C., Tarantilis, P. A., & Polissiou, M. G. (2012). Classification of Greek Mentha pulegium L. (Pennyroyal) Samples, According to Geographical Location by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Phytochemical Analysis*, 23(1), 34–43. <https://doi.org/10.1002/PCA.1322>
- Kastenbom, L., Falsen, A., Larsson, P., Sunnegårdh-Grönberg, K., & Davidson, T. (2019). Costs and health-related quality of life in relation to caries. *BMC Oral Health*, 19(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0874-6>
- Król, B., Kołodziej, B., Kędzia, B., Hołderna-Kędzia, E., Sugier, D., & Luchowska, K. (2019). Date of harvesting affects yields and quality of Origanum vulgare ssp. hirtum (Link) letsvaart. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(12), 5432–5443. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9805>
- Kyriakidis, I., Tragiannidis, A., München, S., & Andreas, H. (2017). Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents. In *Expert Opinion on Drug Safety* (Vol. 0, Issue 0). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1270264>
- Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., Abranches, J., & Brady, L. J. (2019). The Biology of Streptococcus mutans. *Microbiology Spectrum*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0051-2018>
- Lincoln, T., & Zeiger, E. (2012). ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ (πέμπτη Αμε). Utopia.
- Lu, M., Dai, T., Murray, C. K., & Wu, M. X. (2018). Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02329>
- Luís, Â., & Domingues, F. (2021). Screening of the potential bioactivities of pennyroyal (Mentha pulegium L.) essential oil. *Antibiotics*, 10(10), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101266>
- Meyer, E., Gastmeier, P., Deja, M., & Schwab, F. (2013). International Journal of Medical Microbiology Antibiotic consumption and resistance : Data from Europe and Germany. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.04.004>
- Miguel, G., Cruz, C., Faleiro, M. L., Simões, M. T. F., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2011). Salvia officinalis L. essential oils: effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Product Research*, 25(5), 526–541. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.499513>

- Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology*, 34(4), 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.022>
- Murray, P. R. (n.d.). *ΙΑΤΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ* (N. A. Μαλισιοβας (ed.); 6 έκδοση). Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε.
- Oumzil, H., Ghouлами, S., Rhajaoui, M., Ildrissi, A., Fkih-Tetouani, S., Paid, M., & Benjouad, A. (2002). Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils of *Mentha suaveolens*. *Phytotherapy Research*, 16(8), 727–731. <https://doi.org/10.1002/ptr.1045>
- Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., & Bajpai, V. K. (2017). Essential oils: Sources of antimicrobials and food preservatives. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN), 2161. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.02161/BIBTEX>
- Pfaller, M. A., Haturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M. A., Gosey, L. L., Odds, F. C., Rex, J. H., Rinaldi, M. G., Sheehan, D. J., Walsh, T. J., & Warnock, D. W. (2002). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts ; Approved Standard — Second Edition Serving the World ' s Medical Science Community Through Voluntary Consensus* (Vol. 22, Issue 15).
- Pola, C. C., Medeiros, E. A. A., Pereira, O. L., Souza, V. G. L., Otoni, C. G., Camilloto, G. P., & Soares, N. F. F. (2016). Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. *Food Packaging and Shelf Life*, 9, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.07.001>
- Politi, M., Menghini, L., Conti, B., Bedini, S., Farina, P., Cioni, P. L., Braca, A., & De Leo, M. (2020). Reconsidering Hydrosols as Main Products of Aromatic Plants Manufactory: The Lavandin (*Lavandula × intermedia*) Case Study in Tuscany. *Molecules*, 25(9). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25092225>
- Pozzatti, P., Loreto, É. S., Nunes Mario, D. A., Rossato, L., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2010). Inhibition de la formation de tube germinatif de *Candida albicans* et de *Candida dubliniensis* par diverses huiles essentielles. *Journal de Mycologie Medicale*, 20(3), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2010.06.003>
- Pozzatti, Patrícia, Scheid, L. A., Spader, T. B., Atayde, M. L., Santurio, J. M., & Alves, S. H. (2008). In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(11), 950–956. <https://doi.org/10.1139/W08-097>
- Sharma, S. (2015). Food Preservatives and their Harmfull Effect. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 5(4), 5–6. [www.ijsrp.org](http://www.ijsrp.org)
- Slavin, M., Fastenau, J., Sukarom, I., Mavros, P., Crowley, S., & Gerth, W. C. (2004). Burden of hospitalization of patients with *Candida* and *Aspergillus* infections in Australia. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(2), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.05.001>

