



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΤΩΝ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Cistus creticus*
(υδατικών εκχυλισμάτων – έγχυμα – αφέψημα)**



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΕΚΠΑ: ΚΑΘ. Ι. ΧΗΝΟΥ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ: ΚΑΘ. Χ. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ

ΠΕΝΤΑΦΡΑΓΚΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2019

Σκοπός της Μελέτης

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε φυτοχημικά, υδατικό εκχύλισμα (αφέψημα) λαδανιάς (*Cistus creticus* L.) από δύο διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας, τη Κρήτη (Σίσσες) και τη Μυτιλήνη (Κράτηγος). Κατόπιν, έγινε σύγκρισή τους προκειμένου να επισημανθούν οι όποιες εμφανιζόμενες διαφορές.

Οι λόγοι που επιλέχθηκε το συγκεκριμένο φυτό είναι οι εξής:

- Το φυτό της λαδανιάς (*Cistus creticus* L.) είναι ενδημικό φυτό της Κρήτης.
- Το εργαστήριο της Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών προϊόντων του ΕΚΠΑ έχει μεγάλη εμπειρία στις χημικές αναλύσεις του φυτού και της ρητίνης του.
- Στη κεντρική Ευρώπη το φυτό της λαδανιάς (*Cistus creticus*) αποτελεί εξαιρετικά ευπώλητο και καταξιωμένο βότανα για καθημερινή χρήση.
- Αφεψήματα του φυτού δεν έχουν μελετηθεί φυτοχημικά στην Ελλάδα.
- Η Κρήτη αλλά και η Μυτιλήνη παράγουν μεγάλες ποσότητες *Cistus creticus* και κρίθηκε σκόπιμο να συγκριθούν φυτοχημικά (ποιοτικά) αφεψήματα και από τις δύο περιοχές ώστε να εξαχθούν πολύτιμα συμπεράσματα για πιθανή μελλοντική τους αξιοποίηση.

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά:

- Τους φαρμακοποιούς Εμμανουήλ Ατσαλάκη και Μελπομένη Ουζουνέλλη για την συλλογή των δειγμάτων *Cistus creticus* από την Κρήτη (Σίτσες) και τη Μυτιλήνη (Κρατηγός) αντίστοιχα.
- Τον καθηγητή Χαράλαμπο Κατερινόπουλο που με δέχτηκε και με εμπιστεύτηκε ώστε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στην Αθήνα.
- Την Καθηγήτρια Ιωάννα Χήνου από το Φαρμακευτικό Τμήμα του ΕΚΠΑ, για την επιλογή του θέματος, την καθοδήγησή της και τη συνολική βοήθεια που μου προσέφερε τόσο στο εργαστήριο όσο και στη βιβλιογραφική έρευνα.
- Τον Καθηγητή Κων/νο Δεμέτζο από το Φαρμακευτικό Τμήμα του ΕΚΠΑ, για τη χρήση βιβλιογραφιών του *Cistus* από το προσωπικό του αρχείο.
- Τη Δρα. Κ. Γκράικου από το Φαρμακευτικό Τμήμα του ΕΚΠΑ, για τη πολύτιμη βοήθειά της όσον αφορά την ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων σε κάθε φάση της πειραματικής πορείας.
- Τον Καθηγητή Γ. Κόκκοτο για τη χρήση των μηχανημάτων LC-MS στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, ΕΚΠΑ.
- Τη Δρα Μ. Κόκκοτου για τη πολύτιμη συμβολή της στη λήψη των φασμάτων MS.
- Τη Γιώτα Κούρτη και την Ελισάβετ Βαρβούνη για την συνεχή βοήθειά τους και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.
- Την οικογένειά μου για τη στήριξη και την αγάπη που μου έδειξε.
- Τη γιαγιά μου για την πίστη της σε εμένα και την καθημερινή στήριξή της.
- Τον παππού για την αγάπη του και την καθοδήγησή του.

Περιεχόμενα

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	II
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	III
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	IV
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΓΕΝΟΣ CISTUS.....	2
1. ΔΡΟΓΟΒΟΤΑΝΙΚΗ	3
1.1 Οικογένεια <i>Cistaceae</i>	3
1.1.1 Βοτανικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Cistus</i>	4
1.1.2 Ταξινόμική του γένους <i>Cistus</i>	6
1.1.3 Το είδος <i>C. creticus</i> , Κίσθος ο κρητικός	8
1.1.4 Λάδανο (ρητίνη)	10
2. ΔΡΟΓΟΪΣΤΟΡΙΑ.....	12
3. ΔΡΟΓΟΧΗΜΕΙΑ - ΔΡΟΓΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ	16
3.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες γένους <i>Cistus</i>	16
3.1.1 Φαινυλοπροπανοειδή	16
3.1.1.1 Φλαβονοειδή.....	17
3.2 Χημικά συστατικά <i>C. creticus</i>	22
3.3 Βιολογικές δράσεις εκχυλισμάτων και δευτερογενών μεταβολιτών, φυτών του γένους <i>Cistus</i>	25
3.3.1 Αντιοξειδωτική δράση	25
3.3.2 Αντιβακτηριακή δράση.....	26
3.3.3 Κυτταροτοξική / Κυτταροστατική δράση.....	27
3.3.4 Σπασμολυτική δράση.....	28
3.3.5 Δράση έναντι δερματικών παθήσεων	29
3.3.6 Αντική δράση	29
3.3.7 Επουλωτική δράση	30
3.3.8 Αντιφλεγμονώδης δράση.....	30
3.3.9 Κλινικές μελέτες.....	31
3.3.10 Ανεπιθύμητες ενέργειες	32
3.3.11 Βιολογικές δράσεις ρητίνης λαδάνου.....	33
3.3.12 Άλλες δράσεις	34
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	35
4. ΓΕΝΙΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	36
4.1 Αναλυτική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (<i>Analytical Thin Layer Chromatography - Analytical TLC</i>) ...	36
4.2 Ρητίνη Προσρόφησης ΧΑΔ-4.....	37
4.3 Χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού (<i>Sephadex LH-20</i>)	38
5. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	40
5.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (<i>NMR</i>)	40
5.2 Μέθοδος Ανάλυσης (<i>GC-MS</i>).....	40
5.3 <i>LC-MS</i> (<i>High Resolution liquid chromatography mass spectrometry</i>)	41
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	42
6. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΦΕΨΗΜΑΤΟΣ <i>CISTUS CRETICUS</i> SUBSP. <i>CRETICUS</i>	43
7. ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....	44
7.1 Αναλυτική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (<i>TLC</i>).....	44
7.2 Μέθοδος Ανάλυσης (<i>GC-MS</i>).....	45
8. ΡΗΤΙΝΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΧΑΔ-4	46
8.1 Οι αναλύσεις φαίνονται παρακάτω (<i>LC-MS</i> (<i>High Resolution liquid chromatography mass spectrometry</i>))	48

8.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	50
9. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ (SERHADEX LH-20)	54
9.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	56
10. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEU	58
11. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	63
12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

Εισαγωγή

Γένος Cistus

Το γένος *Cistus* L., η ονομασία του οποίου προέρχεται από την ελληνική λέξη κίστος ή κίσθος, αποτελεί ένα γένος φυτών που ευδοκμεί σε βραχώδη και άγονα εδάφη και συχνά περιλαμβάνει θαμνώδη είδη (Angeloroulou et al., 2001; Gulz et al., 1996). Τα φυτά της οικογένειας Cistaceae έχουν χρησιμοποιηθεί για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες, και κυρίως το γένος *Cistus*, τα είδη του οποίου αποτελούν βοτανοθεραπευτικά για αντιμετώπιση πολλών ασθενειών ανθρώπων και ζώων στον κόσμο της υπαίθρου σε όλη την περιοχή της Μεσογείου (Barrajón-Catalán et al., 2010).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση αφεψήματος των φύλλων του φυτού *Cistus* στην Τουρκία για την αντιμετώπιση της δυσπεψίας αλλά και του κοινού κρυολογήματος (Ahmad et al., 1993; M. M. Azevedo et al., 2015; Papaefthimiou et al., 2014a). Ερευνητικές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι θεραπευτικές ιδιότητες των φυτών του γένους *Cistus* οφείλονται σε πλήθος δευτερογενών μεταβολιτών (Williams et al., 1989), όπως τερπενοειδή (τερπένια, διτερπένια τύπου λαβδανίου και κλεροδάνια), φαινυλοπροπανοειδή (φλαβονοειδή και ελαγιταννίνες), αλκαλοειδή και άλλα (Demetzos et al., 2002a, 1994, 1990; Kalroutzakis et al., 2001; Maggi et al., 2016; Nicoletti et al., 2015; Papaefthimiou et al., 2014a), που βρίσκονται κυρίως στα υπέργεια τμήματά τους.

1. Δρογοβοτανική

1.1 Οικογένεια *Cistaceae*

Η Οικογένεια *Cistaceae*, (Rock Rose Family) ανήκει στα Αγγειόσπερμα και τη βοτανική τάξη *Malvales*, είναι μία πολυπληθής οικογένεια πολυετών θάμνων και ποωδών φυτών που ευδοκιμούν στις εύκρατες ζώνες (Comandini et al., 2006; Tomás-Menor et al., 2013a). Αποτελείται από 180 είδη ταξινομημένα σε 8 γένη (Guzmán and Vargas, 2005), εκ των οποίων τα 5 είναι ενδημικά φυτά της Μεσογειακής λεκάνης και των εύκρατων περιοχών της Ευρώπης (*Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum* και *Tuberaria*), ενώ υπάρχουν 3 στην βόρεια Αμερική (*Crocanthemum*, *Hudsonia*, *Lechea*). (Falchi et al., 2009; Guzmán and Vargas, 2009). Τα φύλλα των φυτών της οικογένειας *Cistaceae* είναι συνήθως αντίθετα, τα δε άνθη μονήρη ή οργανωμένα σε ταξιανθίες, υπόγυνα και ερμαφρόδιτα. Τα άνθη αποτελούνται από 3 έως 5 σέπαλα, 5 πέταλα ευκόλως αποσπώμενα και το χρώμα τους είναι συνήθως κίτρινο, ρόδινο ή λευκό. Ο καρπός είναι διαρρηγνυόμενη κάψα με πολλά σπέρματα, κρεμαστή και σπανίως όρθια (Heywood & Ball, 1968). Οι στήμονες είναι πολυάριθμοι και διαφέρουν σε μήκος. Η ωοθήκη αποτελείται συνήθως από τρία καρπόφυλλα, εκτός του γένους *Cistus*, το οποίο έχει 5 ή περισσότερα.

Βασίλειο	Φυτά (Plantae)
<u>Άθροισμα</u>	Σπερματόφυτα (Spermatophyta)
<u>Υποάθροισμα</u>	Αγγειόσπερμα (Angiospermae)
<u>Κλάδος</u>	Ευδικοτυλίδονα (Eudicots)
<u>Υποκλάδος</u>	Ροδίδες (Rosids)
<u>Τάξη</u>	Μαλαχώδη (Malvales)
<u>Οικογένεια</u>	Κιστοειδή (<i>Cistaceae</i>)
<u>Γένος</u>	Κίσθος (<i>Cistus</i>)
<u>Υπογένος</u>	Κίσθος (<i>Cistus</i>)
<u>Είδος</u>	<i>Cistus creticus</i> L.
<u>Υποείδος</u>	<i>Cistus creticus</i> subsp <i>creticus</i>

Πίνακας 1 Συστηματική κατάταξη αλαδανιά

Οι σπόροι των συγκεκριμένων φυτών έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται την εποχή που ακολουθεί μετά από μια καταστροφική πυρκαγιά στο δάσος (Ferrandis et al., 1999). Η εξέταση σπόρων από εκπροσώπους των πέντε προαναφερόμενων γενών (*Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum* και *Tuberaria*) έδειξε ότι το φαινόμενο της σκληρότητας των σπόρων είναι ένα εξέχον χαρακτηριστικό ολόκληρης της οικογένειας Cistaceae. Ένα οικολογικό “σύνδρομο” χαρακτηρίζει τους σπόρους της οικογένειας Cistaceae, καθώς ο μικρός σε μέγεθος σπόρος παρουσιάζει σκληρή εξωτερική επιφάνεια, διασπορά μικρής απόστασης, μακροχρόνια επιμονή στο έδαφος, μαλακώνει σε υψηλές θερμοκρασίες (ένα είδος ευκαιριακής στρατηγικής βλάστησης) και έχει βραδεία ταχύτητα βλάστησης των “μαλακωμένων” σπόρων. Το σύνδρομο αυτό προσδίδει στη οικογένεια Cistaceae ένα σημαντικό οικολογικό πλεονέκτημα στις καλοκαιρινές ξηρές και κλιματικές συνθήκες της Μεσογείου (Thanos et al., 1992).

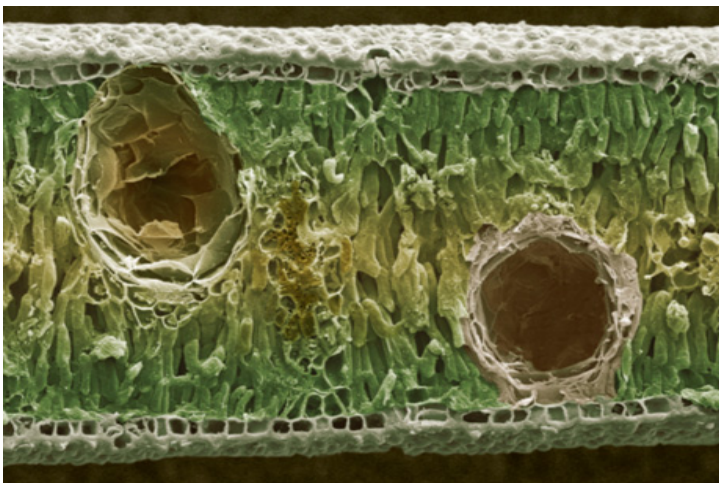
Αξίζει να σημειωθεί επίσης, η χρήση των περισσότερων ειδών των Cistaceae στη βιομηχανία αρωμάτων επειδή είναι ιδιαίτερα εύοσμα, όπως επίσης και την καλλιέργεια κάποιων ειδών ως διακοσμητικών για τα λευκά και ερυθρά ροδόμορφα άνθη τους (Ben-Jemina et al., 2013a; El Euch et al., 2015; Tomás-Menor et al., 2013a).

1.1.1 Βοτανικά χαρακτηριστικά του γένους *Cistus*

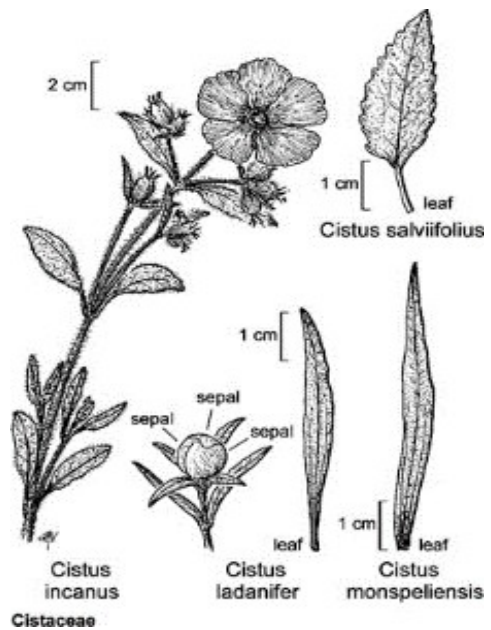
Τα φυτά *Cistus* είναι μικροί, ξυλώδεις θάμνοι και σπανίως πόες που μπορούν να φτάσουν το ένα μέτρο ύψος. Έχουν κεντρικό ευθύγραμμο στέλεχος με αντίθετες και πλούσιες διακλαδώσεις. Στα κλαδιά αναπτύσσονται συνήθως κυματιστά φύλλα με διακλαδισμένα νεύρα, απλά και αδιαίρετα, αντίθετα ή εναλλασσόμενα και φέρουν τρίχες αστεροειδείς. Στο γένος *Cistus* παρουσιάζονται δύο τύποι τριχωμάτων. Το μη αδενικό και το αδενικό. Το δεύτερο παράγει ένα ρητινώδες έκκριμα, το ‘λάδανο’, που είναι υπεύθυνο για το χαρακτηριστικό άρωμα του είδους (Gulz et al., 1996).



Εικόνα 1
Τριχώματα της κρητικής λαδανιάς, που παράγουν την πολύτιμη ρητίνη



Τα φυτά έχουν μια ακραία ταξιανθία με 1-7 μονήρη άνθη (Guzmán and Vargas, 2009). Τα λουλούδια είναι εφήμερα, διεγείρονται από το πρωινό φως, έχουν είτε άσπρα είτε ροζ / μωβ πέταλα και 3-5 σέπαλα. Υπάρχουν πολλοί στήμονες, ενώ η ωοθήκη είναι πεντάχωρη (σπάνια δεκάχωρη, αλλά μπορεί επίσης να είναι 6-12 χώρων) και το στίγμα είναι μεγάλο, σε σχήμα δίσκου με 5-12 λοβούς (Guzmán and Vargas, 2009). Τα φυτά *Cistus* έχουν πολυάριθμα σπέρματα με δύο κοτυληδόνες. Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων τους είναι $n = 9$ ($2n = 18$) (Guzmán and Vargas, 2009). Τα φυτά συμβιώνουν με μυκόρριζες με διάφορα είδη μανιταριών, τα οποία ανήκουν κυρίως στο γένος



Εικόνα 2 Γενικά βοτανικά χαρακτηριστικά ειδών *Cistus*

Lactarius (Comandini et al., 2006). Αυτά χαρακτηρίζονται από ένα πολυστρωματικό μανδύα που περιλαμβάνει τόσο επιδερμικά όσο και φλοιώδη κυτταρικά στρώματα (Gulz et al., 1996).

1.1.2 Ταξινόμηση του γένους *Cistus*

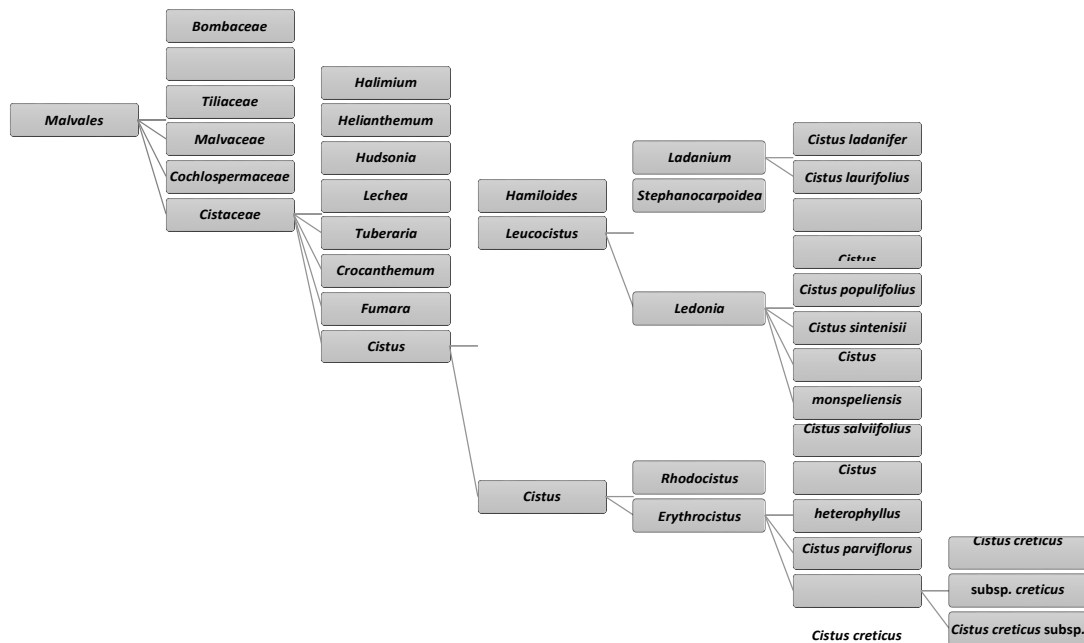
Όπως αναφέρθηκε ήδη, σήμερα, η οικογένεια Cistaceae αποτελείται από 8 γένη. Από αυτά τα 5 είναι ενδημικά της λεκάνης της Μεσογείου (*Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Tuberaria*) και 3 της αμερικανικής ηπείρου (*Crocanthemum*, *Hudsonia*, *Lechea*) (Falchi et al., 2009; Guzmán and Vargas, 2009).

Η προσπάθεια ταξινόμησης του *Cistus* αρχίζει ήδη πριν από το 1800 (Linnaeus, 1753). Το 1824 πραγματοποιείται η πρώτη ολοκληρωμένη κατάταξη, η οποία περιγράφει 28 είδη διαιρούμενα σε 2 τμήματα, *Erythrocistus* και *Ledonia* (Dunal, 1824). Ακολούθησαν και άλλες προσπάθειες ταξινόμησης με διάφορα κριτήρια (Sprach, 1836, Grosser, 1903, Dansereau, 1939) για να καταλήξουμε στην κατάταξη των Demoly και Mosterrrat το 1993 στην οποία αναφέρονται 12 είδη του γένους *Cistus* που αναπτύσσονται στην Ιβηρική Χερσόνησο. Σήμερα θεωρείται ότι το γένος *Cistus* περιλαμβάνει περίπου 20 είδη, εκ των οποίων τα 16 εμφανίζονται στην Ευρώπη.

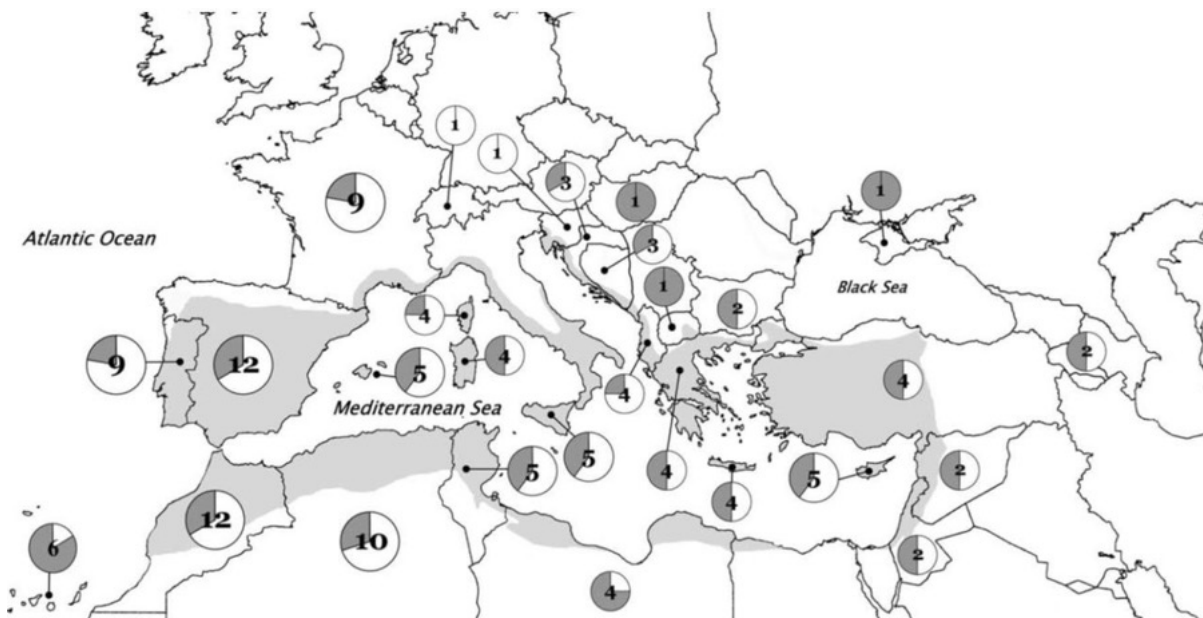
Μια πρόσφατη προσπάθεια ταξινόμησης των ειδών της οικογένειας Cistaceae βασίστηκε στη σύγκριση του DNA του πυρήνα και των πλασμιδίων των φυτικών κυττάρων, βάσει της οποίας διαιρέθηκε το γένος *Cistus* σε 3 υπογένη: το υπογένος *Cistus* με τα μωβ άνθη και τα υπογένη *Leucocistus* και *Hamiloides* με τα λευκά άνθη ([Εικόνα 3](#)) (Guzman και Vargas, 2005, Guzman et al., 2009). Ορισμένα από τα είδη *Cistus* είναι ενδημικά και άλλα ευρέως διαδεδομένα στην Ιβηρική Χερσόνησο, τα Κανάρια Νησιά, τη Βορειοδυτική Αφρική, την Ιταλία, την Ελλάδα και την Τουρκία. Τα είδη αυτά διαδίδονται σε διαφορετικές περιοχές της Μεσογείου, αλλά δεν κατανέμονται όλα τα είδη με τον ίδιο τρόπο (Guzmán and Vargas, 2009). Έτσι, κάθε περιοχή αποικίζεται από διαφορετικά είδη *Cistus*, ανάλογα με τις κλιματολογικές και τις εδαφικές συνθήκες (Angelorouliou et al., 2001) ([Εικόνα 4](#)). Έτσι, λόγω του πολυμορφισμού πολλών ειδών καθώς και της υβριδοποίησης μεταξύ των σχετικών ειδών, το *Cistus* παρουσιάζει αξιοσημείωτη μορφολογική διαφοροποίηση, παρόλο που είναι ένα σχετικά μικρό γένος (Ellul et al., 2002). Πράγματι, ο υβριδισμός έχει αναφερθεί ότι είναι μια ενεργή διαδικασία του είδους *Cistus* και πολλοί υβριδικοί συνδυασμοί εντός και μεταξύ των μωβ ή λευκών

ανθοφόρων ειδών έχουν καταγραφεί με βάση ενδιάμεσους μορφολογικούς χαρακτήρες (Guzmán and Vargas, 2005).

Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τη μελέτη ενός είδους του γένους *Cistus*, του *C. creticus* (και ειδικότερα του υποείδους *subsp. creticus*.)



Εικόνα 3 Ταξινομική απεικόνιση των ειδών *Cistus*



Εικόνα 4 Γεωγραφική κατανομή και αριθμός ειδών του γένους *Cistus* ανά περιοχή. Το διάγραμμα πίτας αναπαριστά την αναλογία των φυτών με λευκά και ροζ άνθη.

1.1.3 Το είδος *C. creticus*, Κίσθος ο κρητικός

Το είδος *C. creticus* είναι ένας θάμνος με φύλλα ωσειδή ή ελλειπτικά, τραχιά, συχνά κυματιστά, πυκνά διακλαδισμένος, ψηλός, μέχρι 1 m, με φύλλα μήκους 2-3 cm που έχουν δικτυωτά νεύρα στην κάτω επιφάνειά τους, που καλύπτονται και στις δύο πλευρές από αστεροειδείς και μακριές τρίχες. Τα άνθη του (διαμέτρου 4-6 cm) είναι ερυθρωπά (ροζ), τριχωτά, 4-6 εκατοστά, οργανωμένα



Εικόνα 5 *Cistus creticus* subsp. *creticus*,
φωτογραφία: ladano.blogspot.gr

σε ομάδες των 3-5 με τριχωτά σέπαλα, 2-3 φορές μικρότερα από τα πέταλα. Το *C. creticus* αποτελεί ένα είδος με μεγάλη ποικιλομορφία, με ή χωρίς αδενικές τρίχες στα νεαρά κλαδιά, στους μίσχους, στον κάλυκα και στην κάτω επιφάνεια των φύλλων (Καββάδας, 1990).

Το κρητικό *Cistus* έχει αναπτύξει το φαινόμενο του εποχιακού διμορφισμού ως μηχανισμό προσαρμογής του στο μεσογειακό κλίμα. Κατά τη διάρκεια του χειμώνα, οι πρόσφατα ανεπτυγμένοι βλαστοί είναι δεκατέσσερις φορές μακρύτεροι, φέρουν μεγαλύτερο αριθμό φύλλων με τα στόματα να κατανέμονται σε όλη την κάτω επιφάνεια. Αντιθέτως, στην διάρκεια του καλοκαιριού, όταν το νερό μειώνεται, τα φύλλα των νέων βλαστών είναι πέντε φορές μικρότερα από αυτά του χειμώνα, ενώ τα στόματα βρίσκονται ομαδικά οργανωμένα μέσα σε κρύπτες (Aronne and De Micco, 2001).

Η περίοδος ανθοφορίας του είδους *C. creticus* είναι από τον Μάρτιο μέχρι και τον Ιούνιο. Το είδος είναι διαδεδομένο στην Κεντρική και Ανατολική Μεσόγειο, συμπεριλαμβανομένης της Κορσικής, της Σαρδηνίας (Falchi et al., 2009) και της Κρήτης (Demetzos et al., 2002b; Papaefthimiou, et al. 2014; Christodoulakis, et al. 2014).

Το φυτό *C. creticus* είναι συνώνυμο με τα παρακάτω αναφερόμενα φυτικά είδη:

Συνώνυμα *Cistus creticus* L.

- *Cistus creticus* var. *tauricus* (C.Presl) Dunal
- *Cistus creticus* f. *albus* (O.E.Warb.) Demoly

- *Cistus creticus f. flavus* Demoly
- *Cistus creticus subsp. trabutii* (Maire) Dobignard ([www. theplantlist.org](http://www.theplantlist.org))
- *Cistus × incanus f. albiflorus* Delip. & Cheshm
- *Cistus × incanus subsp. corsicus* (Loisel.) Heywood
- *Cistus × incanus subsp. creticus* (L.) Heywood
- *Cistus incanus subsp. creticus* (L.) Heyw.
- *Cistus × incanus* L. ([www. theplantlist.org](http://www.theplantlist.org))

Το είδος *Cistus creticus* L. (Cistaceae), περιλαμβάνει επίσημα αποδεκτά 3 υποείδη (subspecies)

- ✓ *Cistus creticus subsp. creticus*,
- ✓ *Cistus creticus subsp. eriocephalus* (Viv.) Greuter & Burdet, και
- ✓ *Cistus creticus subsp. corsicus* (Loisel.) Greuter & Burdet

Από τα 3 αυτά υποείδη *C. creticus*:

Το *C. creticus subsp. corsicus*, περιορίζεται στα νησιά της Κορσικής και της Σαρδηνίας (Falchi et al., 2009).

Περισσότεροι από είκοσι πέντε πληθυσμοί υποειδών *C. creticus subsp. creticus* (Εικόνα 9) ενδημούν στην ακτή της Κρήτης (Ελλάδα) (Demetzos et al., 2002b).

Το υποείδος *C. creticus subsp. eriocephalus* (Εικόνα 8) βρίσκεται κυρίως στα νησιά της Κορσικής, στη Σαρδηνία (Falchi et al., 2009) και την Κρήτη (Chinou et al., 1994).

Θεωρείται λοιπόν γενικότερα το είδος *Cistus creticus* ως αποκλειστικά φυόμενο στην περιοχή της Μεσογείου.

Το *C. creticus subsp. creticus* έχει:

i) πολύ δαντελωτό – κρασπεδωτό φύλλο, και ii) αδενώδεις τρίχες στην κάτω επιφάνεια των φύλλων, τα νεαρά κλαδιά, τους μίσχους των ανθέων και τον κάλυκα.

Από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι τα υποείδη *C. creticus subsp. creticus* και *C. creticus subsp. eriocephalus* έχουν σημαντικές μορφολογικές διαφορές. Αρχικά, τα φύλλα του πρώτου φέρουν μεγάλη πυκνότητα απλών ή πολυκυττάρων αδενωδών τριχών που καλύπτουν τα

ανώτερα τμήματα των στελεχών του. Το γεγονός αυτό, το καθιστά έντονα κολλώδες και κατ'επέκταση έναν αξιόλογο παραγωγό της ρητίνης λάδανο. (Paolini et al., 2009). Από την άλλη, το *C. creticus subsp. eriocephalus* φέρει πολλές μακριές προστατευτικές τρίχες στα σέπαλα του, οι οποίες καλύπτουν τις αστεροειδείς, όπως επίσης υπάρχουν πυκνές λευκές τρίχες που καλύπτουν τα στελέχη και τους ποδίσκους των ανθέων.

Το φυτικό υλικό (υπέργεια τμήματα του είδους *C. creticus subsp. creticus*) που χρησιμοποιήθηκε κατά τη παρούσα πτυχιακή εργασία συλλέχθηκε, από δύο διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας (Ρέθυμνο και Μυτιλήνη), τον Ιούνιο 2018.

1.1.4 Λάδανο (ρητίνη)

Το *Cistus creticus subsp. creticus* και το *Cistus ladanifer* εκκρίνουν τη ρητίνη λάδανο ([Εικόνα 6](#)) (Maggi et al., 2016). Η ρητίνη συλλέγεται την στιγμή της υψηλότερης θερμοκρασίας της ημέρας με τη χρήση ειδικής τσουγκράνας με δερμάτινες άκρες, το λαδανιστήριο. Οι βοσκοί την συλλέγουν επίσης από τα γένια των κατσικιών καθώς προσκολλάται επάνω τους κατά την περιήγησή τους ανάμεσα στους θάμνους. Το λάδανο είναι ένα σκούρο καφέ αρωματικό και πικρό κόμμα. Χρησιμοποιείται στην παρασκευή αρωμάτων, παρασκευασμάτων με θεραπευτικές ιδιότητες ακόμη και με τη μορφή αφεψήματος.



Εικόνα 6 Ρητίνη λάδανο, φωτογραφία: ladano.blogspot.gr

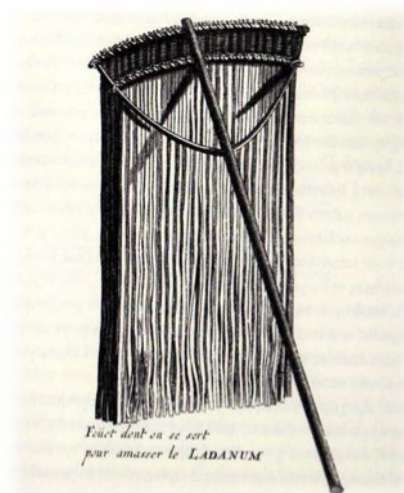
Ιστορικά, αναφορές υπάρχουν από τον Διοσκουρίδη, τον Πλίνιο και τον Ηρόδοτο, οι οποίοι αναφέρονται στον κίσθο από τον οποίο παράγεται το Λάδανο.

Όσον αφορά την συλλογή του Λαδάνου περιγραφές υπάρχουν από τον Διοσκουρίδη, τον Tournefort, τον Bellonius και τον Μαρίτη. Σύμφωνα με τον Μαρίτη υπήρχε μεγάλη παραγωγή στην Κύπρο - 1763 - αλλά και την Κρήτη, ενώ οι εξαγωγές γινόντουσαν προς την Αλεξάνδρεια και στην συνέχεια στο Σουδάν. Η συλλογή γινόταν με όργανο ονομαζόμενο *ληονίστρα* ([Εικόνα 7](#)). Στον Μεσαίωνα η συλλογή από την Κρητική Λαδανιά γινόταν με ένα είδος τσουγκράνας εφοδιασμένο με λωρίδες στις οποίες κολλούσε το Λάδανο και ακολουθούσε η συλλογή του για να κατεργασθεί ([Εικόνα 8](#)).

Η εργασία αυτή γινόταν τις μεσημβρινές ώρες γιατί τότε η ρητίνη βρισκόταν σε ημίρευστη μορφή και ήταν δυνατή η συλλογή της. Σήμερα το Λάδανο συλλέγεται στην Ισπανία από το *Cistus ladanifer* L., την Κρήτη και την Κύπρο από το είδος *Cistus creticus* L..



Εικόνα 7 Ληονίστρα, περιοχή Σίσες Κρήτης,
φωτογραφία: ladano.blogspot.gr



Εικόνα 8 Είδος τσουγκράνας,
φωτογραφία: ladano.blogspot.gr

2. Δρογοϊστορία

Η σπουδαιότητα των φυτικών ειδών του γένους *Cistus* ήταν ήδη γνωστή από την αρχαιότητα. Σύμφωνα με τον πάπυρο Ebers, οι Αιγύπτιοι κατά την εποχή των Φαραώ χρησιμοποιούσαν το φυτό ως φάρμακο και την ρητίνη που παράγουν κάποια είδη του γένους, γνωστή και ως λάδανο (*labdanum*), ως αφροδισιακό βάλαμο (Nicoletti et al., 2015). Επίσης, η αρωματική ρητίνη κάποιων φυτών χρησιμοποιήθηκαν από αρχαιοτάτων χρόνων τόσο έναντι της χολέρας όσο και για την ταρίχευση των νεκρών. Ευρύτατη ήταν η χρήση του φυτού και στην Μινωϊκή Κρήτη, ενώ τα άνθη του απεικονίζονται στη νωπογραφία «γαλάζιο πουλί» (Εικόνα 10).



Εικόνα 10 Νωπογραφία γαλάζιο πουλί

Αναφορές για το γένος *Cistus* γίνονται αργότερα και από τον Ηρόδοτο (484 π.Χ.-425 π.Χ.) Ο πατέρας της Ιστορίας περιγράφει τους Άραβες και τη σχέση τους με το λάδανο καθώς και τον τρόπο που το μάζευαν, από τα γενιά των τράγων: *Τὸ δὲ δὴ λήδανον, τὸ καλέουσι Ἀράβιοι λάδανον, ἔτι τούτου θυμασιώτερον γίνεται· ἐν γὰρ δυσσομοτάτῳ γινόμενον εὐωδέστατον ἐστὶ· τῶν γὰρ ἀγῶν τῶν τράγων ἐν τοῖσι πώγωσι εὐρίσκεται ἐγγινόμενον οἶον γλοιῶς ἀπὸ τῆς ὕλης. χρήσιμον δ' ἔς πολλὰ τῶν μύρων ἐστὶ, θυμιῶσί τε μάλιστα τοῦτο Ἀράβιοι.* Αργότερα, ο Ιπποκράτης (460 π.Χ.-377 π.Χ.) είναι ο πρώτος που αποκάλεσε το γένος «Κίσθος». Αναφορές στο φυτό γίνονται και από τον Θεόφραστο (371 π.Χ.-287 π.Χ.): *κίσθος, κίστος, κίσσαρος, κίσθαρος* «κίσθος ὃν ἐνιοὶ κίσθαρον ἢ κίσσαρον καλοῦσι» αναδεικνύοντας το φυτό ως πηγή πολύτιμης ρητίνης.

Ο Ρωμαῖος ιατρός Celsus (25 π.Χ.-50 μ.Χ.), αναφέρει τη χρήση της ρητίνης, ως έμπλαστρο σε κακοήθη σαρκώματα. Ιδιαίτερη αναφορά στο φυτό *Cistus* γίνεται και από τον Διοσκουρίδη (10 μ.Χ.-90 μ.Χ.) στο σύγγραμμά του «Περί ὕλης Ιατρικῆς», αναδεικνύοντας ότι το φυτό έχει χρησιμοποιηθεί για πάνω από 2.000 χρόνια στην περιοχή της Taurus της Νότιας Ανατολίας, γενέτειρας του μεγαλύτερου Φαρμακολόγου της Αρχαιότητας. Ο ίδιος δίνει μια λεπτομερή περιγραφή για τον τρόπο συλλογῆς της ρητίνης: «*ἡ ἐκκρίση τοῦ φυτοῦ κολλᾷ στα γένια και στα πόδια των τράγων και των αιγῶν ὅταν βόσκουν και ἀπὸ ἐκεῖ μαζεύεται και ζυμώνεται για να πάρει την τελική μορφή του.*». Ο Ορειβάσιος, διαπρεπῆς Βυζαντινός ιατρός που έζησε τον 4ο αἰώνα μ.Χ., παρασκεύαζε αλοιφή με λάδανο κατά της τριχόπτωσης για το Ρωμαίο

Αυτοκράτορα Ιουλιανό. Τέλος, ο Πέρσης ιατρός Αβικέννας που έζησε στην Περσία (980-1037 μ.Χ.) και ασχολήθηκε εκτεταμένα με την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας, αναφέρει τη χρήση του λαδάνου για την αποσκλήρυνση του στομάχου και του εντέρου και με τη μορφή αλοιφής για τη θεραπεία του σπλήνα.

Στη βορειοδυτική Ευρώπη, η ρητίνη αναφέρεται για πρώτη φορά σε μεσαιωνικά «βοτανολογικά» βιβλία και συνταγές, ως συστατικό παρασκευασμάτων και αρωμάτων (Dodoens, 1644, Braekman, 1990). Επίσης, σε μια σειρά από συνταγές για την ταρίχευση των σορών που δόθηκαν από τον ιατρό του 16ου αιώνα P. van Foreest, περιλαμβάνονται το λάδανο και το «*Alipta muscata*», ένα αρωματικό παρασκεύασμα που επίσης περιέχει ρητίνη του φυτού (Deforce, 2006).

Στην παραδοσιακή Ιατρική πολλών χωρών έχει αναφερθεί η χρήση του φυτού για την αντιμετώπιση ρευματισμών, ελκών, αιμορροΐδων, μικροβιακών μολύνσεων, μυκητιασικών μολύνσεων, αιμορραγιών και πυρετού. Επίσης έχει καταγραφεί η χρήση για τη θεραπεία της στειρότητας, σε φλεγμονές των νεφρών και των ουροποιητικών οδών, ως αποχρεμπτικό, ως καταπραυντικό σε περιπτώσεις πεπτικού έλκους, καθώς και για την αντιμετώπιση του σακχαρώδη διαβήτη (Ahmad et al., 1993; Attaguile et al., 2000; M. M. Azevedo et al., 2015; Barrajon-Catalán et al., 2010; Kühn et al., 2011a; Küpeli and Yesilada, 2007; Papaefthimiou et al., 2014a; Rebaya et al., 2016b; Ulrich Kalus, 2009).

Πολλά από τα είδη *Cistus* χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν σε όλες σχεδόν τις περιοχές της Μεσογείου (Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Τουρκία) για την αντιμετώπιση της διάρροιας και των πεπτικών ελκών, δερματολογικών παθήσεων, ως αντιφλεγμονώδη και σπασμολυτικά (Ahmad et al., 1993; Yesilada et al., 1997).

Στην Ιορδανία χρησιμοποιήθηκε αφέψημα προερχόμενο από είδος *Cistus* για την αντιμετώπιση της ουρικής αρθρίτιδας (Al-khalil, 1995).

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η χρήση φύλλων από είδη *Cistus sp* στην Τουρκία σε λουτρό για την ανακούφιση από ρευματισμούς, αλλά και η τοπική εφαρμογή βρασμένων φύλλων στην περιοχή των νεφρών για την θεραπεία φλεγμονής του ουροποιητικού συστήματος (Küpeli and Yesilada, 2007).

Επιπλέον, τα φύλλα ειδών *Cistus* (*C. creticus* subsp. *creticus*) που αποτελούν πλούσια πηγή ρητίνης (Maggi et al., 2016), λόγω της χαρακτηριστικής οσμής τους έχουν χρησιμοποιηθεί για τη παραγωγή λιβανιού, ενώ αποτελούν ένα από τα 57 συστατικά που χρησιμοποιούνται στη παρασκευή του Αγίου Μύρου από το Πατριαρχείο της Κωνσταντινουπόλεως.



Εικόνα 11

Σήμερα τα είδη του γένους είναι γνωστά με τα δημόδη ονόματα: κιστά, κιστάρια, αλίσαρος, αλιταριές, ατίσαρος, λαδανιές, κουνουκλιές, ξιστάρια, ξισταριές. (Καββάδας, 1990).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα χρήσης του φυτού στην ελληνική παραδοσιακή θεραπευτική δίνεται από την παρακάτω συνταγή της Κρήτης: **Βραστάρι (Cretan Tea)**. Σύμφωνα με το ladano.blogspot.com, τα πράσινα μέρη της λαδανιάς, φύλλα, δροσερά μέρη και βολβοί γίνονται “βραστάρια” με πολλά βότανα μαζί για την αντιμετώπιση των νεφροπαθειών (πέτρες στους νεφρούς).

Κατά τη διαδικασία της παρασκευής, ζεσταίνονται 50 με 60 g του φυτού με νερό 500 mL για 20 min. Αφού έρθει το νερό στο σημείο βρασμού αφήνεται να πάρει «δυο βράσεις», μέχρι το χρώμα του νερού να «πάρει το χρώμα του κρασιού». Ο χρόνος αποτελεί κρίσιμο σημείο στην όλη διαδικασία γιατί αν βράζει περισσότερη ώρα το Βραστάρι, παίρνει πολύ πικρή γεύση και δεν πίνεται. Μετά το βρασμό ακολουθεί διήθηση ώστε να απομακρυνθούν τα ξερά μέρη. Κατόπιν τοποθετείται σε μπουκάλια στο ψυγείο στην συντήρηση. Η δοσολογία περιλαμβάνει ένα ποτήρι του κρασιού κάθε πρωί, σχεδόν δύο με τρεις εβδομάδες. Η πέτρα διαλύεται και απομακρύνεται από το σώμα του ασθενή κατά την ούρηση.