- Tangarife-Castaño, V., Correa-Royero, J., Zapata-Londoño, B., Durán, C., Stanshenko, E., & Mesa-Arango, A. C. (2011). Anti-Candida albicans activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. *Infectio*, *15*(3), 160–167. [https://doi.org/10.1016/s0123-9392\(11\)70080-7](https://doi.org/10.1016/s0123-9392(11)70080-7)
- Tsadila, C., Nikolaidis, M., Dimitriou, T. G., Kafantaris, I., Amoutzias, G. D., Pournaras, S., & Mossialos, D. (2021). Antibacterial activity and characterization of bacteria isolated from diverse types of greek honey against nosocomial and foodborne pathogens. *Applied Sciences (Switzerland)*, *11*(13). <https://doi.org/10.3390/app11135801>
- Tsavea, E., & Mossialos, D. (2019). Antibacterial activity of honeys produced in Mount Olympus area against nosocomial and foodborne pathogens is mainly attributed to hydrogen peroxide and proteinaceous compounds. *Journal of Apicultural Research*, *58*(5), 756–763. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1649570>
- Uludag, A., Saric-kršmanovic, M., Radivojevic, L., & Potocnik, I. (2018). *Book of Abstracts. September*.
- Vokou, D., Kokkini, S., & Bessiere, J. M. (1993). Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology*, *21*(2), 287–295. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90047-U](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90047-U)
- Wan Ismail, W. N. A., Jasmi, N., Khan, T. M., Hong, Y. H., & Neoh, C. F. (2020). The Economic Burden of Candidemia and Invasive Candidiasis: A Systematic Review. *Value in Health Regional Issues*, *21*, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.vhri.2019.07.002>
- Węglarz, Z., Kosakowska, O., Przybył, J. L., Pióro-Jabrucka, E., & Baczek, K. (2020). The Quality of Greek Oregano (*O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Letswaart) and Common Oregano (*O. vulgare* L. subsp. *vulgare*) Cultivated in the Temperate Climate of Central Europe. *Foods*, *9*(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/foods9111671>
- Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., & Lim, S. H. E. (2014). Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *The Open Microbiology Journal*, *8*(1), 6–14. <https://doi.org/10.2174/1874285801408010006>
- Zheljazkov, V. D., & Astatkie, T. (2012). Effect of distillation time on mentha canadensis essential oil yield and composition. *HortScience*, *47*(5), 643–647. <https://doi.org/10.21273/hortsci.47.5.643>
- Zheljazkov, V. D., Astatkie, T., & Schlegel, V. (2012). Distillation time changes oregano essential oil yields and composition but not the antioxidant or antimicrobial activities. *HortScience*, *47*(6), 777–784. <https://doi.org/10.21273/hortsci.47.6.777>
- Κατσιώτης, Σ., & Χατζοπούλου, Π. (2010). ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΦΥΤΑ ΚΑΙ

ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε.

Λιοδάκης, Σ. (2001). *Αναλυτική χημεία*. Παπασωτηρίου εκδόσεις.

Μαλούπα, Ε., Γρηγοριάδου, Κ., Λάζαρη, Δ., & Κρίγκας, Ν. (2015). *Ελληνικά αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά Αναπαραγωγή – καλλιέργεια – μεταποίηση – εμπορία*.

Σουλελής, Χ. Ν. (2000). *Φαρμακογνωσία*. Εκδόσεις Πήγασος.

## Ευρετήριο εικόνων

Σελ.

Εικόνα 1.

α) Κοντινή φωτογραφία φύλλων *ρίγανης Origanum vulgare ssp hirtum* όπου διακρίνονται οι ελαιοφόροι αδένες κατά την περίοδο του χειμώνα που το φυτό έχει περιορισμένη ανάπτυξη. 13

β) Άνθοι *ρίγανης Origanum vulgare ssp hirtum*. 14

γ) Φυτό *ρίγανης Origanum vulgare ssp hirtum* σε πλήρη άνθηση λίγο πριν την συγκομιδή για απόσταξη. Αρχές Αυγούστου. 14

Εικόνα 2.

α) Κοντινή φωτογραφία φύλλου *φασκόμηλου* όπου διακρίνονται οι ελαιοφόροι αδένες. 15

β) Άνθη *Salvia officinalis*. 16

γ) Φυτά *φασκόμηλου (Salvia officinalis)* σε πλήρη άνθηση έτοιμα για συγκομιδή και απόσταξη. Αρχές Μαΐου 16

Εικόνα 3. Ανθισμένο φυτό *φλισκούνη* 17

Εικόνα 4. Περίγραμμα βιοσύνθεσης *τερπενίων*. 20

Εικόνα 5. Συγκρότημα ατμοαπόσταξης χωρητικότητας 200lt

α) δοχείο παραγωγής ατμού. 23

β) καζάνι ατμοαπόσταξης και ψυκτήρας υγροποίησης. 23

Εικόνα 6.	
α) Π-κυμένιο β) γ-τερπενινένιο γ) θυμόλη δ) καρβακρόλη	23
Εικόνα 7.	
α) α-θουγιόνη β) β-θουγιόνη γ) καμφορά δ) 1-8 κινεόλη	24
Εικόνα 8.	
α) πουλεγόνη β) πιπεριτόνη γ) μενθόνη δ) ισομενθόνη	24
Εικόνα 9 . Σχηματική απεικόνιση διάταξης GS-MS	27
Εικόνα 10. Ρεζαζουρίνη σε απορροφητικό χαρτί τοποθετημένο σε τρυβλίο για την επιβεβαίωση δημιουργίας αναερόβιων συνθήκων.	38
Εικόνα 11. microtiter plate όπου διακρίνουμε οπτικά τα (πηγαδάκια) στα οποία υπάρχει ανάπτυξη της <i>Candida albicans</i>	40
Εικόνα 12 . Φωτογραφία μέσα από το ανάστροφο μικροσκόπιο microtiter plate ανάπτυξης <i>Candida albicans</i> .	
α) εικόνα θετικού control ανάπτυξης	40
β) εικόνα ανάπτυξης σε τιμή μικρότερη της MIC στο ανθόνερο <i>ρίγανης</i>	40
Εικόνα 13. microplate replicator	41
Εικόνα 14. Τρυβλίο 120mm με εφαρμογή της ελάχιστης μυκητοκτόνου δράσης MFC.	43



## Ευρετήριο πινάκων

Σελ.

Πίνακας 1. Αναλύσεις GC-MS των προς εξέταση δειγμάτων.	30-32
Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις εξέτασης ανθόνερων για <i>Streptococcus mutans</i> .	36
Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις εξέτασης αιθέριων ελαίων για <i>Streptococcus mutans</i> .	36
Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις εξέτασης ανθόνερων για <i>Candida albicans</i> .	39
Πίνακας 5. Συγκεντρώσεις εξέτασης αιθέριων ελαίων για <i>Candida albicans</i> .	39
Πίνακας 6. Αποτελέσματα MIC και MBC <i>Streptococcus mutans</i> για τα ανθόνερα.	44
Πίνακας 7. Αποτελέσματα MIC και MBC <i>Streptococcus mutans</i> για τα αιθέρια ελαία.	45
Πίνακας 8. Αποτελέσματα MIC και MBC <i>Candida albicans</i> για τα ανθόνερα.	46
Πίνακας 9. Αποτελέσματα MIC και MBC <i>Candida albicans</i> για τα αιθέρια ελαία.	47