Τέλος, στις ρίζες της λαδανιάς παρασιτεί ένα φυτό (*Cytinus hypocistis*) με εκτυφλωτικό κόκκινο χρώμα που το χαρακτηρίζει η παντελής έλλειψη χλωροφύλλης. Το παρασιτικό αυτό

φυτό, με την κοινή ονομασία *λύκος της λαδανιάς*, **Κύτινος ο υπόκιστος**, έχει φύλλα κόκκινα, σαρκώδη σε επάλληλη επικάλυψη. Τα άνθη του έχουν 4 τέπαλα, λευκά ή κίτρινα, καλυμμένα από τα φύλλα, σε πυκνά κεφάλια, τα εξωτερικά αρσενικά και τα εσωτερικά θηλυκά. Το όνομα υπόκιστος (υποκισίς) περιγράφεται από τον Διοσκουρίδη. Οι αρχαίοι χρησιμοποιούσαν το χυμό που βγαίνει από το παράσιτο αυτό για στομαχικές παθήσεις (Vega et al., 2009).



Εικόνα 12 Κύτινος ο υπόκιστος

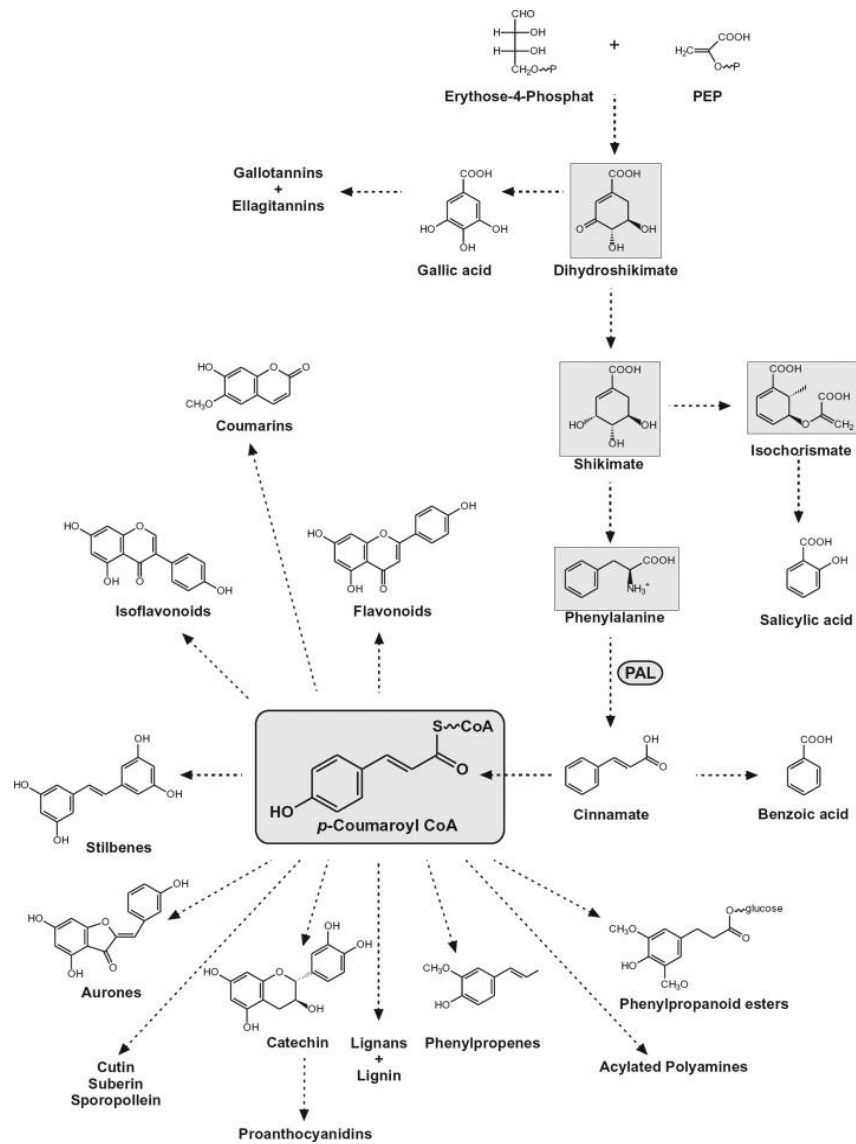
3. Δρογοχημεία - Δρογοφαρμακολογία

3.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες γένους *Cistus*

Τα είδη *Cistus* χαρακτηρίζονται από μια μεγάλη ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών. Συνολικά, έχουν αναφερθεί πολλές χημικές ουσίες, εκ των οποίων η πλειονότητα είναι τερπένια (μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και διτερπένια), ακολουθούν τα φαινυλοπροπανοειδή (φλαβονοειδή, άλλα φαινολικά παράγωγα και ταννίνες), οι υδρογονάνθρακες, τα λιπαρά οξέα, οι καρβονυλικές ενώσεις, οι φυτορμόνες και οι βιταμίνες. Ενώ το υπογένος *Cistus* είναι σχεδόν απαλλαγμένο από ελλαγιταννίνες και περιέχει κυρίως φλαβονοειδή, τα υπογένη *Leucocistus* και *Halimioiodes* είναι πλούσια σε ελλαγιταννίνες και περιέχουν μικρότερες ποσότητες φλαβονοειδών (Barrajón-Catalán et al., 2015).

3.1.1 Φαινυλοπροπανοειδή

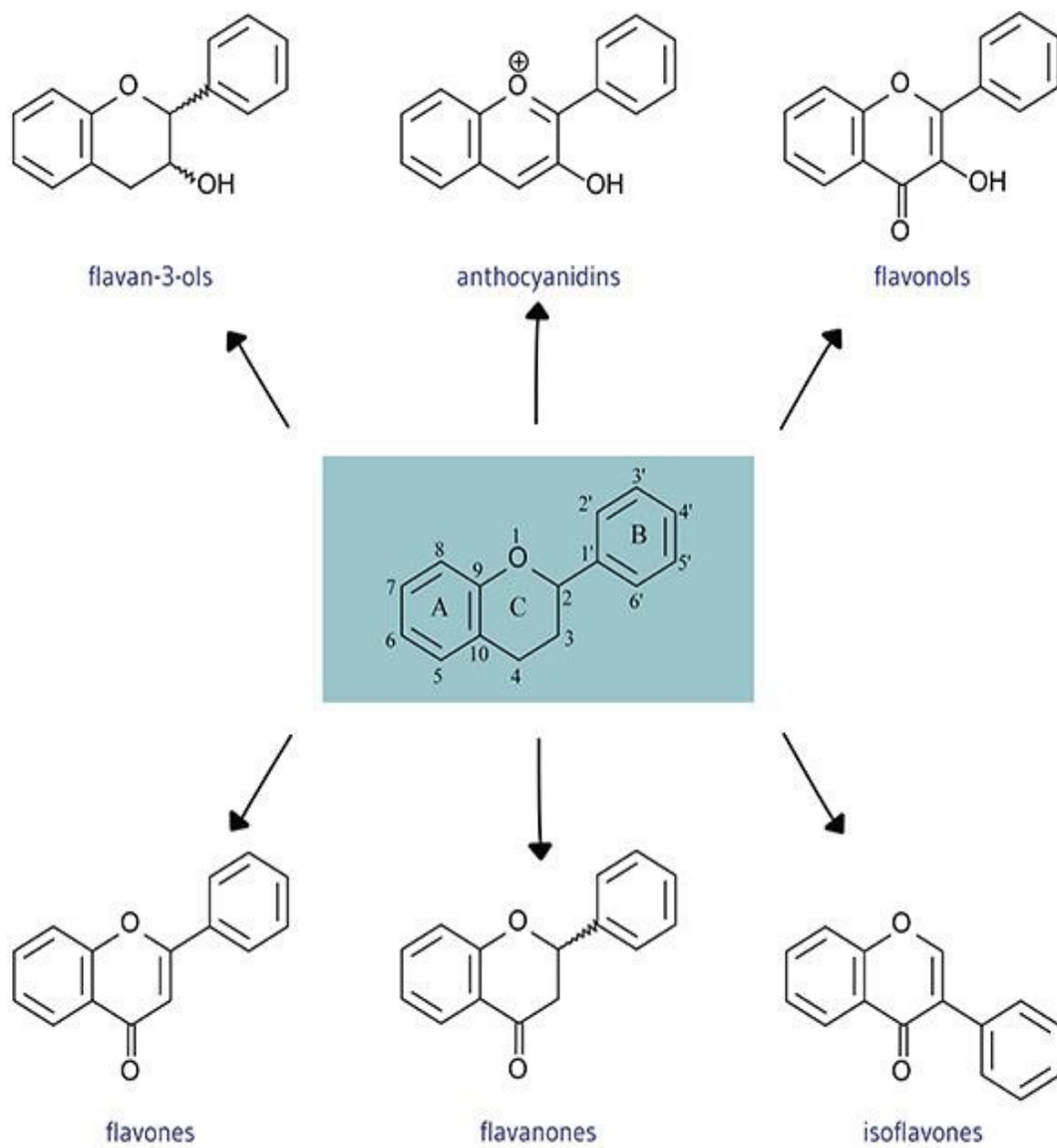
Τα φαινυλοπροπανοειδή είναι μια πολυπληθής ομάδα οργανικών ενώσεων που συντίθενται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη. Το όνομά τους προέρχεται από την αρωματική φαινυλική ομάδα και την παρουσία τριών ανθράκων του κουμαρικού οξέος, που είναι το κεντρικό ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση των φαινυλοπροπανοειδών ([Εικόνα 13](#)). Η οδός του κινναμωμικού οξέος αποτελεί εισαγωγικό στάδιο στη βιοσύνθεση των ενώσεων αυτών, καθώς μέσω του κινναμωμικού οξέος παράγεται το ενδιάμεσο κουμαροϋλικό συνένζυμο A (4-coumaroyl-CoA). Από αυτό, προκύπτει η βιοσύνθεση πολυάριθμων φυσικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των λιγνολών (προδρόμων της λιγνίνης και της λιγνοκυτταρίνης), των φλαβονοειδών, των ισοφλαβονοειδών, των κουμαρινών, των αουρονών, των στιλβενίων, της κατεχίνης και φυσικά των φαινυλοπροπανοειδών (Vogt, 2010).



Εικόνα 13 Διαφοροποίηση των φαινυλοπροπανοειδών με βάση το γενικό φαινυλοπροπανοειδικό μονοπάτι. Οι μεταβολίτες της οδού του σικιμικού οξέος και ο κεντρικός μεταβολίτης 4-κουμαρογλ- CoA, εμφανίζονται με γκρι χρώμα (Vogt, 2010).

3.1.1.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή (από τη λατινική λέξη flavus που σημαίνει κίτρινο) είναι μια κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών και των μυκήτων. Χημικά, τα φλαβονοειδή διαθέτουν ένα σκελετό 15 ατόμων άνθρακα, ο οποίος αποτελείται από δύο δακτυλίους φαινυλίου (Α και Β) και τον ετεροκυκλικό δακτύλιο (C). Υπάρχουν έξι μεγάλες υποκατηγορίες φλαβονοειδών: οι ανθοκυανιδίνες, οι φλαβαν-3-όλες, οι φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβόνες και ισοφλαβόνες, με τις φλαβονόλες να είναι οι πιο διαδεδομένες γενικά (Εικόνα 14).

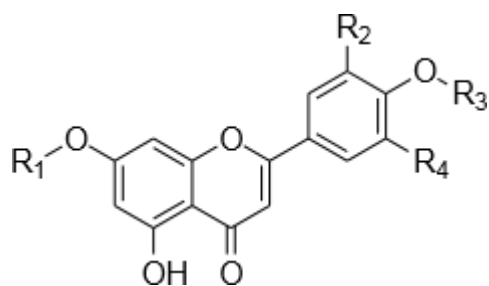


Εικόνα 14 Βασικός σκελετός φλαβονών του γένους *Cistus*

Μελέτες έδειξαν ότι τα κύρια συστατικά τόσο των υδατοαλκοολικών εκχυλισμάτων των φυτών όσο και της ρητίνης «λάδανο» των ειδών *Cistus* είναι φαινολικές ενώσεις, όπως μονοκυκλικές φαινόλες, φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, προανθοκυανιδίνες και ταννίνες.

Παρακάτω, συνοψίζονται τα περισσότερο απαντώμενα φαινολικά παράγωγα στα φυτικά είδη *Cistus*.

- **Φλαβόνες**



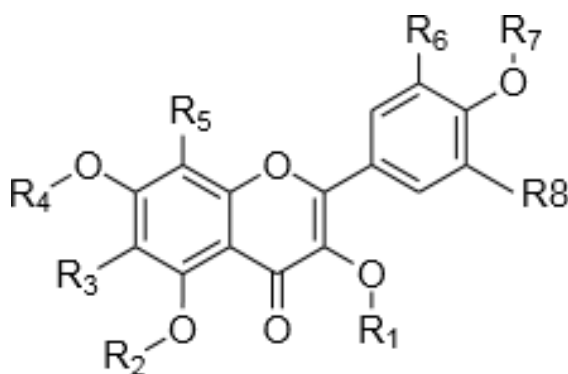
Εικόνα 15 Βασικός σκελετός φλαβονών του γένους *Cistus*

Φλαβόνη	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Είδος <i>Cistus</i>	Αναφορά
5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	H	H	H	H	<i>C. ladanifer</i>	(Valares Masa et al., 2016)
5,7-dihydroxy-2-(4'-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	H	H	CH ₃	H	<i>C. ladanifer</i> , <i>C. palhinhae</i>	(Valares Masa et al., 2016)
genkwanin	CH ₃	H	H	H	<i>C. ladanifer</i> , <i>C. palhinhae</i>	(Valares Masa et al., 2016)
isokaempferide	H	H	H	H	<i>C. ladanifer</i> , <i>C. palhinhae</i>	(Valares Masa et al., 2016)
ermanin	H	H	CH ₃	H	<i>C. ladanifer</i> , <i>C. palhinhae</i>	(Proksch, 1984)
kumatakenin	CH ₃	H	H	H	<i>C. ladanifer</i> , <i>C. palhinhae</i>	(Valares Masa et al., 2016)

Πίνακας 2 Φλαβόνες φυτών είδους *Cistus*

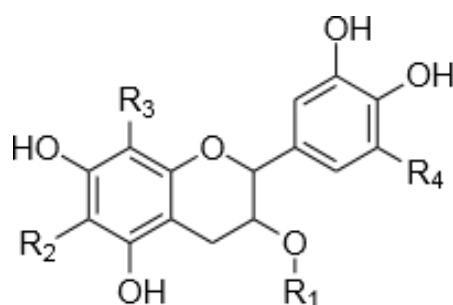
*Τα ονόματα των μεταβολιτών έχουν διατηρηθεί στη μορφή με την οποία παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία.

- Φλαβονόλες



Εικόνα 16 Βασικός σκελετός φλαβονολών του γένους *Cistus*

- Φλαβανόλες



Εικόνα 17 Βασικός σκελετός φλαβανολών του γένους *Cistus*

Φλαβανόλη	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Φυτό	Αναφορά
(+)-catechin	H	H	H	H	<i>C. albidus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Danneet al., 1994)(Qa'dan et al., 2003)
procyanidin B1	H	H	catechin	H	<i>C. albidus</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Qa'dan et al., 2003)
procyanidin B3	H	H	catechin	H	<i>C. albidus</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Qa'dan et al., 2003)
procyanidin B7	H	catechin	H	H	<i>C. incanus</i> L. ssp.	(Danne et al., 1994)
dimeric prodelphinidin B3	H	H	galocatechin	H	<i>C. albidus</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Qa'dan et al., 2003)
catechin-3-O- α -L-rhamnopyranoside	L-rhamnopyranose	H	H	H	<i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Petereit et al., 1991)
prodelphinidin C2	H	H	Galocatechin-(4 α ->8)-galocatechin-(4 α ->8)	H	<i>C. albidus</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Qa'dan et al., 2003)
(+)-galocatechin	H	H	H	OH	<i>C. albidus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Danneet al., 1994)(Qa'dan et al., 2003)
prodelphinidin B3	H	H	galocatechin	OH	<i>C. albidus</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Qa'dan et al., 2003)

<i>prodelphinidin B1</i>	H	H	<i>epigallocatechin</i>	OH	<i>C. incanus L. ssp.</i>	(Danne et al., 1994)
<i>Catechin-(4α->8)-gallocatechin</i>	H	H	<i>catechin</i>	OH	<i>C. incanus subsp. tauricus</i>	(Petereit et al., 1991)
<i>epigallocatechin-3-O-gallate-(4β->8)-gallocatechin</i>	H	H	<i>epigallocatechin-3-O-gallate</i>	OH	<i>C. incanus L. ssp.</i>	(Danne et al., 1994)
<i>gallocatechin-(4α->6)-gallocatechin-(4α->8)-gallocatechin</i>	H	H	<i>gallocatechin-(4α->8)-gallocatechin</i>	OH	<i>C. incanus L.</i>	(Mansoor et al., 2015)
<i>epigallocatechin-3-O-gallate-(4β->8)-epigallocatechin-3-O-gallate-(4β->8)-gallocatechin</i>	H	H	<i>epigallocatechin-3-O-gallate-(4β->8)-epigallocatechin-3-O-gallate</i>	OH	<i>C. incanus L.</i>	(Mansoor et al., 2015)

3.2 Χημικά συστατικά *C. creticus*

Στο *C. creticus* και ειδικότερα *C. creticus* subsp. *creticus* (*Cistus incanus* subsp. *creticus*) έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία 92 τερπένια (36 μονοτερπένια, 35 σεσκιτερπένια και 21 διτερπένια) καθώς και 2 φαινυλ-προναειδή флаβονοειδή (Papaefthimiou et al., 2014; Chinou et al., 1994).

Στο *C. creticus* subsp. *eriocephalous* έχουν περιγραφεί 47 τερπένια (17 μονοτερπένια, 19 σεσκιτερπένια, και 11 λαβδανικού τύπου διτερπένια) καθώς και 2 καρβονυλικά προϊόντα (Demetzos et al., 1997; Papaefthimiou et al., 2014).

Τερπένια (λαβδανικά διτερπένια)

Τα λαβδανικού τύπου παράγωγα: labd-13(E)-ene,8a-15-diol, labd-7,13-(E)-dien-15-ol, labd-13(E)-en-8a-ol-15-yl acetate, labd-7,13(E)-dien-15-yl acetate και ένα μίγμα ent-manoyl oxide ισομερών (ent-13-epi-manoyl oxide; ent-manoyl oxide; ent-8-epi-manoyl oxide) έχουν περιγραφεί από το εξανικό εκχύλισμα και τα αιθέρια έλαια φύλλων, καρπών και ρητίνης *C. creticus* (της αποκαλούμενης και «λάδανο») (Demetzos et al., 1990) χωρίς να δίνονται παραπάνω διευκρινίσεις για το ακριβές υποείδος από όπου απομονώθηκαν.

Πολυφαινόλες κατεχίνες :

Υπέργεια μέρη του φυτού : catechin, gallo catechin, protocatechuic acid, shikimic acid, και gallo catechin-3-gallate, καθώς και διμερή και τριμερή προανθοκυανιδινών (Demetzos et al., 1990; Danne et al., 1993; Blaschek et al., 2012; Petereit et al., 1991). χωρίς να διευκρινίζονται τα ακριβή υποείδη *Cistus creticus* από όπου απομονώθηκαν.

Φύλλα : kaempferol 3-O-beta-glucopyranoside, quercetin 3-O-beta-D-glucopyranoside, quercetin 3-O-beta-D-rutinoside, myricetin 3-O-α-L-rhamnopyranoside, myricetin 3-O-beta-D-galactopyranoside, coumarin aesculin (Demetzos et al., 1990); παράγωγα флаβονοειδών: kaempferol, quercetin, apiginin και naringenin, scopoletin (6-O-methyl-7-hydroxycoumarin) (Demetzos et al., 1990; Danne et al., 1993; Petereit et al., 1991), και εδώ επίσης δεν διευκρινίζονται τα ακριβή υποείδη *Cistus creticus* από όπου απομονώθηκαν.

Ξηρά υπέργεια μέρη του φυτού : protocatechuic and (-)-shikimic acid, epicatechin-(4β→6)-catechin, διμερείς prodelphinidins, epigallocatechin-(4β→8)-catechin και epigallocatechin-(4β→8)- gallocatechin όπως τα: epigallocatechin-3-Ogallate-(4β→8)-gallocatechin, epigallocatechin-3-O-gallate-(4β→6)-gallocatechin, gallocatechin-(4α→8)-gallocatechin-(4α → 8)-gallocatechin (Demetzos et al., 1990; Danne et al., 1993; Petereit et al., 1991).

Dane-Petereit *Cistus incanus*// demetzos *Cistus creticus* sp *creticus*

- **Αιθέρια έλαια:**

Περιέχουν μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, διτερπενικούς εστέρες και αλκοόλες ως κύρια συστατικά (α-cadinene, δ-cadinene, viridiflorol, bulnesol, ledol, α-copaene, β-selinene, cubenene, manoyloxide και 13-epi-manoyloxide) (Demetzos et al., 1989; 1997). Σε μια πρόσφατη μελέτη της χημικής σύστασης αιθέριων ελαίων *Cistus creticus* έγινε σύγκριση των χημικών συστατικών των υποειδών *corsicus* έναντι *eriocephalus* (Paolini et al., 2009). Εκεί εμφανίζεται ότι το *C. creticus* subsp. *eriocephalus* και *C. creticus* subsp. *corsicus* από τη περιοχή Κορσική-Σαρδηνία διαφοροποιούνται ως προς τα βοτανικά τους χαρακτηριστικά (απουσία η παρουσία αδενωδών τριχών) σε σχέση και με τη παραγωγή αιθερίου ελαίου αλλά και την χημική σύσταση του κλάσματος του αιθερίου ελαίου (που περιέχει limonene ή 13-epi-manoyl oxide αντίστοιχα ως κύρια συστατικά).

Υδατικά εκχυλίσματα *Cistus*

Έχει διεξαχθεί συστηματική μελέτη της πολυφαινολικής σύνθεσης υδατικών εκχυλισμάτων που προέρχονται από διάφορα είδη *Cistus*. Δεκατρία υδατικά (13) εκχυλίσματα που προέρχονται από 10 διαφορετικά είδη *Cistus* αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας HPLC με ανίχνευση συστοιχίας διόδων συζευγμένη με τεχνική φασματομετρίας μάζας ιόντων ηλεκτροψεκασμού (HPLC-DAD-ESI-MS / MS). Οι κύριες ενώσεις τους ταυτοποιήθηκαν και οι ελλαγιτανίνες προσδιορίστηκαν ποσοτικά. Τρεις κύριες ομάδες ενώσεων βρέθηκαν, ελλαγιτανίνες, φλαβονοειδή και παράγωγα φαινολικών οξέων Στο υδατικό εκχύλισμα *C. creticus* (συνώνυμο *C. incanus*) isorhamnetin-O-rutinoside; rutin; (-)-(epi)catechin; (-)-(epi)gallocatechin; quercitrin; (-)-(epi)catechin-(epi)gallocatechin dimer; διμερές (-)-(epi)gallocatechin-(epi)gallocatechin; quercetin-3- O-

rutinoside-7-O-hexoside, quercetin-3- O-(2'-caffeoyl)-rutinoside; και myricitrin αναγνωρίστηκαν ως οι πλέον άφθονες ενώσεις (Barrajón-Catalán et al., 2011).

Οι πολυφαινόλες από τέσσερα διαφορετικά εμπορικά σκευάσματα για αφεψήματα *C. creticus* (= *C. incanus*) εκχυλίστηκαν με τυποποιημένη εκχύλιση επιταχυνόμενου διαλύτη για in vitro δοκιμές και με δημιουργία παραδοσιακών εγχυμάτων για δοκιμές in situ. Και τα δύο εκχυλίσματα χαρακτηρίστηκαν ποιοτικά και ποσοτικά με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και βρέθηκε ότι μόνο η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες διέφερε ελαφρώς. Με τη βοήθεια της ανίχνευσης συστοιχίας διόδων και της φασματομετρίας μάζας, ταυτοποιήθηκαν 29 πολυφαινόλες, συμπεριλαμβανομένων των ελλαγιταννινών, φλαβονόλων και γλυκοσυλιωμένων φλαβονολών (Wittprahl et al., 2015).

Σε μη δημοσιευμένη πειραματική μελέτη (προσωπικά δεδομένα Chinou et al. 2015), προσδιορίστηκαν οι συνολικές πολυφαινόλες ενός παραδοσιακού εγχύματος και αφεψήματος από φύλλα του *C. creticus* με προέλευση τις Σίσσες (Ρεθύμνου Κρήτης) σύμφωνα με τη παραδοσιακή μέθοδο παρασκευής μιας εφάπαξ δόσης, (5 g σε 200 ml νερού). Η συγκέντρωση ολικών πολυφαινολών στα δύο υδατικά παρασκευάσματα (έγχυμα και αφέψημα) εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Gutfinger 1981). Το πείραμα διεξήχθη εις τριπλούν για τον κάθε ένα τρόπο παρασκευής. Το καφεϊκό οξύ χρησίμευσε ως πρότυπο για την παρασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης που κυμαίνεται από 0-10 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg ισοδυνάμων καφεϊκού οξέος (mg CAE / g εκχύλισμα), και μέση τιμή των τριών ληφθεισών τιμών [προσωπικά δεδομένα Χήνου και συνεργάτες].

	μg caffeic acid / ml of preparation	μg caffeic / μg extract	mg caffeic / g of extract	% caffeic acid in the preparation from 100 g plant
Έγχυμα	3.92 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.098	98.0	2.0
Αφέψημα	13.56 $\mu\text{g}/\text{m}$	0.339	339.0	9.5

3.3 Βιολογικές δράσεις εκχυλισμάτων και δευτερογενών μεταβολιτών, φυτών του γένους *Cistus*.

Τα Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά βιοσυνθέτουν και παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες στους οποίους αποδίδονται οι βιολογικές τους ιδιότητες (Williams et al., 1989). Ειδικά στη λεκάνη της Μεσογείου (Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία και Τουρκία) διάφορα φυτικά παρασκευάσματα χρησιμοποιούνται παραδοσιακά προερχόμενα από είδη *Cistus* σε ασθενείς που παρουσιάζουν πολλές διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις, όπως: περιπτώσεις άγχους, καταρροής, διάρροιας, αλλά και σε σοβαρότερες ασθένειες όπως διάφοροι τύποι καρκίνου, καρδιοπάθειες, κ.ά.

Έτσι, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την κατανόηση και μελέτη των ευεργετικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων τους. Ακολουθεί η περιγραφή των πλέον μελετημένων βιολογικών δράσεων των ειδών *Cistus* και γίνεται συσχέτιση με το χημικό περιεχόμενο των αντίστοιχων περιπτώσεων.

3.3.1 Αντιοξειδωτική δράση

Τα φυτά μπορούν να χαρακτηριστούν ως καλές πηγές για την απομόνωση ουσιών με αντιοξειδωτική δράση, διότι έχουν την δυνατότητα να παράγουν ένα μεγάλο αριθμό αντιοξειδωτικών ενώσεων προκειμένου να διαχειριστούν το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τις ηλιακές ακτίνες και το οξυγόνο. Η αντιοξειδωτική αυτή δράση, έχει τεράστια θεραπευτική σημασία σε παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με τις ελεύθερες ρίζες, όπως ο καρκίνος, η καρδιαγγειακή νόσος, η αθηροσκλήρωση και η γήρανση. Αυτό συμβαίνει διότι τα αντιοξειδωτικά έχουν τη δυνατότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα να εξαλείφουν τις δυσμενείς επιδράσεις που προκαλούνται από αυτές (Di Ferdinando et al., 2014; Martínez-Ferri et al., 2000).

Τα φυτά του γένους *Cistus* είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως έχει επιβεβαιωθεί από σχετικές μελέτες. Για παράδειγμα, η μελέτη σχετικά με τη διάσπαση του DNA έδειξε τις ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες των υδατικών εκχυλισμάτων των ειδών *Cistus incanus* (= *Cistus creticus*) και *Cistus monspeliensis*. Πιο συγκεκριμένα, τα προαναφερόμενα εκχυλίσματα μείωσαν σε σημαντικό βαθμό τις βλάβες στο DNA που

προέρχονταν από την επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου και τις υπεριώδους ακτινοβολίας (Attaguile et al., 2000).

Σύμφωνα με σχετικές μελέτες, η ικανότητα ενός φυτικού είδους να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες DPPH και ABTS σχετίζεται γραμμικά με την περιεκτικότητά του σε φαινολικά συστατικά. Έτσι, αν προσδιοριστεί η περιεκτικότητα σε φαινόλες ενός φυτικού είδους, είναι αρκετά αυτονόητες οι αντιοξειδωτικές ιδιότητές του (Ivanova et al., 2005; Piluzza and Bullitta, 2011; Soobrattee et al., 2005). Σε μία άλλη μελέτη έγινε προσπάθεια διερεύνησης της πολυφαινολικής σύνθεσης ακατέργαστου αιθανολικού εκχυλίσματος φύλλων του *C. incanus*. Μεταξύ των εμπλουτισμένων σε φαινολικές ενώσεις κλασμάτων που αναλύθηκαν, βρέθηκε ότι το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα είναι το πιο αποτελεσματικό όσον αφορά τη δραστικότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών (Gori et al., 2016). Επιπλέον, σύμφωνα με μια ερευνητική εργασία (Riehle et al., 2013a) το αφέψημα του *C. incanus* (= *Cistus creticus*) περιέχει φαινολικές ενώσεις από διαφορετικές υποκατηγορίες. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των φαινολοξέων, φλαβονοειδών καθώς και παραγώγων φλαβαν-3-όλης, και διαθέτουν έντονες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως επιβεβαιώθηκε από την μέθοδο LC-onlineTEAC (Liquid Chromatography hyphenated online with Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

3.3.2 Αντιβακτηριακή δράση

Από την αρχαιότητα, χρησιμοποιούνταν διάφορα είδη *Cistus* προκειμένου να επιτευχθεί η θεραπεία από μικροβιακές ή συστημικές λοιμώξεις (Tomás-Menor et al., 2013b). Σήμερα, αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει την αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων φυτών της οικογένειας Cistaceae έναντι Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηριδίων (Barrajón-Catalán et al., 2011b; Bedoya et al., 2009; Tomás-Menor et al., 2013a).

Σύμφωνα με μελέτες, η έκπλυση του στόματος με αφέψημα λαδανιάς συμβάλλει στη πρόληψη μολύνσεων της στοματικής κοιλότητας μειώνοντας το βακτηριακό φορτίο (Riehle et al., 2013b). Επιβεβαιώθηκε, ότι η ισχυρή αντιμικροβιακή δράση που παρουσιάζουν τα παραδοσιακά παρασκευάσματα, οφείλεται δυνητικά στη περιεκτικότητά τους σε διτερπένια τύπου λαβδανίου (Rauwald et al., 2010).

Πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μελέτη της *in vitro* αντιβακτηριακής δράσης των εκχυλισμάτων *Cistus* έναντι *Streptococcus mutans* (Wittprahl et al., 2015), ενός από τα κύρια βακτήρια πρόκλησης τερηδόνας.

Επιπλέον, η λαδανιά παρουσίασε ισχυρή αντιμυκητιασική δράση, αναστέλλοντας την ανάπτυξη του *Aspergillus parasiticus* σε ποσοστό 45,91%, ενώ το εκχύλισμα αυτού, έδειξε την υψηλότερη αποτελεσματικότητα έναντι του *A. carbonarius*, σε σχέση με άλλα εξεταζόμενα εκχυλίσματα φυτών.

Οι ελαγιτανίνες (Tomás-Menor et al., 2015), καθώς και τα φλαβονοειδή κερκετίνη και μυρικετίνη αποτελούν φυσικά προϊόντα με συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις με αντιβιοτικά έναντι Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηριδίων.

3.3.3 Κυτταροτοξική / Κυτταροστατική δράση

Σύμφωνα με μελέτη του 2012, τα εκχυλίσματα του *C. creticus subsp. creticus* παρουσιάζουν κυτταροτοξική δραστηριότητα κατά των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Αυτά που ήταν πλούσια σε διτερπένια τύπου λαβδανίου, ήταν αποτελεσματικά έναντι καρκινικών κυττάρων του τραχήλου, του στήθους καθώς και μελανωμάτων (Skorić et al., 2012).

Η ενσωμάτωση των βιοδραστικών λαβδανικών διτερπενίων σε λιποσωμικά σκευάσματα, βελτίωσε τις κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές δράσεις τους, μία διαδικασία που καθιστά τη χρήση αυτών των ενώσεων κατάλληλη για δοκιμή σε *in vivo* πειράματα (Matsingou et al., 2006; Skorić et al., 2012). Η σκλαρεόλη, ένα διτερπένιο λαβδανικού τύπου, διαθέτει αντικαρκινική δράση κατά κυτταρικών σειρών ανθρώπινου καρκίνου μαστού και ενισχύει τη δράση γνωστών αντικαρκινικών φαρμάκων (Matsingou et al., 2006). Αρκετά λαβδανικά διτερπένια απομονώθηκαν από υπέργεια τμήματα του *C. creticus* στην Ελλάδα, συμπεριλαμβανομένης της σκλαρεόλης, και δοκιμάστηκαν *in vitro* για την κυτταροτοξική δράση τους κατά καρκινικών κυττάρων ανθρώπινης σειράς ρινοφάρυγγα (KB), λευχαιμίας ποντικού (P388) και ανθρώπινων βρογχικών επιδερμοειδών καρκινωμάτων (NSCLC, N6L16) (Chinou et al., 1994). Ανάμεσα στα διτερπένια που ελέγχθηκαν, η λαβδ-13- εν-8α-15-διόλη ήταν το μόνο αδρανές συστατικό.

Σε μία άλλη μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα ειδών του γένους *Cistus* έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών του ανθρώπινου μαστού (MCF-7) και παχέος εντέρου (LOVO), παρατηρήθηκε ελάττωση των καρκινικών κυττάρων, καθώς και σε σειρές ανθεκτικές σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα όπως η δοξορουβικίνη, ενώ προκλήθηκε και ενισχύθηκε το φαινόμενο της απόπτωσης στις εξεταζόμενες καρκινικές κυτταρικές σειρές με σημαντικά υψηλότερη προαποπτωτική δράση να εμφανίζεται σε ευαίσθητα παρά σε ανθεκτικά σε φάρμακα κύτταρα, σε συσχέτιση με την παρουσία του φλαβονοειδούς μυρικετίνης. Ταυτόχρονα η κυτταρική ανάπτυξη των φυσιολογικών κυτταρικών καλλιέργειών δεν επηρεάστηκαν καθόλου από τα εκχυλίσματα, γεγονός που προσδίδει ασφάλεια στη χρήση της λαδανιάς (Moreira et al., 2017).

Σε μία άλλη δημοσίευση, μελετήθηκαν λυοφιλοποιημένα υδατικά εκχυλίσματα *Cistus incanus* L. (= *Cistus creticus*) και *Cistus monspeliensis* L., ως προς την πιθανή κυτταροτοξική δράση τους σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα προστάτη (PZ-HPv-7) και κύτταρα καλοήθους υπερπλασίας (ΚΥΠ) PNT1A. Η επίδραση εκχυλίσματος *Cistus* σε κυτταρικές σειρές προστάτη είχε ως αποτέλεσμα τόσο την αναστολή της ανάπτυξης όσο και τη σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Επίσης, αναφέρθηκε ότι οι πολυφαινολικές ουσίες που υπάρχουν στα εκχυλίσματα *Cistus* αποτελούν τις πιθανότερα τις βιοδραστικές ουσίες στη θεραπεία της ΚΥΠ (Vitali et al., 2011).

3.3.4 Σπασμολυτική δράση

Η παρουσία συστατικών με χαλαρωτικές ιδιότητες των λείων μυών από υδατικά εκχυλίσματα *Cistus* είναι εν μέρει συμβατή με τη παραδοσιακή χρήση του φυτού στη λαϊκή ιατρική για τη συμπτωματική ανακούφιση ήπιων γαστρεντερικών διαταραχών. Όπως έχει προαναφερθεί, τα εκχυλίσματα *Cistus* χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στις μεσογειακές χώρες για τη θεραπεία διάρροιας, πεπτικών ελκών.. Πειραματικά, οι μυοχαλαρωτικές επιδράσεις των υδατικών εκχυλισμάτων *C. incanus* (= *Cistus creticus*) και *C. monspeliensis* επιβεβαιώθηκαν με *in situ* πειράματα ινοβλάστες ειλεού και αορτής αρουραίων (Attaguile et al., 2004). Είναι αρκετά πιθανό οι μυοχαλαρωτικές δράσεις του *Cistus incanus* (= *Cistus creticus*) να σχετίζονται με την παρουσία μεγάλου ποσοστού πολυφαινολικών ενώσεων και κυρίως φλαβονοειδών, δεδομένου ότι είναι γνωστό πως τα φλαβονοειδή περιορίζουν την εντερική κινητικότητα *in vitro* (Attaguile et al., 2004). Οι πολυφαινολικοί δευτερογενείς μεταβολίτες (φλαβονόλες, κερκετίνη, καιμπφερόλη, 3-

μεθυλαιθέρας της καιμπερόλη, μυρικετίνη, προανθοκυανιδίνες), μπορούν να δρουν συνεργιστικά, προσδίδοντας στα υδατικά εκχυλίσματα *Cistus* βιοδραστικότητα.

3.3.5 Δράση έναντι δερματικών παθήσεων

Για την μελέτη των επιδράσεων του αφεψήματος φύλλων *Cistus* στην ατοπική δερματίτιδα, έγινε κλινική μελέτη όπου συμμετείχαν 95 παιδιά για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων. Όλα τα παιδιά της κλινικής μελέτης είχαν συμπτώματα της ασθένειας για περισσότερο από τα τρία τέταρτα της ζωής τους. Για την παρασκευή του ροφήματος πραγματοποιήθηκε βρασμός των φύλλων για πέντε λεπτά και ακολούθησε διήθηση. Οι περιοχές του δέρματος που τα παιδιά είχαν προσβληθεί πλένονταν δύο φορές την μέρα με το αφέψημα των φύλλων, ενώ αυτό αφηνόταν να ξεραθεί επάνω στο δέρμα. Επιπλέον, ένα ποτήρι ροφήματος από *Cistus* καταναλωνόταν καθημερινά. Μετά από περίπου δύο εβδομάδες, το 80% των παιδιών επέδειξε αξιοσημείωτη βελτίωση, ενώ το 64% παρουσίασε πλήρη ίαση των συμπτωμάτων (Reuter et al., 2010).

3.3.6 Αντική δράση

Σε δύο μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το 2007, περιεγράφηκε η αντική δράση ενός εκχυλίσματος του φυτού *C. incanus* (CYSTUS052) (= *Cistus creticus*) κατά των μολύνσεων από ιό γρίπης Α (Droebner et al., 2007; Ehrhardt et al., 2007). Επίσης μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς που υπέφεραν από επώδυνα συμπτώματα στοματικής λοίμωξης και αρχόμενων συμπτωμάτων στο λαιμό, ανέδειξε την αποτελεσματικότητα του εκχυλίσματος *Cistus* (Ulrich Kalus, 2009). Σε μια άλλη τυχαίοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο διπλή τυφλή κλινική δοκιμή, αποδείχθηκε ότι το *Cistus* ήταν πιο αποτελεσματικό στη μείωση της μέσης διάρκειας και σοβαρότητας των συμπτωμάτων σε ασθενείς με λοίμωξη της ανώτερης αναπνευστικής οδού σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (placebo) (Kalus et al., 2009). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η αντική δράση του εκχυλίσματος CYSTUS052 διαπιστώθηκε μόνο όταν το εκχύλισμα CYSTUS052 χορηγήθηκε πριν από τη μόλυνση με ιό. Αντιθέτως, όταν το ίδιο εκχύλισμα χορηγήθηκε παράλληλα ή μετά από προκληθείσα λοίμωξη από τον ιό, δεν εμφανίσθηκε κανένα αντικό αποτέλεσμα.

Σε μία άλλη έρευνα παρουσιάστηκε η ισχυρή αντική δράση του εκχυλίσματος του είδους *Cistus incanus* (= *Cistus creticus*) έναντι του ιού HIV και επισημάνθηκε ότι το εκχύλισμα

στοχεύει σε συστατικά της ιϊκής κάψας, εμποδίζοντας την πρόσδεση των σωματιδίων του ιού στα κύτταρα (Rebensburg et al., 2016). Μια σειρά πειραμάτων που σχεδιάστηκαν για να διερευνηθούν το μηχανισμό της αντιικής δράσης του εκχυλίσματος αποκάλυψαν ότι το εκχύλισμα εμποδίζει τον ιό να αλληλεπιδράσει με τα κύτταρα ξενιστές. Το εκχύλισμα *Cistus* παρεμπόδισε την εισχώρηση του ιικού RNA σε κύτταρα, αποδεικνύοντας ότι το εκχύλισμα δρα κυρίως στο στάδιο εισόδου του ιού στα κύτταρα. Αυτή η μελέτη επίσης απέδειξε ότι τα συστατικά του *Cistus* στοχεύουν τις πρωτεΐνες της ιϊκής κάψας και παρουσιάζουν επιλεκτικότητα σε αυτές έναντι των κυτταρικών συστατικών. Ο πιθανός μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει την παρεμπόδιση της προσκόλλησης του ιού στα κύτταρα, με επιλεκτική στόχευση στις γλυκοπρωτεΐνες του ιϊκού περιβλήματος. Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η θεραπεία με *Cistus* αποτρέπει την πρωταρχική προσκόλληση σωματιδίων ιού σε κύτταρα, έναν μηχανισμό δράσης που προσδίδει μέγιστη προστασία των κυττάρων-ξενιστών από την προσβολή από ιούς. Το εκχύλισμα *Cistus* συνδυάζει ευρεία αντι-ιική δραστηριότητα με χαμηλό κίνδυνο αντοχής σε ιούς.

3.3.7 Επουλωτική δράση

Εξετάστηκε η πιθανή *In vivo* προστατευτική επίδραση αφεψήματος *Cistus incanus* (= *Cistus creticus*) σε αρσενικούς αρουραίους (Attaguile et al., 1995), σε γαστρικές αλλοιώσεις που προκλήθηκαν με αιθανόλη, ινδομεθακίνη, ρεσερπίνη και σεροτονίνη. Το υδατικό εκχύλισμα έδειξε αντιθρομβωτική δραστηριότητα σε όλα τα προαναφερθέντα μοντέλα και βρέθηκε ότι έχει σημαντικά προστατευτικά αποτελέσματα σε σχέση με τη δόση σε όλα αυτά τα πειραματικά μοντέλα (Attaguile et al., 1995).

3.3.8 Αντιφλεγμονώδης δράση

Το αφέψημα από ξηρά φύλλα *C. creticus* εμφάνισε δόσοεξαρτώμενη αναστολή της *In vitro* ενζυματικής δραστηριότητας τόσο της αλανυλο αμινοπεπτιδάσης όσο και της διπεπτιδυλοπεπτιδάσης IV (Lendeckel et al., 2002).

Η αντιφλεγμονώδης δραστηριότητα των εκχυλισμάτων *Cistus incanus* (πιθανώς *ssp. tauricus*) δοκιμάστηκε *in vivo* σε αρουραίους με οίδημα ποδός που προκαλείται από δεξτράνη (Petereit et al., 1991). Όλα τα εκχυλίσματα έδειξαν μικρή δραστηριότητα (Petereit et al, 1991).

3.3.9 Κλινικές μελέτες

In situ πειράματα έδειξαν ότι οι στοματικές πλύσεις με εγχύματα *C. incanus* (= *Cistus creticus*) μείωσαν τον αρχικό βακτηριακό αποικισμό της στοματικής κοιλότητας για περισσότερο από οκτώ ώρες. (Wittpahl et al., 2015)

Μια κλινική μελέτη (Kalus et al., 2009) αναπτύχθηκε, και συμμετείχαν 160 ασθενείς (ηλικίας 7-81 ετών), που υπέφεραν από λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος με αντίστοιχα κλινικά συμπτώματα. Το εξεταζόμενο προϊόν (παστίλιες) περιείχε το CYSTUS052, ένα υδατικό εκχύλισμα του *C. creticus* (syn *Cistus incanus*), σιρόπι καλαμποκιού, μπανάνα, τεύτλα (παντζάρια) και λάδι από τριαντάφυλλο. Οι παστίλιες με εικονικό φάρμακο (placebo) περιείχαν όλα τα προηγούμενα συστατικά εκτός από λαδανιά. Από τους 160 συμμετέχοντες στη μελέτη (56 άνδρες και 104 γυναίκες), 129 ασθενείς ολοκλήρωσαν τη μελέτη, το 82,5% της ομάδας *Cistus* και το 80,0% της ομάδας του εικονικού φαρμάκου. Βρέθηκε ότι 92 (57,5%), εθελοντές είχαν ιογενή λοίμωξη (11 ασθενείς με γρίπη Α και 7 ασθενείς με γρίπη Β) και 67 (41,8%) βακτηριακή λοίμωξη. Σε όλα τα άτομα που συμμετείχαν δόθηκαν τυχαία είτε σε 6 × 2 δισκία CYSTUS052 ημερησίως (περίπου 220 mg πολυφαινόλες, ένα υδατικό εκχύλισμα CYSTUS052 με περιεκτικότητα άνω των 18 mg πολυφαινολών ανά παστίλια) είτε εικονικό φάρμακο (placebo). Οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν και υποβλήθηκαν σε θεραπεία μέχρι 7 ημέρες. Στη ομάδα των ασθενών με διαγνωσμένη ίωση η βαθμολογία των υποκειμενικών συμπτωμάτων μειώθηκε σημαντικά ($p < 0.001$). Η χρονική περίοδος, κατά την οποία το φάρμακο πέτυχε βελτίωση των κλινικών συμπτωμάτων, ήταν σημαντικά μικρότερη για το *Cistus* απ' ότι για το εικονικό φάρμακο. Εξακολουθεί να παραμένει ασαφές το πώς το εκχύλισμα *Cistus* από του στόματος (*per os*) συνέβαλε στη μείωση της εξάπλωσης του ιού της γρίπης στο ανώτερο αναπνευστικό. Ένας τρόπος δράσης μπορεί να είναι η πρόληψη της επαναμόλυνσης από τα σωματίδια του ιού στην ρινοφαρυγγική κοιλότητα. Συμπερασματικά, το *Cistus* ήταν πιο αποτελεσματικός στη μείωση της μέσης διάρκειας και της σοβαρότητας των συμπτωμάτων σε ασθενείς με λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού σωλήνα από το εικονικό φάρμακο.

Σε μια άλλη μελέτη (Kalus et al., 2010), 300 περιπατητικοί εθελοντές (ηλικίας 5-85 ετών) συμμετείχαν σε τυχαίοποιημένη, ανοιχτή δοκιμαστική μελέτη. 141 ασθενείς τοποθετήθηκαν τυχαία στην ομάδα CYSTUS052® και 136 στην ομάδα πράσινου τσαγιού.

Όλα τα υπό εξέταση άτομα υποβλήθηκαν σε θεραπεία είτε με 6 × 2 δισκία CYSTUS052® ημερησίως (περίπου 220 mg πολυφαινόλες) είτε με πράσινο τσάι. Την πρώτη ημέρα της θεραπείας, τα άτομα υποβλήθηκαν σε κατάποση οκτώ φορές 100 ml πράσινου τσαγιού (περίπου 480 mg πολυφαινολών) και στις επόμενες 3 ημέρες, τέσσερις φορές ημερησίως (περίπου 220 mg πολυφαινόλες). Η θεραπεία άρχισε κατά το πρώτα σημάδια κλινικών συμπτωμάτων. Οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν και υποβλήθηκαν σε θεραπεία για έως και 7 ημέρες. Από τους 300 συμμετέχοντες σε αυτή τη μελέτη (76 άνδρες και 224 γυναίκες), 277 ασθενείς ολοκλήρωσαν τη μελέτη, ενώ το 6% (9/150) της ομάδας CYSTUS052® και 9,3% (14/150) της ομάδας πράσινου τσαγιού δεν ολοκλήρωσαν η μελέτη. Μία σαφής βελτίωση των συμπτωμάτων στην ομάδα CYSTUS052® παρατηρήθηκε σε 57,8% (160/277) των ασθενών μετά από κατά μέσο όρο 3,2 ημέρες. Μια σύγκριση των μεμονωμένων παραμέτρων δείχνει ότι στην ομάδα CYSTUS052® το επίπεδο σοβαρότητας μειώθηκε σε όλες τις παραμέτρους [βαρύτητα βήχα και συχνότητα, ρινόρροια κλπ] για τους 277 ασθενείς που αναλύθηκαν, ενώ στην ομάδα του πράσινου τσαγιού, η ένταση του πόνου μειώθηκε πολύ ελαφρά. Περίπου 24,9% (69/277) των ασθενών παραπονέθηκαν για ανεπιθύμητες ενέργειες, περισσότερο στην ομάδα του πράσινου τσαγιού με 35,3% (48/136) από ό, τι στην ομάδα CYSTUS052® με 14,9% (21/141) ($p < 0,001$, ακριβής δοκιμασία Fishers). Οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν η ναυτία και η ζάλη

3.3.10 Ανεπιθύμητες ενέργειες

Δύο αναφορές περιπτώσεων σχετικά με την αλλεργιογένεση από *Cistus* (ένα για το *Cistus creticus* και ένα για το *Cistus ladaniferous*, αντίστοιχα) έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα (English & Cronin, 1988, Garcia-Gonzalez et al., 2001).

Μια νοικοκυρά ηλικίας 53 ετών που ανέπτυξε δερματίτιδα των καρπών και των αστραγάλων που είχαν αρχίσει και επιμένει κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών (English & Cronin, 1988). Παραπονέθηκε για ένα παρόμοιο εξάνθημα το προηγούμενο καλοκαίρι.

Ένας 32χρονος μηχανικός με προηγούμενο ιστορικό ατοπικής ρινίτιδας λόγω ακάρεων οικιακής σκόνης αναφέρθηκε (Garcia-Gonzalez et al., 2001). Εμφάνισε δερματίτιδα και στα δύο χέρια αφού ξεκίνησε ένα νέο οικοδομικό έργο στην ύπαιθρο. Ο άνθρωπος ήταν

επίσης ερασιτέχνης βοτανολόγος, και αφού αναγνώριζε τα φυτά που περιβάλλουν την περιοχή εργασίας του, υποψιαζόταν ότι το *Cistus ladanifer* θα μπορούσε να είναι η αιτία. (Cvitanović et al., 2004)

3.3.11 Βιολογικές δράσεις ρητίνης λαδάνου

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την αξιολόγηση των φαρμακολογικών ιδιοτήτων της ρητίνης που εκκρίνεται από τα φύλλα ειδών *Cistus*. Αξιοσημείωτη είναι η αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική δράση του αιθερίου ελαίου ορισμένων ειδών *Cistus* (Chinou et al., 1994; Demetzos et al., 1995, 1990), ενώ τα διτερπένια τύπου λαβδανίου εκτός της αντιμικροβιακής, έχουν επιδείξει και εξαιρετική γαστροπροστατευτική δράση (Caruso et al., 1995). Σύγχρονες μελέτες έδειξαν ότι τα λαβδανικά διτερπένια, όπως η σκλαρεόλη, που αποτελούν τα βασικά συστατικά της ρητίνης και του αιθερίου ελαίου παρουσιάζουν αντιπηκτική, αντιοξειδωτική (Attaguile et al., 2000; Barraji3n-Catal3n et al., 2010; Gabriele et al., n.d.), αντισηπτική, αντι-ελκωτική (Yeşilada et al., 1997), αντική (Chon, 2012; Droebner et al., 2007; Ehrhardt et al., 2007; Rebensburg et al., 2016), βακτηριοκτόνο (Chinou et al., 1994; Demetzos and Dimas, 2001; Kalproutzakis et al., 1998; Tomás-Menor et al., 2013a), μυκητοκτόνο (Karim et al., 2016), γαστροπροστατευτική (Caruso et al., 1995), αιμοστατική, μυοχαλαρωτική (Attaguile et al. 2004), καθαρική, καταπραϋντική, σπασμολυτική (Attaguile et al., 2004) και αντιλεϊσμανιακή (Fokialakis et al., 2006) δράση . Πιο πρόσφατες εκτεταμένες μελέτες που διεξήχθησαν σε ένα σημαντικό αριθμό διτερπενίων τύπου λαβδανίου, ημισυνθετικά ή φυσικώς απαντώμενα, ανέδειξαν τη σημαντική κυτταροτοξική και κυτταροστατική δραστικότητα έναντι ανθρώπινων λευχαιμικών και άλλων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Chinou et al., 1994; Matsingou et al., 2006; Skorić et al., 2012; Vitali et al., 2011). Επίσης, αποδείχθηκε ότι τα απομονωμένα διτερπένια τύπου λαβδανίου από τα είδη *Cistus* παρεμβαίνουν στις βιοχημικές οδούς απόπτωσης, καθώς και στην έκφραση αρκετών ογκογονιδίων (Dimas et al., 2001). Σύμφωνα με μία άλλη μελέτη, το διτερπένιο λαβδανικού τύπου που απομονώθηκε από τη ρητίνη του *C. creticu subsp. creticus*, όπως η λαβδ-13-εν-8α-15-διόλη, ήταν δραστικό έναντι 13 από τις 14 μελετηθείσες κυτταρικές σειρές, ενώ η λαβδ-7,13-διέν-15-όλη έδειξε δραστικότητα μόνο σε κύτταρα ανθρώπινης προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL60 (Dimas et al., 1998).

3.3.12 Άλλες δράσεις

Η δράση των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων που παρελήφθησαν από επτά φυτά της Τουρκίας, τα οποία χρησιμοποιούνται στη λαϊκή ιατρική για τη θεραπεία γαστρικών παθήσεων περιλαμβανομένων των πεπτικών ελκών, μελετήθηκαν ως προς τη δράση τους έναντι του *Helicobacter pylori* (Yeşilada et al., 1999).

Τα αποτελέσματα άλλων μελετών έδειξαν ότι οι δευτερογενών μεταβολιτών από τα είδη *Cistus* μπορούν να αποτελέσουν αποτελεσματικούς παράγοντες για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών παθήσεων (Loizzo et al., 2013).

Ακόμα, απομονωμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες του *Cistus creticus subsp. creticus* αξιολογήθηκαν έναντι των προ-μαστιγωτών του *Leishmania donovani*, που αποτελούν τον αιτιολογικό παράγοντα για τη σπλαχνική λειψμανίαση. Μεταξύ των ουσιών που μελετήθηκαν, η 18-ακετοξυ-cis-κλεροδ-3-εν-15-όλη επέδειξε την πιο ισχυρή και επιλεκτική αντιλειψμανιακή δραστηριότητα (Fokialakis et al., 2006).

Πειραματικό Μέρος

4. Γενικές Χρωματογραφικές τεχνικές

4.1 Αναλυτική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Analytical Thin Layer Chromatography - Analytical TLC)

Μια βασική αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται τόσο για τον έλεγχο συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων και το διαχωρισμό τους, είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography - TLC) (Jork et al., 1990). Η χρωματογραφία αυτή, στηρίζεται στην αρχή προσρόφησης (adsorption), κατά την οποία μία ουσία μεταφέρεται και συσσωρεύεται από ένα ρευστό στην επιφάνεια ενός στερεού. Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο, γίνεται χρήση μιας μεταλλικής, γυάλινης ή πλαστικής πλάκας επικαλυμμένης με προσροφητικά υλικά, όπως το διοξείδιο του πυριτίου, το οξείδιο του αλουμινίου και την κυτταρίνη. Τα υλικά αυτά αποτελούν την στατική φάση.

Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία, τα δείγματα ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε πλάκες αλουμινίου και διάφορα συστήματα ανάπτυξης διαλυτών.

- Πλάκες αλουμινίου με επίστρωση γέλης πυριτίου silica gel με δείκτη φθορισμού (Kieselgel 60 F254) διαστάσεων 20x20cm.
- Πλάκες αλουμινίου με επίστρωση γέλης πυριτίου αντίστροφη φάσης silica gel RP-18 με δείκτη φθορισμού (Kieselgel 60 F254) διαστάσεων 20x20cm.
- Πλάκες αλουμινίου με επίστρωση κυτταρίνης διαστάσεων 20x20cm

Αρχικά, τοποθετείται μικρή ποσότητα των διαλυμάτων των προς ανάλυση δειγμάτων στην επιφάνεια της πλάκας, και στη συνέχεια, η πλάκα τοποθετείται σε θάλαμο ο οποίος έχει κορεσθεί με τον κατάλληλο διαλύτη ανάπτυξης (κινητή φάση). Σε αυτό το σημείο, η κινητή φάση ξεκινά να ανέρχεται σταδιακά λόγω του τριχοειδούς φαινομένου, ενώ με την κίνησή της αυτή παρασύρει τα συστατικά του δείγματος. Οι ουσίες τείνουν να κατανέμονται σε διαφορετικές ζώνες της πλάκας, με τις πιο ισχυρά προσροφούμενες να διατηρούνται στη βάση και εκείνες με μικρότερη συγγένεια με το προσροφητικό μέσο σε υψηλότερα επίπεδα (Mann and Saunders, 1960).

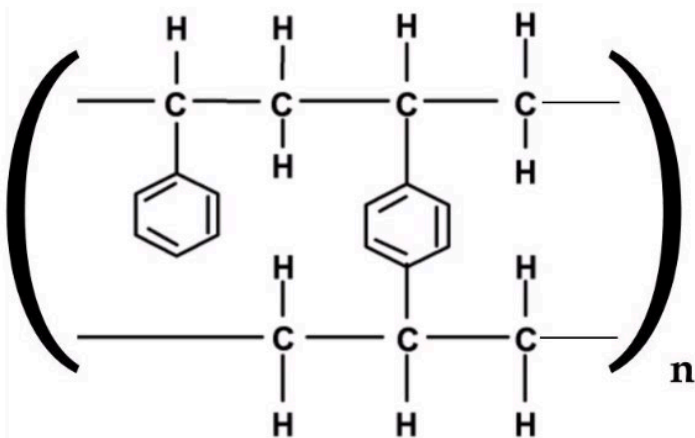
Εμφάνιση χρωματογραφημάτων

Μετά την ανάπτυξη των πλακών ακολουθεί η παρατήρησή τους σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας σε μήκη κύματος 254nm και 366nm και στη συνέχεια ο ψεκασμός των πλακών γέλης πυριτίου με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης (50/50, βανιλίνη σε MeOH 95% / H₂SO₄ σε MeOH 95%) και σύντομη θέρμανση των πλακών σε θερμοκρασία ~300°C. Για την εμφάνιση των κηλίδων επί πλακών κυτταρίνης πραγματοποιείται ψεκασμός με διάλυμα Naturstoff (1% μεθανολικό διάλυμα της αιθανολαμίνης του διφαινυλο-βορικού οξέος). Στη συνέχεια θερμαίνεται ήπια και ελέγχεται με ορατή και υπεριώδη ακτινοβολία.

4.2 Ρητίνη Προσρόφησης XAD-4

Οι μη πολικές ρητίνες XAD χρησιμοποιούνται γενικά για την προσρόφηση οργανικών ουσιών από υδατικά συστήματα και πολικούς διαλύτες. Οι περισσότερες ρητίνες XAD

είναι μη πολικές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα εύρος τιμών pH 0-14, με μέγιστη θερμοκρασία χρήσης τους 250 °C.



Εικόνα 18 Δομή πολυμερούς XAD-4

Το Amberlite XAD 4 είναι ένα πολυμερές προσροφητικό, το οποίο διατίθεται εμπορικά με τη μορφή λευκών αδιάλυτων σφαιριδίων. Είναι ένα μη ιονικό, σταυροειδώς συνδεδεμένο πολυμερές, το οποίο

οφείλει τις ιδιότητες προσρόφησης του στη μακρόπορη δομή του, στη μεγάλη προσροφητική του επιφάνεια και στην αρωματική φύση της επιφάνειάς του. Αυτή η δομή ([Εικόνα 18](#)) δίνει στο προσροφητικό πολυμερές Amberlite XAD-4 εξαιρετική φυσική, χημική και θερμική σταθερότητα. Το πολυμερές Amberlite XAD-4 μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων, σε στήλες ή λουτρά, για την προσρόφηση ακόμα και υδρόφοβων μορίων από πολικούς διαλύτες ή πτητικών οργανικών ενώσεων από ρεύματα ατμών. Η χαρακτηριστική κατανομή μεγέθους πόρων

καθιστά το Amberlite XAD 4 μια εξαιρετική επιλογή για την προσρόφηση οργανικών ουσιών σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους (Sulaymon and Ebrahim, 2010).

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ρητίνης Amberlite XAD-4

Χαρακτηριστικά	XAD-4
Συμπολιμερισμός	Στυρολίου - διβινυλβενζολίου
Ειδική επιφάνεια (m ² /g)	750
Πορώδες (cm/cm ³)	0.65 – 0.70
Ολική πυκνότητα (g/cm ³)	0.62 – 0.63
Μέγεθος κόκκων (mm)	0.3– 1.2

4.3 Χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού (Sephadex LH-20)

Υγρή–στερεή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (ή χρωματογραφία μοριακής διήθησης ή χρωματογραφία μοριακής διαπερατότητας).

Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (molecular exclusion chromatography), είναι μία χρωματογραφική μέθοδος κατά την οποία τα μόρια του δείγματος διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, με τα μεγάλα μόρια να εξέρχονται πρώτα. Η στατική φάση είναι στερεή και η κινητή φάση είναι υγρή (υδατικό ή οργανικό διαλύτη). Ο διαχωρισμός των ενώσεων γίνεται κυρίως σε στήλες που έχουν σαν υλικό πλήρωσης ένα άκαμπτο πορώδες υλικό (γέλη, gel) το οποίο αποτελείται από μικρά σφαιρίδια. Οι διάφορες ποικιλίες των γελών διαχωρίζουν τα μόρια ως προς το μοριακό τους μέγεθος, με τη διαδικασία του κοσκινίσματος (sieving) ή της διήθησης (filtration).

Το πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20, αποτελεί ένα χρωματογραφικό μέσο που στηρίζεται στην αρχή μεθόδου του μοριακού αποκλεισμού. Είναι ένα κοκκώδες υλικό που αποτελείται από δεξτράνιο σταυρωτά συνδεδεμένο, το οποίο έχει υδροξυπροπυλιωθεί αποκτώντας έτσι τόσο υδρόφιλο όσο και λιπόφιλο χαρακτήρα. Το Sephadex LH-20 είναι ένα μέσο κατάλληλα σχεδιασμένο για το διαχωρισμό φυσικών προϊόντων με βάση το μοριακό τους βάρος και με την επιλογή των κατάλληλων διαλυτών αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για το διαχωρισμό δευτερογενών μεταβολιτών από φυτικά εκχυλίσματα.

Το Sephadex LH-20 χαρακτηρίζεται από:

- Μοναδική χρωματογραφική εκλεκτικότητα λόγω διπλής φύσης του υλικού (υδρόφιλο και λιπόφιλο χαρακτήρα)
- Εύκολη πρόβλεψη της συμπεριφοράς έκλουσης με βάση τη χημική δομή του δείγματος
- Χημική και φυσική σταθερότητα
- Εξαιρετική επαναληψιμότητα (Attimarad et al., 2011)

5. Φασματοσκοπικές τεχνικές

5.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ή φασματοσκοπία NMR είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως στη χημεία φυσικών προϊόντων. Αρχικά το δείγμα τοποθετείται σε ένα ισχυρό εξωτερικό μαγνητικό πεδίο και οι πυρήνες των ατόμων των υπό μελέτη ενώσεων αφήνονται να απορροφήσουν και να εκπέμψουν ξανά ακτινοβολίες στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (RF). Το σήμα RF που εκπέμπεται από τους πυρήνες κατά τη διάρκεια ενός πειράματος NMR ονομάζεται σήμα NMR ή σήμα FID (ελεύθερη αποσύνθεση επαγωγής) και περιέχει πληροφορίες σχετικά με το δείγμα. Οι συχνότητες που υπάρχουν στο καταγεγραμμένο σήμα NMR μπορούν να αξιολογηθούν αφού επεξεργαστούν με μια τεχνική που ονομάζεται μετασχηματισμός Fourier (FT), η οποία καταλήγει σε ένα φάσμα NMR. Οι τιμές των συχνοτήτων των κορυφών εξαρτώνται από τη φύση των πυρήνων από τους οποίους εκπέμπονται καθώς και από το χημικό τους περιβάλλον, ενώ η ένταση (ή το ολοκλήρωμα) μιας κορυφής είναι ανάλογη του αριθμού των πυρήνων που ανιχνεύονται σε αυτή τη συχνότητα (Johnson Jr., 1999).

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Bruker DRX 400MHz, προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των ουσιών που απομονώθηκαν.

Οι χημικές μετατοπίσεις δίνονται σε τιμές δ (ppm), ενώ οι σταθερές σύζευξης J σε (Hz). Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως s (απλή), brs (ευρεία απλή), d (διπλή), t (τριπλή), q (τετραπλή), dd (διπλή-διπλή) και m (πολλαπλή), ενώ οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη των φασμάτων ήταν η δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD) και το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d₆).

5.2 Μέθοδος Ανάλυσης (GC-MS)

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε αέριο χρωματογράφο Hewlett-Packard 6890, συνδεδεμένο με φασματοφωτόμετρο μάζας Hewlett-Packard 5973 πρόσπτωσης ηλεκτρονίων (electron impact, EI) με ενέργεια ιονισμού 70eV. Ο αέριος χρωματογράφος είναι εξοπλισμένος με έναν split/splitless εγχυτήρα με λόγο διαχωρισμού 1/10 και με τριχοειδή στήλη DP5 μήκους 30m, εσωτερικής διαμέτρου 0,25mm και πάχους 0,25 μ m. Η θερμοκρασία στο θάλαμο εισαγωγής δείγματος ήταν 200°C, και το φέρον αέριο ήταν He.

Η ταυτοποίηση έγινε με χρήση της βιβλιοθήκης Wiley275 και με βιβλιογραφικά δεδομένα. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το παρακάτω:

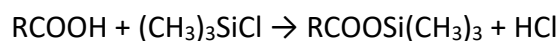
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα : Η αρχική θερμοκρασία ήταν 100°C και στη συνέχεια αυξάνεται με ρυθμό 4°C/min μέχρι μέγιστης θερμοκρασίας 300°C. Συνολικός χρόνος ανάλυσης t=52min. Η ταχύτητα ροής του He είναι 0,7mL/min.

Σιλυλίωση

Η σιλυλίωση χρησιμοποιείται προκειμένου τα περιεχόμενα συστατικά να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα και να μπορέσουν να εισέλθουν για ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο. Αυτό επιτυγχάνεται με εισαγωγή ομάδων $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ $-\text{SiH}(\text{CH}_3)_2$ σε ενεργά H (-OH, -COOH, -NH₂, -NH, -SH).

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: σε ποσότητα 5mg ξηρού δείγματος προστίθενται 50μL άνυδρης πυριδίνης και 75μL BSTFA [bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide] και ακολουθεί θέρμανση στους 80° C για 20 min.

Η αντίδραση της σιλυλίωσης φαίνεται παρακάτω:



5.3 LC-MS (High Resolution liquid chromatography mass spectrometry)

Τα φάσματα LC-MS λήφθηκαν σε ένα μηχάνημα Q-TOF (Time of Flight Mass Spectrometry) Bruker Maxis Impact. Ως αέριο σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε το άζωτο, ενώ για τα πειράματα Auto MS χρησιμοποιήθηκε ιονισμός με ηλεκτροψεκάσμο (ESI) θετικού τύπου. Η λήψη των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση δεδομένων από την Bruker Daltonics (έκδοση 4.1). Για την χρωματογραφική μελέτη χρησιμοποιήθηκε μια στήλη Chromolith RP (100-4,6 mm, Merck). Η κινητή φάση ήταν ένα μίγμα MeOH/H₂O (80/20, v/v) με ρυθμό ροής 0,3ml/min.

Πειραματική Διαδικασία

6. Παρασκευή αφεψήματος *Cistus creticus* subsp. *creticus*

Αρχικά έγινε συλλογή ποσότητας φυτού *Cistus creticus* από την Κρήτη (Σίτσες Ρεθύμνου) και την Μυτιλήνη (Κράτηγος) και ξηρανθηκαν. Ζυγίστηκαν 10g από κάθε περιοχή και πραγματοποιήθηκε βρασμός σε 200mL H₂O για την παρασκευή του αφεψήματος. Στη συνέχεια, ακολούθησε διήθηση και πραγματοποιήθηκε λυοφιλοποίηση των δειγμάτων.

Αρχική Ποσότητα δείγματος (g)	Αρχική Ποσότητα δείγματος (g)
Ρέθυμνο	Μυτιλήνη
1,618	1,459



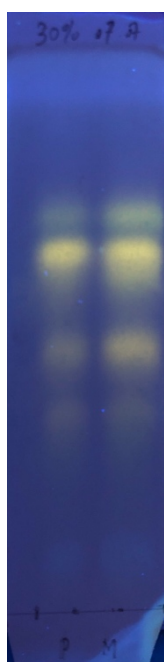
Εικόνα 18 Λυοφιλοποιημένα δείγματα *Cistus creticus* από Ρέθυμνο και Μυτιλήνη

7. Έλεγχος Εκχυλισμάτων

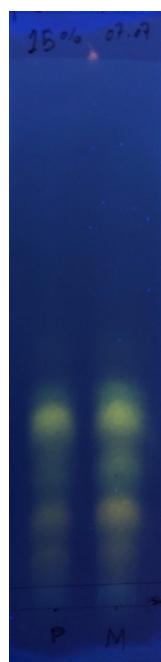
7.1 Αναλυτική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)

Τα δείγματα ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε πλάκες αλουμινίου και διάφορα συστήματα ανάπτυξης διαλυτών. Από τις διαφορετικές επιστρώσεις πλάκες αλουμινίου που δοκιμάστηκαν (βλ. Χρωματογραφικές Τεχνικές) επιλέχθηκε η πλάκα με επίστρωση κυτταρίνης, καθώς ήταν αυτή με την καλύτερη παρουσίαση των ζωνών των διαφορετικών μεταβολιτών των εκχυλισμάτων. Τα συστήματα ανάπτυξης διαλυτών που επιλέχθηκαν ήταν το 30% και το 15% οξικό οξύ, ενώ άλλα ενδεικτικά συστήματα που δοκιμάστηκαν χωρίς ικανοποιητικά αποτελέσματα ήταν το 90/10 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$), το 80/20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$) και το 50/50 ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$).

Για την εμφάνιση των παραπάνω χρωματογραφημάτων επί κυτταρίνης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Naturstoff (1% μεθανολικό διάλυμα της αιθανολαμίνης του διφαινυλο-βορικού οξέος), με παρατήρηση σε ορατή και υπεριώδη ακτινοβολία



Σύστημα ανάπτυξης TLC:
30% οξικό οξύ



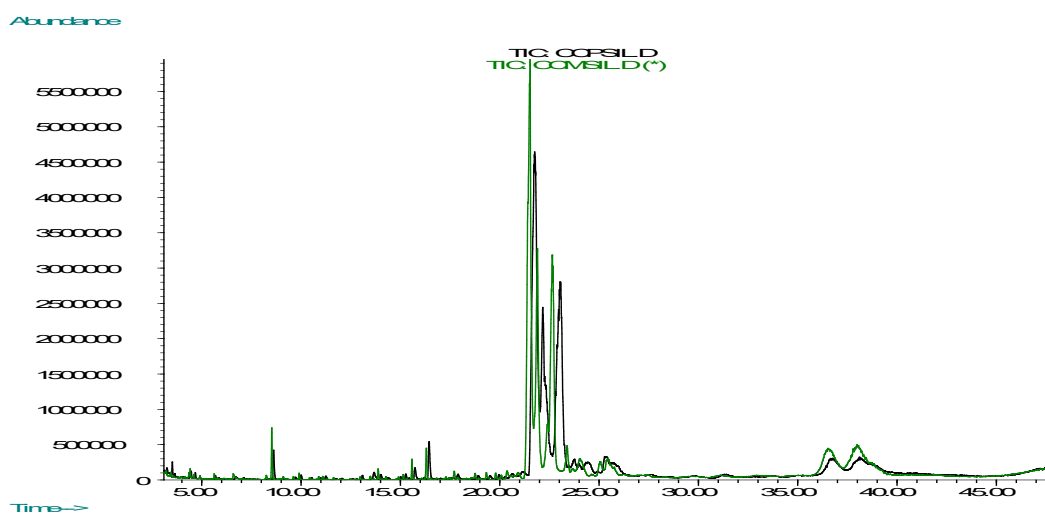
Σύστημα ανάπτυξης TLC:
15% οξικό οξύ

Στα δύο συστήματα αυτά, παρατηρείται ότι τόσο στο δείγμα του Ρεθύμνου όσο και στο δείγμα της Μυτιλήνης εμφανίζονται κηλίδες κίτρινου χρώματος που μαρτυρούν την ύπαρξη δευτερογενών μεταβολιτών τύπου φλαβονοειδών. Βασιζόμενοι σε αυτή την

παρατήρηση προχωρήσαμε σε μελέτη του ολικού φαινολικού φορτίου για να αξιολογήσουμε τα δείγματά μας (Τμήμα 12).

7.2 Μέθοδος Ανάλυσης (GC-MS)

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ανάλυση με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας, προκειμένου να ανιχνευθούν οι δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχονται στα αφεψήματα που παρασκευάστηκαν. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το *Cistus creticus* περιέχει αρκετές πολικές ενώσεις και για αυτόν το λόγο είναι αναγκαίο να προηγηθεί η σιλυλίωση των δειγμάτων, προκειμένου τα περιεχόμενα συστατικά να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα και να μπορέσουν να εισέλθουν για ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (η διαδικασία περιγράφεται στο θεωρητικό μέρος).



Σύγκριση χρωματογραφημάτων: Με μαύρο χρώμα παρουσιάζεται το δείγμα του Ρεθύμνου, ενώ με πράσινο χρώμα παρουσιάζεται το δείγμα της Μυτιλήνης

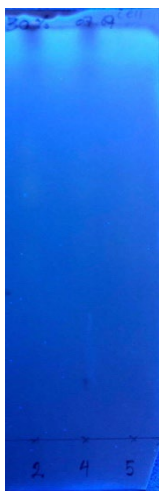
Από τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν με την μέθοδο GC-MS παρατηρήθηκε ότι η ποσότητα των σακχάρων στα δύο δείγματα ήταν αρκετά μεγάλη με αποτέλεσμα να υπερκαλύπτει τις άλλες ουσίες που βρίσκονται σε πολύ μικρότερες ποσότητες. Λόγω του ότι τα υδατικά εκχυλισμάτα των δύο δειγμάτων (Ρεθύμνου και Μυτιλήνης) έδειξαν υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, αποφασίστηκε η απομάκρυνσή τους με ρητίνη προσρόφησης XAD-4.

8. Ρητίνη προσρόφησης XAD-4

Στο σημείο αυτό, προκειμένου να απομακρυνθεί η ποσότητα σακχάρων από τα δείγματα, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφικός διαχωρισμός με στήλη ανοικτού τύπου με στατική φάση ρητίνη XAD-4. Το χωνί που χρησιμοποιήθηκε είχε διάμετρο 4,3cm, ύψος 5cm και πορώδες 1. Η ποσότητα των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό ήταν:

- Δείγμα Ρεθύμνου: 1,116g
- Δείγμα Μυτιλήνης: 1,105g

Το δείγμα επαναδιαλύεται σε νερό και αναμιγνύεται με την ενεργοποιημένη ρητίνη. Στο πρώτο στάδιο, γίνεται η απομάκρυνση των σακχάρων, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση απιονισμένο νερό. Συλλέχθηκαν συνολικά 7 και 6 κλάσματα για το δείγμα του Ρεθύμνου και της Μυτιλήνης αντίστοιχα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ώστε να επιβεβαιωθεί η πλήρης απομάκρυνση των σακχάρων από τα δείγματα και να ξεκινήσει η προσθήκη της μεθανόλης.



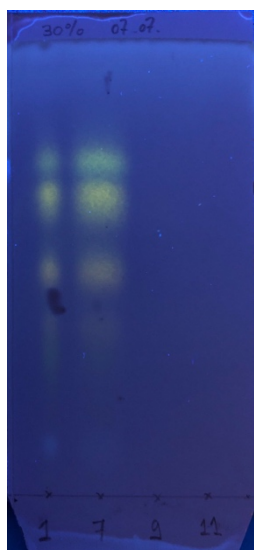
Δείγμα Μυτιλήνης
Σύστημα ανάπτυξης TLC:
30% οξικό οξύ



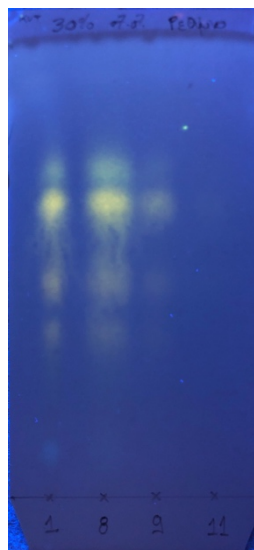
Δείγμα Ρεθύμνου
Σύστημα ανάπτυξης TLC:
30% οξικό οξύ

Παρατηρήθηκε ότι και στα δύο δείγματα τα σάκχαρα απομακρύνθηκαν πλήρως καθώς τα κλάσματα 5 και 7 της Μυτιλήνης και Ρεθύμνου αντίστοιχα δεν παρουσίασαν χαρακτηριστικές σκοτεινές κηλίδες που αντιστοιχούν σε σάκχαρα.

Κατόπιν, ξεκίνησε η συλλογή των μεθανολικών κλασμάτων. Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ήταν 4 (8-11) και 5 (7-11) για το δείγμα του Ρεθύμνου και της Μυτιλήνης αντίστοιχα. Στο σημείο αυτό, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, όπου εμφανίσθηκαν χαρακτηριστικές κίτρινες κηλίδες που αντιστοιχούν σε φαινολικές ενώσεις, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η συλλογή όλου του δείγματος και να σταματήσει η διαδικασία.



Δείγμα Μυτιλήνης
Σύστημα ανάπτυξης TLC:
30% οξικό οξύ



Δείγμα Ρεθύμνου
Σύστημα ανάπτυξης TLC:
30% οξικό οξύ

Μετά το τέλος της διαδικασίας, πραγματοποιήθηκαν οι συνενώσεις των κλασμάτων και συμπυκνώσεις τους μέχρι ξηρού προκειμένου να ζυγισθούν.

Πίνακας 5: Συνολικά για το δείγμα Ρεθύμνου

Κωδικός	Συνενώσεις Κλασμάτων	Δ/της	Ποσότητα προϊόντος (mg)
P1	1-3	Υδατικά	872
P2	4-7	Υδατικά	7,4
P3	8-10	Μεθανολικά	155
P4	11	Μεθανολικό	13

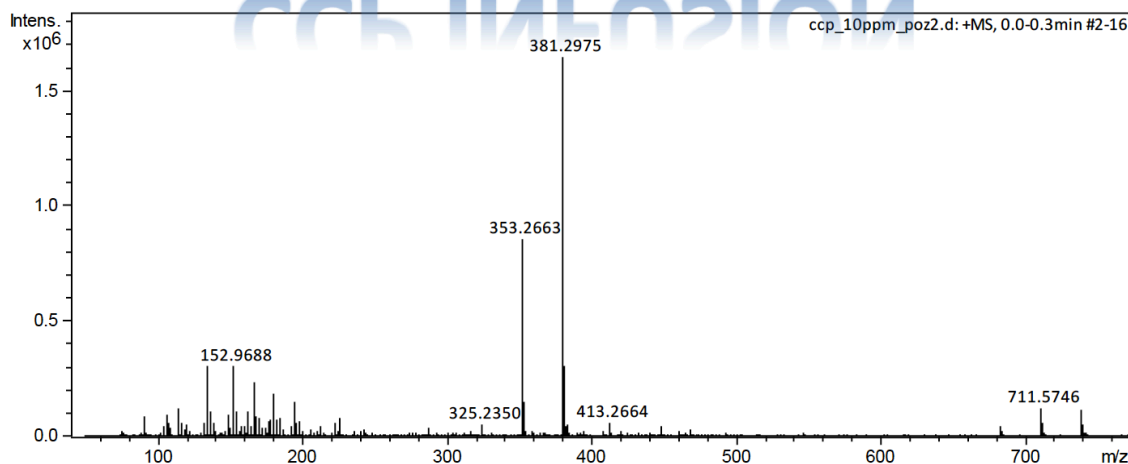
Πίνακας 6: Συνολικά για το δείγμα Μυτιλήνης

Κωδικός	Συνενώσεις Κλασμάτων	Δ/της	Ποσότητα προϊόντος (mg)
M1	1	Υδατικό	1012
M2	2-6	Υδατικά	4,1
M3	7-8	Μεθανολικά	90,5
M4	9-11	Μεθανολικά	5,2

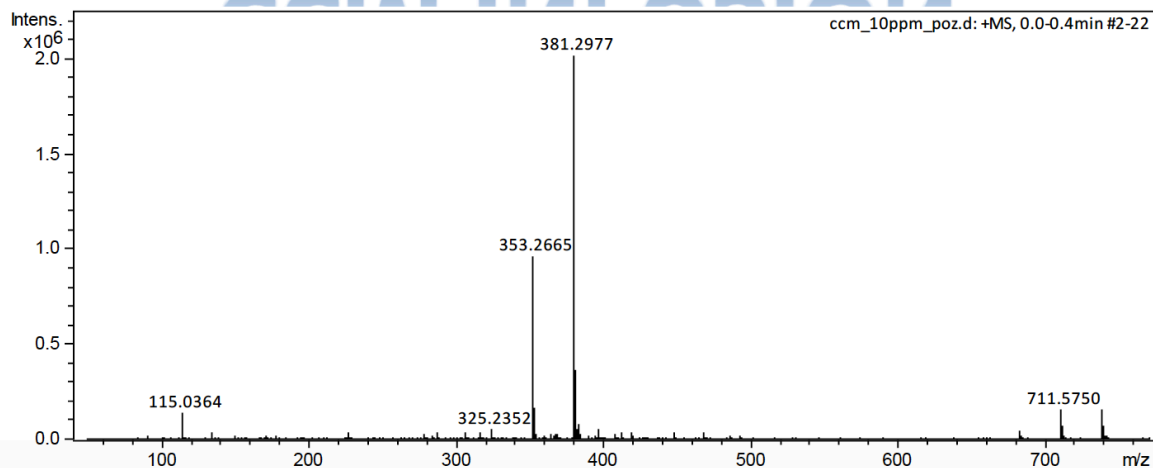
Μικρή ποσότητα από τα κλάσματα P3 (CCP) και M3 (CCM) υποβλήθηκε σε LC-MS. (υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας).

8.1 Οι αναλύσεις φαίνονται παρακάτω (LC-MS (High Resolution liquid chromatography mass spectrometry))

CCP INFUSION



CCM INFUSION



Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι δευτερογενείς μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν κατά την ανάλυση αυτή.

	Compound	m/z [M+H] ⁺	CCP	CCM
1.	Κατεχίνη	291.0863	RT [min] 5.4	-
2.	Γαλλοκατεχίνη	307.0812	-	RT [min] 5.0
3.	Καιμπφέρολο -7-O-β-D-ραμνοσίδης	433.1129	RT [min] 4.8	RT [min] 4.8
4.	Καιμπφέρολο-3-O- γαλακτοσίδης ή καιμπφέρολο-3-O- γλυκοσίδης ή κερκετινο-7-O- ραμνοσίδης Isobaric compounds	449.1078	RT [min] 4.9	RT [min] 4.8
5.	Κερκέτινο-3-O- γαλακτοσίδης ή κερκέτινο-3-O- γλυκοσίδης ή Myricetin-3- rhamnocide Isobaric compounds	465.1028	RT [min] 5.0	-
6.	μυρικέτινο-3-γαλακτοσίδης ή μυρικέτινο-3-γλυκοσίδης Isobaric compounds	481.0977	RT [min] 4.9	RT [min] 4.9
7.	Καιμπφέρολο-3-O-β-(1→2) ραμνογλυκοσίδης και Tiliroside	595.1657	RT [min] 4.8	RT [min] 4.8
8.	Κερκέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνογλυκοσίδης	611.1607	RT [min] 4.8	RT [min] 4.8
9.	μυρικέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης	627.1556	RT [min] 4.8	RT [min] 4.8
10.	5-O-γλυκοκυρανοσυλο-2-(4, 5-διμεθοξυ-3-υδροξυφαιτυλο)-3, 7-διμεθοξυχρωμεν-4-όνη		RT [min] 4.9	RT [min] 4.9
11.	5-O-γλυκοκυρανοσυλ-2-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαιτυλο)-3,7-διμεθοξυ-5 υδροξυχρωμεν-4-όνη		RT [min] 4.9	-
12.	Αρβουτίνη		RT [min] 5.3	-
13.	Σικιμμικό οξύ		RT [min] 4.3	RT [min] 4.3

Ανιχνεύθηκαν σικιμμικό οξύ και 12 δευτερογενείς φαινολικοί μεταβολίτες, που αποτελούν, από τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα, γνωστά συστατικά του γένους *Cistus* (Demetzos et al. 2001; Βουδούρη 2018).

Είναι αξιοπρόσεκτη η ανίχνευση σικιμμικού οξέος που προηγούμενα έχει εντοπισθεί μόνο μια φορά από *Cistus incanus* (= *Cistus creticus*) (Scognamiglio et al. 2014) και πρόσφατα από *C. monspeliensis* (Βουδούρη 2018)

Η γλυκοζυλιωμένη υδροκινόνη αρβουτίνη ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε αφέψημα *Cistus* και μάλιστα μόνον στο δείγμα της Κρήτης (απουσιάζει από το δείγμα Μυτιλήνης) ενώ προηγούμενα έχει ανιχνευθεί μόνον σε μεθανολικό εκχύλισμα *C.*

monspeliensis (Βουδούρη 2018). Ενώ, ανιχνεύθηκε γαλλοκατεχίνη μόνο στο μεθανολικό δείγμα της Μυτιλήνης, αφού το δείγμα της Κρήτης εμφανίσθηκε να περιέχει αντίστοιχα κατεχίνη.

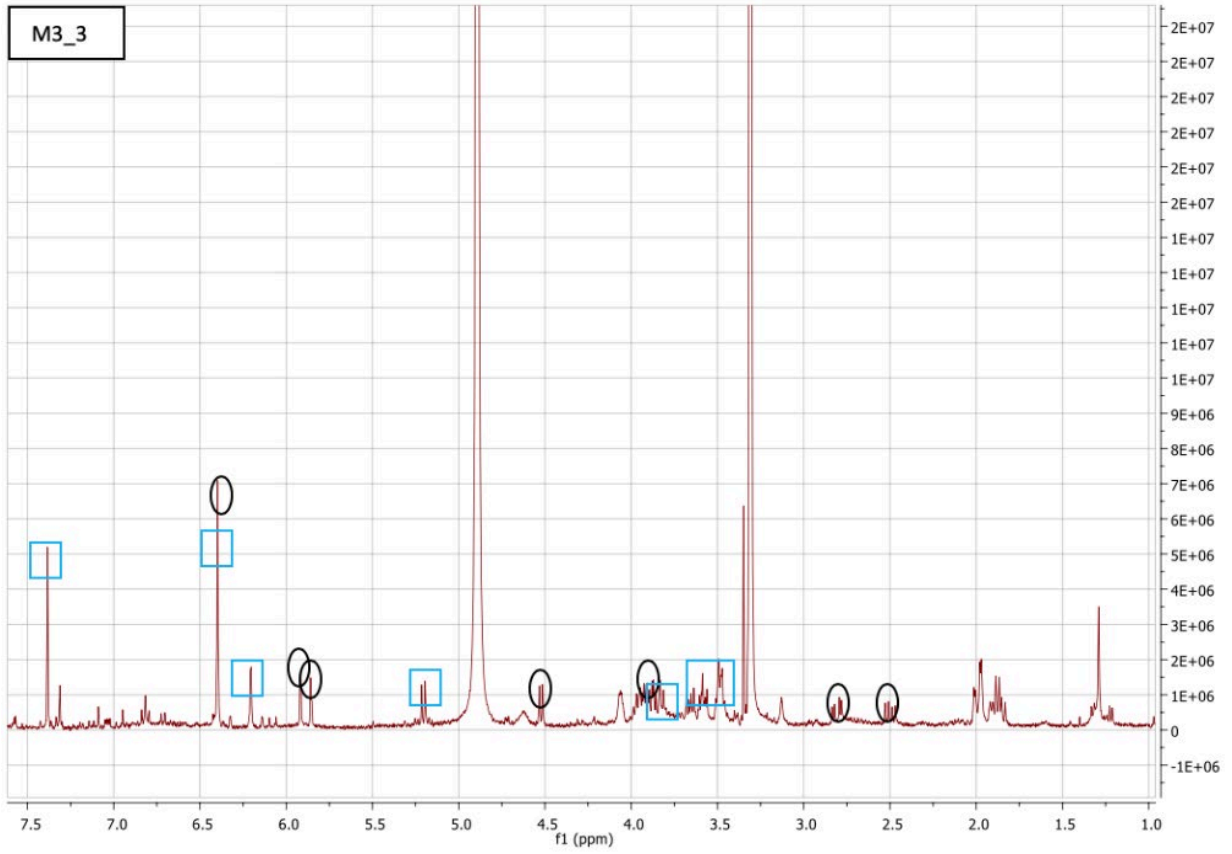
Γλυκοσίδες της κερκετίνης, καιμπφερόλης και μυρικετίνης έχουν προσδιορισθεί προηγουμένα σε φύλλα *Cistus creticus* (Demetzos et al. 1989) και υδατικά εκχυλίσματα (αφεψήματα) (Barrajon-Catalan et al. 2011).

Ο δευτερογενής μεταβολίτης 5-Ο-γλυκοπυρανοσυλ-2-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)-3,7-διμεθοξυ-5-υδροξυχρωμεν-4-όνη προσδιορίζεται πρώτη φορά στο είδος *Cistus creticus* αφού ως νέο φυσικό προϊόν απομονώθηκε πρόσφατα από το *Cistus monspeliensis* (Βουδούρη 2018) και ανιχνεύθηκε μόνον στο δείγμα της Κρήτης. Ο μεταβολίτης 5-Ο-γλυκοπυρανοσυλο-2-(4, 5-διμεθοξυ-3-υδροξυφαινυλο)-3, 7-διμεθοξυχρωμεν-4-όνη προσδιορίζεται επίσης πρώτη φορά στο είδος *Cistus creticus* αφού ως νέο φυσικό προϊόν απομονώθηκε και πάλι πρόσφατα από το *Cistus monspeliensis* (Βουδούρη 2018) ενώ στην ανάλυσή μας ανιχνεύθηκε και στα δύο δείγματα (Κρήτης και Μυτιλήνης).

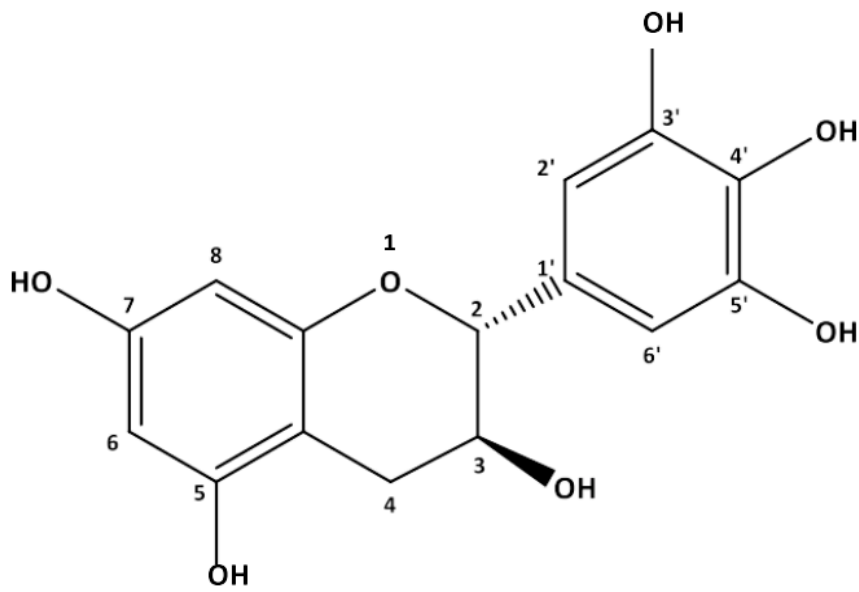
Συνολικά, το δείγμα αφεψήματος της Κρήτης εμφανίσθηκε περισσότερο πλούσιο σε αριθμό δευτερογενών μεταβολίτες αφού περιείχε κερκέτινο-3-Ο-γαλακτοσίδη ή κερκέτινο-3-Ο-γλυκοσίδη ή μυρικέτινο-3-ραμνοσίδη, αρβουτίνη και 5-Ο-γλυκοπυρανοσυλ-2-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)-3,7-διμεθοξυ-5 υδροξυχρωμεν-4-όνη που δεν περιέχονταν στο δείγμα της Μυτιλήνης αντίστοιχα.

8.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επιλεκτική ανάλυση με φασματοσκοπία NMR στο μεθανολικό μίγμα **M3**. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν είναι η γαλλοκατεχίνη (κορυφές επισημασμένες με κύκλο) και ο μυρικέτινο-3-γαλακτοσίδης (κορυφές επισημασμένες με τετράγωνο) που παρουσιάζονται παρακάτω. Η ταυτοποίηση των ουσιών έγινε με την βοήθεια της βιβλιογραφίας (Matsuo 2008; Scharbert et al., 2004).

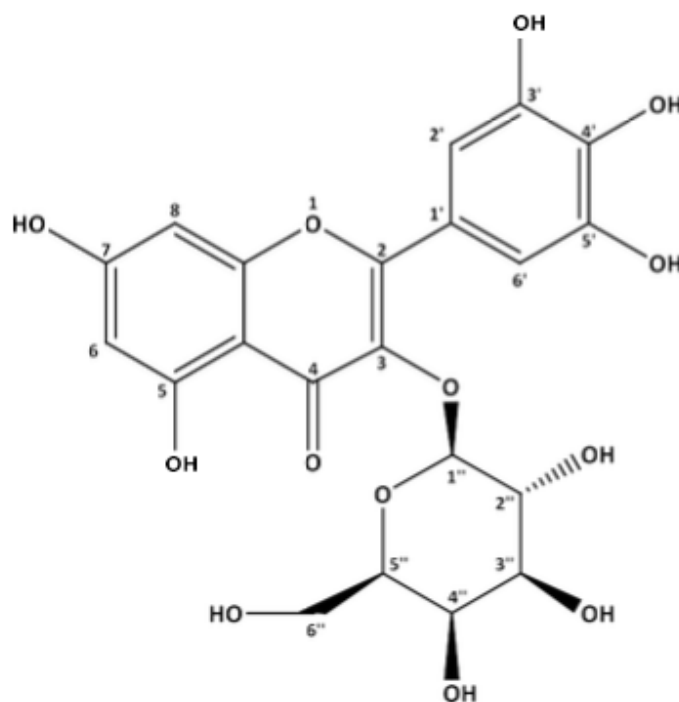


γαλλοκατεχίνη



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)
2	4.54 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.6)
3	3.98 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> = 7.8/7.6/5.3)
4a	2.83 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 16.2 / 5.3)
4b	2.52 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 16.2 / 7.8)
5	-
6	5.87 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.3)
7	-
8	5.93 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.3)
9	-
10	-
1'	-
2'/6'	6.41 (2H, <i>s</i>)
3'	-
4'	-
5'	-

3-O-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης της μυρικετίνης.

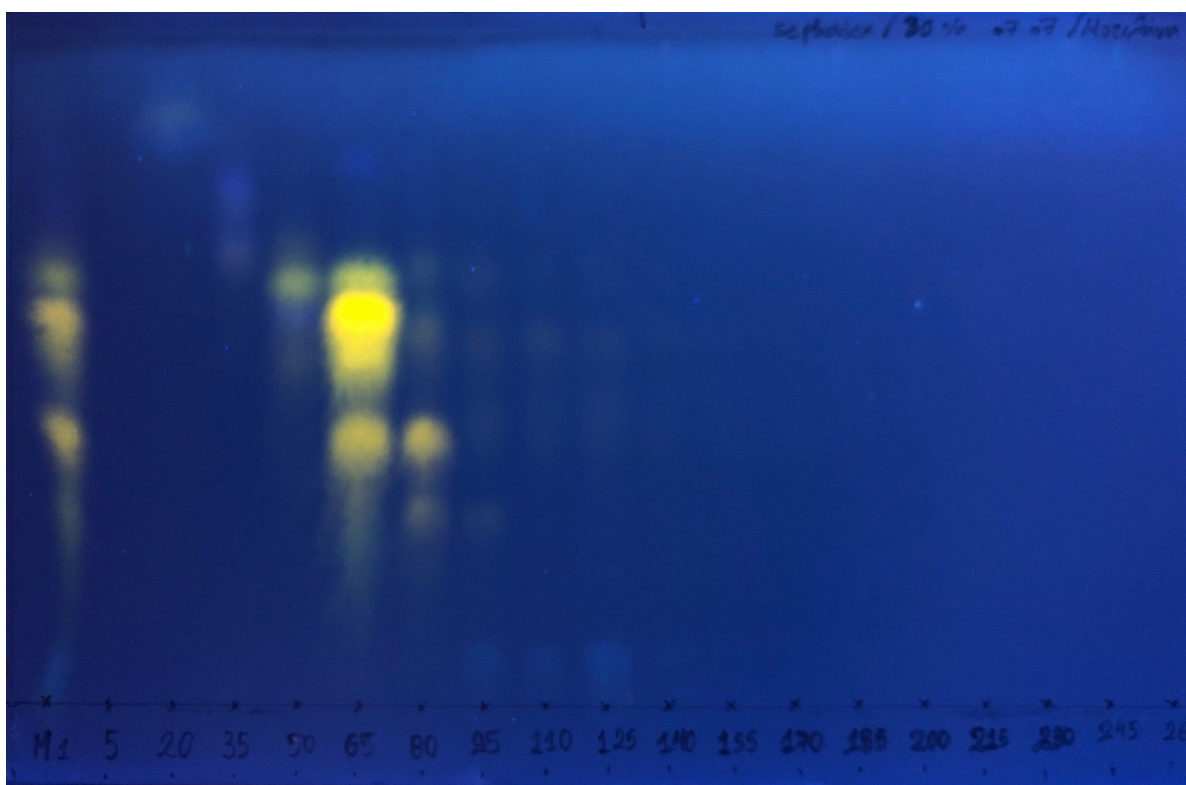


Θέση **¹H NMR**
δ σε ppm (J σε Hz)

2	-
3	-
4	-
5	-
6	6.23 (1H, d, J=2.0)
7	-
8	6.42 (1H, d, J=2.0)
9	-
10	-
1'	-
2'	7.40 (1H, s)
6'	-
3'	-
4'	-
5'	-
1''	5.22 (1H, d, J = 7.8)
2''	3.85 (1H, dd, J = 9.7/7.8)
3''	3.59 (1H, dd, J = 9.7/3.5)
4''	3.89 (1H, ~t, J = 3.5)
5''	3.51 (1H, m)
6''a	3.68 (1H, dd, J = 11.3 / 6.1)
6''b	3.60 (1H, dd, J = 11.3 / 6.5)

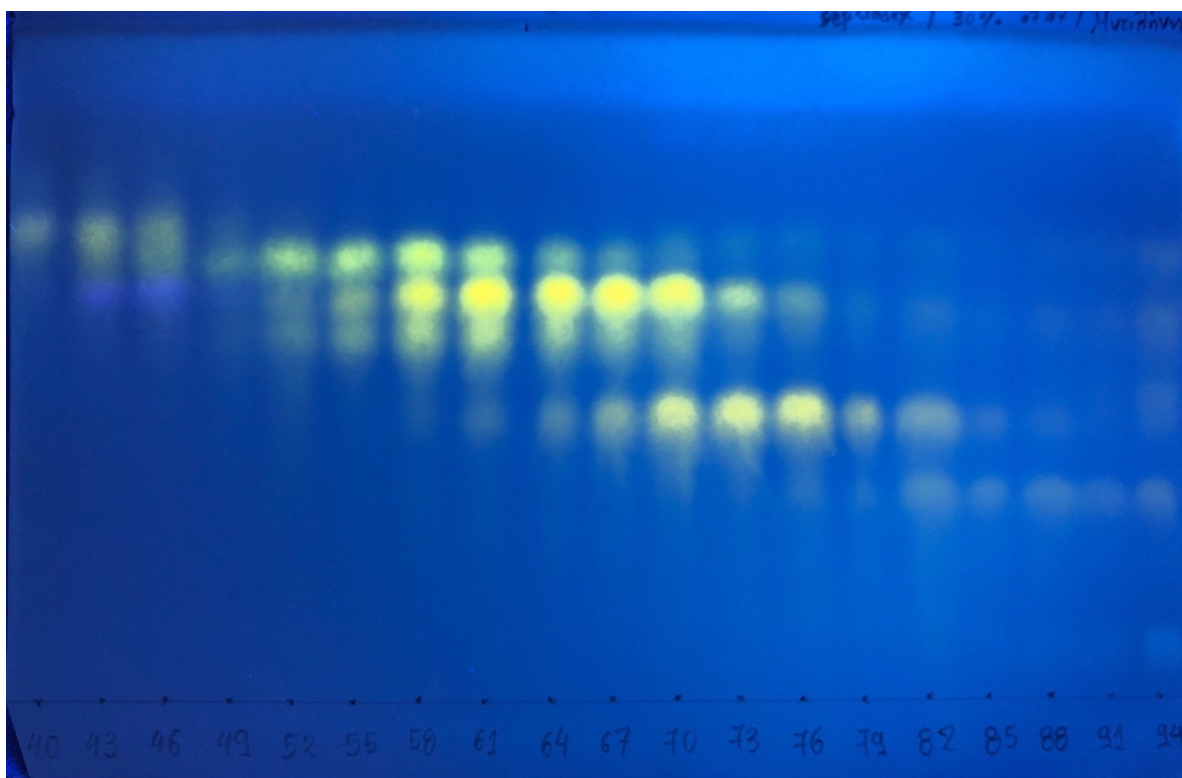
9. Χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού (Sephadex LH-20)

Στο σημείο αυτό, αποφασίστηκε να αναλυθεί περαιτέρω το υδατικό κλάσμα της Μυτιλήνης με κωδικό **M1** και χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού Sephadex LH-20. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είχε ύψος 50cm και διάμετρο 3cm. Η ποσότητα του **M1** που υποβλήθηκε στην ανάλυση ήταν 0,955g. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν MeOH και τα κλάσματα όγκου 3-8ml (σε δοκιμαστικούς σωλήνες). Σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης παρακολουθήθηκε η διαδικασία του διαχωρισμού με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).



M1 μετά από Sephadex LH-20
Σύστημα ανάπτυξης TLC: 30% οξικό οξύ

Ακολούθησε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) στα κλάσματα, όπως φαίνεται παρακάτω.



Κλάσματα 40-94 του M1 μετά από Sephadex LH-20
Σύστημα ανάπτυξης TLC: 30% οξικό οξύ

Με βάση την παραπάνω πλάκα, επιλέχθηκαν οι συνενώσεις που έγιναν όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Συνενώσεις Κλασμάτων	Ποσότητα προϊόντος (mg)
41-48	10
49-50	3,7
52-56	13
57-63	30,8
64-68	18,8
69-72	13,5
73-76	8
78-79	2,1
81-84	3,9
85-91	7,9
92-99	7,3
100-125	24,4
126-155	29,3

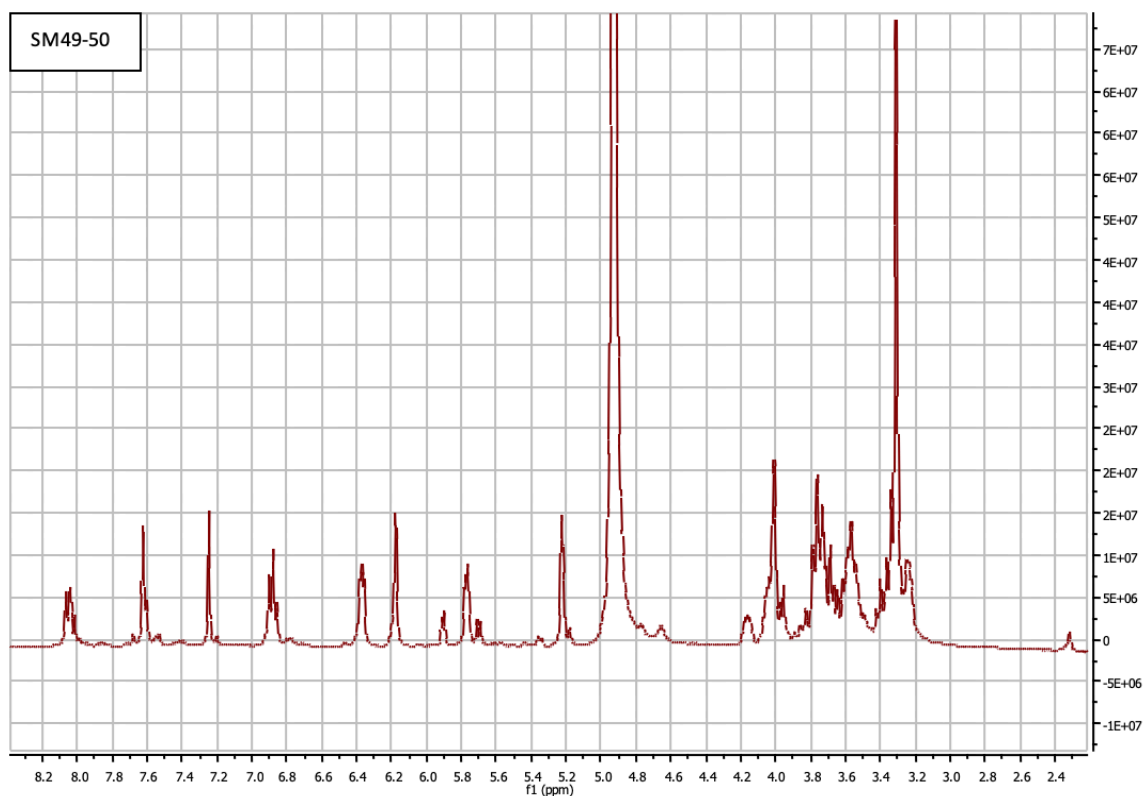
Μελετήθηκαν φασματοσκοπικά τα παρακάτω συνενωμένα κλάσματα:

Κωδικός	Κλάσματα
SM20	20
SM39	39
SM40	40
SM49-50	49-50
SM78-79	78-79

9.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Για τα φάσματα που λήφθηκαν, ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD). Στο μίγμα με κωδικό SM49-50 με σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα ταυτοποιήθηκαν οι **kaempferol-3-neohesperidoside** [καμπφέρολο -3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης], **quercetin-3-neohesperidoside** [κερκέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης] και **myricetin-3-neohesperidoside** [μυρικήτινο- -3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης]

¹H-NMR (MeOD):



Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα για τους δευτερογενείς μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν.

<u>πρωτόνιο</u>	<u>καμπφέρολο-3-O-νεοεσπεριδοσίδης</u>	<u>κερκέτινο-3-O-νεοεσπεριδοσίδης</u>	<u>μυρικέτινο-3-O-νεοεσπεριδοσίδης</u>
	<i>δ</i> (ppm), πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)	<i>δ</i> (ppm), πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)	<i>δ</i> (ppm), πολλαπλότητα, <i>J</i> (Hz)
H-6	6.18 (d,1.8)	6.18(d,1.8)	6.18(d,1.8)
H-8	6.38(d,1.8)	6.37(d,2.1)	6.36(d,2.1)
H-2'	8.06(d,8.9)	7.62(d2.4)	7.25(s)
H-3'	6.90(d,8.9)	-	-
H-5'	6.88(d,8.9)	6.86(d, J=8.3)	-
H-6'	8.06(d,8.9)	7.60(dd,8.3/2.4)	7.25(s)
<u>3-Glu</u>			
H-1''	5.75(d,7.7)	5.76(d,7.7)	5.75(d,7.7)
H-2''	3.65(m)	3.66(m)	3.69(m)
H-3''	3.30-3.60	3.30-3.60	3.30-3.60
H-4''	3.30-3.60	3.30-3.60	3.30-3.60
H-5''	3.25(m)	3.25(m)	3.25(m)
H-6''a	3.73(dd,11.9/3.1)	3.73(dd,11.9/3.1)	3.73(dd,11.9/3.1)
H-6''b	3.52(dd,12.0/6.2)	3.54(dd,12.0/6.2)	3.57(dd,11.9/6.0)
<u>2''-Rhm</u>			
H-1'''	5.22(s)	5.22(s)	5.23(brs)
H-2'''	4.01(m)	4.01(m)	4.01(m)
H-3'''	3.79(m)	3.79(m)	3.79(m)
H-4'''	3.33(m)	3.34(m)	3.33(m)
H-5'''	4.01(m)	4.01(m)	4.01(m)
Me- rh	0.95(d,4.8)	0.96(d,5.6)	0.97(d,5.6)

Συμπερασματικά: Μελετήθηκε φασματοσκοπικά ((NMR) το δείγμα της Μυτιλήνης (μεθανολικό κλάσμα M3) από όπου προσδιορίστηκαν ως μίγμα οι δευτερογενείς φαινολικοί μεταβολίτες : γαλλοκατεχίνη και μυρικέτινο-3-γαλακτοσίδης. Ενώ από το υδατικό κλάσμα SM49-50 προσδιορίστηκαν ως μίγμα οι δευτερογενείς μεταβολίτες: καμπφέρολο -3-O-β-(1→2) ραμνόςουλ-γλυκοσίδης, κερκέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόςουλ-γλυκοσίδης και μυρικέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόςουλ-γλυκοσίδης που αντίστοιχα είχαν προσδιορισθεί φασματοσκοπικά πρόσφατα σε μελέτη γύρης *Cistus creticus* (Ατσαλάκης 2017).

10. Προσδιορισμός Ολικών Φαινολικών με τη Μέθοδο Folin-Ciocalteu

Εισαγωγικό μέρος

Για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου ακολουθήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu. Η μέθοδος αυτή, αναπτύχθηκε αρχικά το 1927 για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και είναι επίσης γνωστή ως μέθοδος GAE (Gallic Acid Equivalence). Αργότερα βελτιώθηκε από τους Singleton και Rossi οπότε και έγινε πολύ δημοφιλής. Από τότε χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό ολικών φαινολικών διαφόρων φυσικών προϊόντων αλλά και για τον προσδιορισμό θειολών, νουκλεοτιδίων, τριοζών, γλυκεραλδεΐδης καθώς και ανόργανων συστατικών [Singleton, 1965 ; Singleton, 1999].

Αρχή της Μεθόδου

Το Folin-Ciocalteu είναι μείγμα μολυβδαινικού νατρίου (Na_2MoO_4), βολφραϊμικού νατρίου (Na_2WO_4), και φωσφορικού οξέος (H_3PO_4). Παρασκευάζεται με ανάμιξη $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, π.ΗCl, 85% H_3PO_4 σε ύδωρ και βράσιμο για 10 ώρες. Κατόπιν προστίθεται $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ που του δίνει ένα χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Σχηματίζονται $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ και $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ και η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η αναγωγή του Mo(VI) σε Mo(V) με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου. Προκαλείται οξειδωση των φαινολικών ενώσεων με ταυτόχρονη αναγωγή των οξέων. Η αντίδραση αυτή βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και για αυτό το λόγο το πολυφαινολικό προφίλ που προσδιορίζεται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu παρουσιάζει πολύ καλή γραμμική συσχέτιση με την αντιοξειδωτική ικανότητα που προσδιορίζεται με άλλες αντιοξειδωτικές μεθόδους που περιλαμβάνουν μεταφορά ηλεκτρονίων οπότε και σχηματίζεται ένα φαινολικό ανιόν. Το τελευταίο ανάγει το αντιδραστήριο σχηματίζοντας ένα βαθύ μπλε σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου χαρακτηριστικής μπλε απόχρωσης που απορροφά στο ορατό σε μήκος κύματος 725-750 nm. Πρέπει να τονιστεί επίσης ότι οι φαινολικές ενώσεις για να αντιδράσουν με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu απαιτούν βασικό περιβάλλον για αυτόν το λόγο πριν από την προσθήκη του αντιδραστήριου το pH

του δείγματος πρέπει να γίνεται βασικό ($\text{pH}=10$) και αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3). Να σημειωθεί ότι δεν γίνεται διαχωρισμός των μονομερών, διμερών και των ανώτερων φαινολικών συστατικών. Στην πραγματικότητα προσδιορίζεται η αναγωγική ικανότητα του δείγματος, αφού η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι μια οξειδοαναγωγή. Ως εσωτερικό πρότυπο για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ ενώ οι μετρήσεις έγιναν στα 765 nm. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε και για τα τρία δείγματα της πρόπολης. Στο πρώτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας έγινε η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς ενώ ακολούθως πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για πυκνά και για αραιά διαλύματα των εκχυλισμάτων. Οι τιμές που ελήφθησαν στο φασματοφωτόμετρο UV-VIS εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE)/g εκχυλίσματος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές. [Gutfinger, 1981 ; Singleton, 1965]

Οργανολογία

- Τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-1700 series Pharmaspec της εταιρίας Shimadzu ρυθμισμένο στα 765 nm. Οι λάμπες του οργάνου ήταν αλογόνου (Halogen WI) και δευτερίου (Deuterium D2).
- Κυψελίδες μιας χρήσης διαμέτρου 1dm.
- Πιπέτες ακριβείας των 100μL, 200μL και των 1000μL της εταιρείας Gilson.
- Συσκευή μηχανικής ανάδευσης (Vortex)
- Σωληνάκια Eppendorf

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γαλλικού οξέος με συγκέντρωση 1mg/ml MeOH και με τις κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάστηκε εύρος συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος 1-40μg/ml MeOH. Στη συνέχεια, ενώ τοποθετήθηκαν 600μL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu σε 7 διαφορετικά Eppendorf, προστέθηκαν 120μL γαλλικού οξέος όπως δείχνει ο παρακάτω πίνακας και 480μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 . Ο συνολικός όγκος ανά Eppendorf ήταν τα 1,2 mL. Κάθε Eppendorf αναδεύτηκε στο Vortex για 1-2sec και τα δείγματα αφέθηκαν στο σκοτάδι σε ηρεμία για 30min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε

φυγοκέντρωση των δειγμάτων για 5min σε 3600g πριν φωτομετρηθούν στα 765nm. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι ποσότητες για κάθε αντιδραστήριο.

Κωδικός Δείγματος	Συγκέντρωση Γαλλικού οξέος (μg/ml)	Ποσότητα Γαλλικού οξέος (μl)	Ποσότητα Folin 10% (μl)	Ποσότητα Na ₂ CO ₃ 7,5% (μl)
1	1	120	600	480
2	2.5	120	600	480
3	7.5	120	600	480
4	10	120	600	480
5	20	120	600	480
6	30	120	600	480
7	40	120	600	480

Μέτρηση Δειγμάτων

Για κάθε δείγμα προς φωτομέτρηση παρασκευάστηκε από ένα πυκνό και ένα αραιό διάλυμα ως εξής:

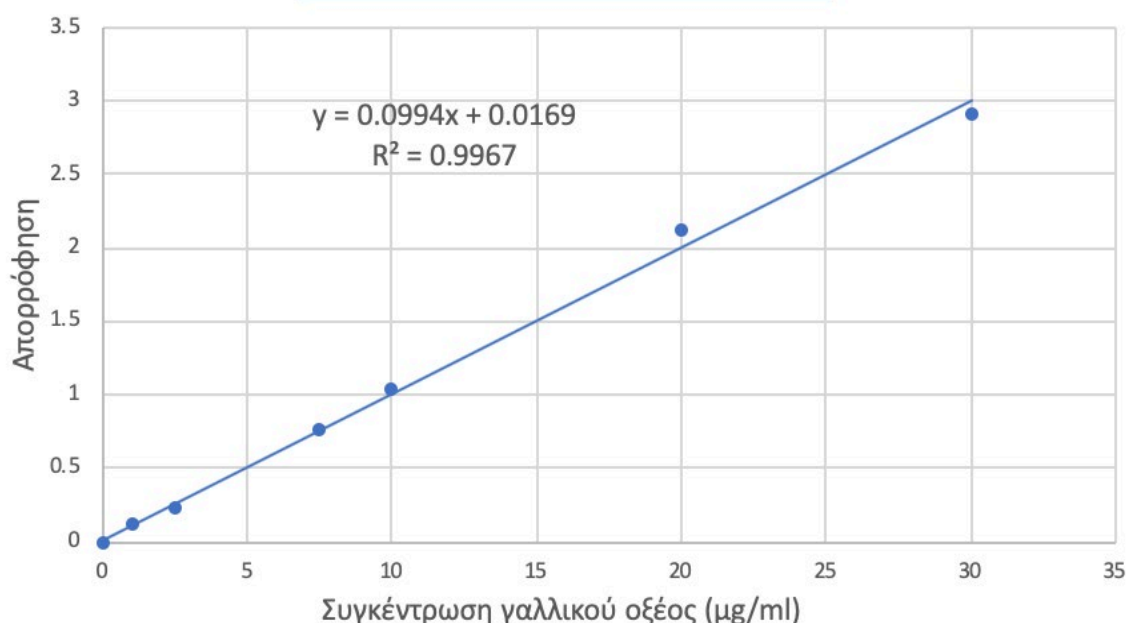
- Πυκνό διάλυμα: Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 10mg εκχυλίσματος και κατόπιν διαλύονται σε 1000μL MeOH (για μεθανολικά εκχυλίσματα) και σε 1000μL H₂O (για υδατικά εκχυλίσματα).
- Αραιό διάλυμα: Παρασκευάστηκε με αραιώση ποσότητας 10μl του πυκνού διαλύματος σε 990μL MeOH (για μεθανολικά εκχυλίσματα) και σε 990μL H₂O (για υδατικά εκχυλίσματα).

Για τη μέτρηση των δειγμάτων, αφού τοποθετήθηκαν 600μL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu σε Eppendorf, προστέθηκαν 120μL από το πυκνό διάλυμα και 480μL κορεσμένου διαλύματος Na₂CO₃. Από εδώ και στο εξής ακολουθήθηκαν τα ίδια στάδια με την παρασκευή της καμπύλης αναφοράς. Επαναλήφθηκε η διαδικασία για το αραιό διάλυμα.

Αποτελέσματα μελέτης των αρχικών υδατικών εκχυλισμάτων (Ρεθύμνου και Μυτιλήνης)

Για την καμπύλη αναφοράς: Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 2 φορές προκειμένου να επιτευχθεί βέλτιστη επαναληψιμότητα. Από τους μέσους όρους των αποτελεσμάτων προέκυψε η καμπύλη αναφοράς.

Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος

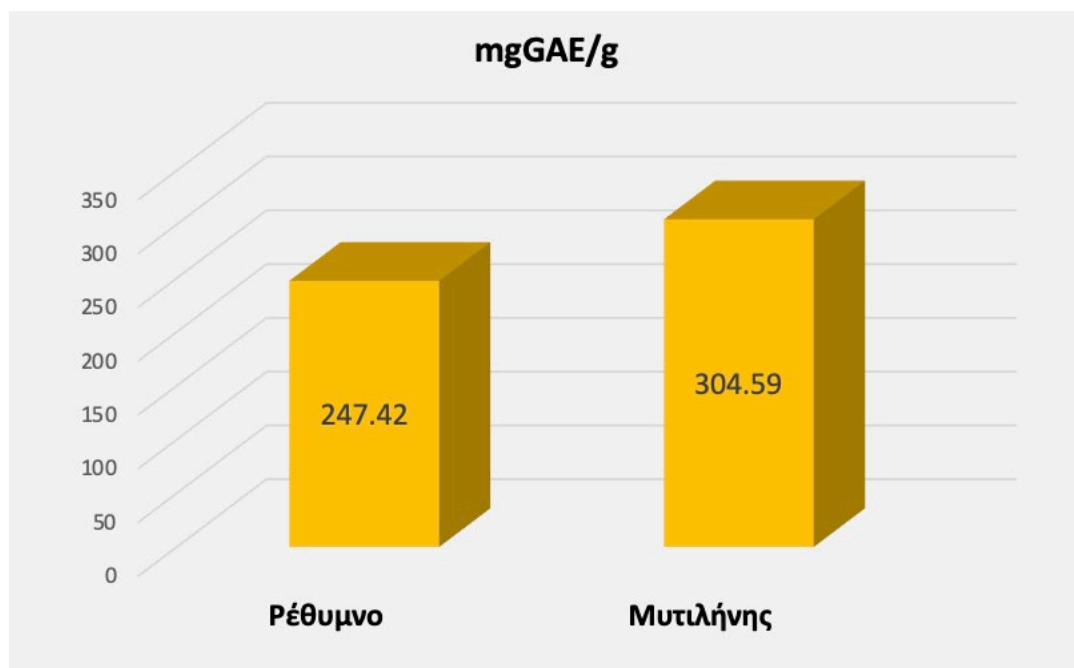


Για κάθε δείγμα υπολογίζεται αρχικά η συγκέντρωσή του βάση της απορρόφησης και της εξίσωσης ελαχίστων τετραγώνων, $y=ax+\beta$ που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς (σχέση 1). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος (gallic acid equivalents, GAE)/g εκχυλίσματος όπως αυτά προέκυψαν με βάση τη σχέση 2 (προκύπτει βάση των αραιώσεων ανά δείγμα):

$$C_{\text{δείγματος}} = (A_{\text{δείγματος}} - 0,0169) / 0,0994 \quad (1)$$

$$\text{mg GAE} / \text{g εκχυλίσματος} = (C_{\text{δείγματος}} \mu\text{g/ml} \times 1000\text{mg/g}) / 10\mu\text{g/ml} \quad (2)$$

Να σημειωθεί ότι και για τα δύο δείγματα (Ρεθύμνου και Μυτιλήνης) λήφθηκαν συνολικά 6 μετρήσεις για το Αραιό διάλυμα και 6 μετρήσεις για το πυκνό διάλυμα. Τα πυκνά διαλύματα είχαν πολύ μεγάλη τιμή απορρόφησης με αποτέλεσμα να μην μπορούν να χρησιμοποιηθούν καθώς βρίσκονταν εκτός καμπύλης αναφοράς. Για αυτόν τον λόγο η ποσότητα ολικών φαινολικών για τα δύο δείγματα υπολογίζονται με βάση τα αραιά διαλύματα.



Συνολικά παρατηρείται ότι το δείγμα της Μυτιλήνης έχει μεγαλύτερο ποσοστό φαινολικού περιεχομένου από αυτό του Ρεθύμνου, γεγονός που μαρτυρά ότι αναμένεται να εμφανίσει και ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.

11. Συμπεράσματα

- ✓ Στη παρούσα εργασία έγινε συγκριτική χημική ανάλυση αφεψημάτων λαδανίας (*Cistus creticus* L.) από τη Κρήτη (Σίτσες) και τη Μυτιλήνη (Κράτηγος) που δεν έχουν ποτέ προηγουμένα μελετηθεί φυτοχημικά.
- ✓ Αρχικά έγινε συλλογή ποσότητας φυτού από τις αντίστοιχες γεωγραφικές περιοχές της Ελλάδας, παρασκευάστηκαν τα αφεψήματα σύμφωνα με το παραδοσιακό προτεινόμενο τρόπο, λυοφιλοποιήθηκαν και υποβλήθηκαν σε σειρά χρωματογραφικών αναλύσεων.

Με τη μέθοδο LC-MS ανιχνεύθηκαν:

- σικιμμικό οξύ και 12 δευτερογενείς φαινολικοί μεταβολίτες στο δείγμα της Κρήτης, και
 - σικιμμικό οξύ με 9 δευτερογενείς φαινολικούς μεταβολίτες στο δείγμα της Μυτιλήνης
- ✓ Όλοι οι δευτερογενείς μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν αποτελούν γνωστά συστατικά του γένους *Cistus* (Demetzos et al. 2001; Βουδούρη 2018). Το σικιμμικό οξύ προηγουμένα έχει εντοπισθεί μόνο μια φορά σε *Cistus incanus* (*Cistus creticus*) (Scognamiglio et al. 2014) και πρόσφατα ακόμη μία φορά σε *C. monspeliensis* ; (Βουδούρη 2018).
- ✓ ΕΟι δευτερογενείς μεταβολίτες 5-Ο-γλυκοκυρανοσυλ-2-(3-μεθοξυ-4-υδροξυ φαινυλο)-3,7-διμεθοξυ-5 υδροξυχρωμεν-4-όνη και 5-Ο-γλυκοκυρανοσυλο-2-(4, 5-διμεθοξυ-3-υδροξυφαινυλο)-3,7-διμεθοξυχρωμεν-4-όνη ανιχνεύονται για πρώτη φορά στο είδος *Cistus creticus*, αφού ως νέα φυσικά προϊόντα απομονώθηκαν και προσδιορίστηκαν φασματοσκοπικά πολύ πρόσφατα, από το *Cistus monspeliensis* (Βουδούρη 2018).
- ✓ Μελετήθηκε φασματοσκοπικά (NMR) το δείγμα της Μυτιλήνης. Από το μεθανολικό κλάσμα M3 προσδιορίστηκαν ως μίγμα οι δευτερογενείς φαινολικοί μεταβολίτες : γαλλοκατεχίνη και μυρικέτινο-3-γαλακτοσίδης. Ενώ από το υδατικό κλάσμα SM49-50 προσδιορίστηκαν ως μίγμα οι δευτερογενείς μεταβολίτες: καιμπφέρολο -3-Ο-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης, κερκέτινο-3-Ο-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης και μυρικέτινο- -3-Ο-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης που αντίστοιχα είχαν προσδιορισθεί φασματοσκοπικά πρόσφατα σε μελέτη γύρης *Cistus creticus* (Ατσαλάκης 2017)

- ✓ Η γλυκοζυλιωμένη υδροκινόνη αρβουτίνη ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε αφέψημα *Cistus* και ειδικότερα μόνον στο δείγμα της Κρήτης (απουσιάζει από το δείγμα Μυτιλήνης) ενώ προηγούμενα έχει ανιχνευθεί μόνον σε μεθανολικό εκχύλισμα *C. monspeliensis* (Βουδούρη 2018). Η ύπαρξη τους συγκεκριμένου φαινολικού δευτερογενή μεταβολίτη δυνητικά ερμηνεύει και την ευρύτατη χρήση υδατικών εκχυλισμάτων του φυτού για εξωτερική δερματική χρήση σε προϊόντα περιποίησης του δέρματος, αφού η αρβουτίνη αποτελεί υψηλής αξίας δευτερογενή μεταβολίτη για την αντιμετώπιση δερματικών δυσχρωμιών λόγω ηλικίας
- ✓ Τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν επίσης σε έλεγχο του φαινολικού τους φορτίου με την μέθοδο Folin-Ciocalteu. Συνολικά παρατηρήθηκε ότι το δείγμα της Μυτιλήνης έχει υψηλότερο φαινολικό φορτίο από αυτό της Κρήτης, γεγονός που μαρτυρά ότι αναμένεται να εμφανίσει δυνητικά και ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση.
- ❖ Η Κρήτη αλλά και η Μυτιλήνη παράγουν μεγάλες ποσότητες *Cistus creticus* γι αυτό και θεωρούμε ότι από τη παρούσα φυτοχημική ανάλυση και ποιοτική σύγκρισή των αφεψημάτων, μπορούν να εξαχθούν πολύτιμα συμπεράσματα για πιθανή μελλοντική τους αξιοποίηση

12. Βιβλιογραφία

- Ahmad, F., Rashid, S., Bingol, F., Sener, B., 1993. Screening of some Turkish medicinal plants for their analgesic activity. *Pak. J. Pharm. Sci.* 6, 29–36.
- Al-khalil, S., 1995. A survey of plants used in Jordanian traditional medicine. *Int. J. Pharmacogn.* 33, 317–323.
- Angelopoulou, D., Demetzos, C., Dimas, C., Perdetzoglou, D., Loukis, A., 2001. Essential Oils and Hexane Extracts from leaves and Fruits of *Cistus monspeliensis*. Cytotoxic Activity of ent-13-epi-Manoyl Oxide and its Isomers 67, 168–171.
- Angelopoulou, D., Demetzos, C., Perdetzoglou, D., 2001. An interpopulation study of the essential oils of *Cistus parviflorus* L. growing in Crete (Greece). *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 405–415. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(00\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(00)00071-5)
- Aronne, G., De Micco, V., 2001. Seasonal dimorphism in the Mediterranean *Cistus incanus* L. subsp. *incanus*. *Ann. Bot.* 87, 789–794. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1407>
- Attaguile, G., Caruso A, Pennisi G, Savoca F. Gastroprotective effect of aqueous extract of *Cistus incanus* L. in rats. *Pharmacol res* 1995, 31(1):29-32
- Attaguile, G., Perticone, G., Mania, G., Savoca, F., Pennisi, G., Salomone, S., 2004. *Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle. *J. Ethnopharmacol.* 92, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.020>
- Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N., Vanella, A., 2000. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biol. Toxicol.* 16, 83–90. <https://doi.org/10.1023/A:1007633824948>
- Attimarad, M., Mueen Ahmed, K.K., Aldhubaib, B.E., Harsha, S., 2011. High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery. *Pharm. Methods* 2, 71–75. <https://doi.org/10.4103/2229-4708.84436>
- Azevedo, M.M., Pinheiro, C., Dias, A.C.P., Pinto-Ribeiro, F., Baltazar, F., 2015. Impact of an educational hands-on project on the antimicrobial, antitumor and anti-inflammatory properties of plants on portuguese students??? awareness, knowledge, and competences. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 2437–2453. <https://doi.org/10.3390/ijerph120302437>
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Roldán, C., Guillén, E., Saura, D., Segura-

- Carretero, A., Micol, V., 2011a. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship. *Phytochem. Anal.* 22, 303–312. <https://doi.org/10.1002/pca.1281>
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Roldán, C., Guillén, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2011b. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship. *Phytochem. Anal.* 22, 303–312. <https://doi.org/10.1002/pca.1281>
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Saura, D., Guillén, E., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2010. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2273–2282. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.060>
- Barrajón-Catalán, E., Tomás-Menor, L., Morales-Soto, A., Bruñá, N.M., López, D.S., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2015. Rockroses (*Cistus* sp.) oils. *Essent. Oils Food Preserv. Flavor Saf.* 649–658. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00074-2>
- Bedoya, L., Bermejo, P., Abad, M., 2009. Anti-Infectious Activity in the Cistaceae Family in the Iberian Peninsula. *Mini-Reviews Med. Chem.* 9, 519–525. <https://doi.org/10.2174/138955709788167600>
- Ben-Jemia, M., Kchouk, M.E., Senatore, F., Autore, G., Marzocco, S., De Feo, V., Bruno, M., 2013a. Antiproliferative activity of hexane extract from Tunisian *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus villosus*. *Chem. Cent. J.* 7, 47. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-47>
- Blaschek W. In HAGER; Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Hagerrom. Berlin: Springer-Verlag, 2012
- Caruso, A., Pennisi, G., Attaguile, G., Savoca, F., 1995. Gastroprotective effect of aqueous extract of *Cistus incanus* L. in rats. *Pharmacol. Res.* 31, 29–32.
- Chinou, I., Demetzos, C., Harvala, C., Roussakis, C., Verbist, J.F., 1994. Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Planta Med.* 60, 34–36. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959403>
- Chon, H., 2012. Medicinal herbs and plant extracts for influenza: Bioactivity, mechanism of anti-influenza effects, and modulation of immune responses, 1st ed, *Studies in*

Natural Products Chemistry. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59530-0.00011-3>

Christodoulakis, NS, Georgoudi, M, Fasseas, C. Leaf structure of *Cistus creticus* L. (rock rose), a medicinal plant widely used in folk remedies since ancient times. *J Herbs, Spices Med Plants* 2014, 20(2): 103-114

Comandini, O., Contu, M., Rinaldi, A.C., 2006. An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 16, 381–395. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0047-8>

Cvitanović, S. Znaor, L.a, Perišić, D.a, Grbić, D.b Hypersensitivity to pollen allergens on the Adriatic coast *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 2004, 55(2-3): 147-154 (abstract only)

Danne, A., Petereit, F., Nahrstedt, A., 1994. Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from *Cistus salvifolius*. *Phytochemistry* 37, 533–538. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)85094-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)85094-1)

Deforce, K., 2006. The historical use of ladanum. Palynological evidence from 15th and 16th century cesspits in northern Belgium. *Veg. Hist. Archaeobot.* 15, 145–148. <https://doi.org/10.1007/s00334-005-0021-y>

Demetzos, C., Anastasaki, T., Perdetzoglou, D., 2002a. A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. Growing in Crete (Greece). *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 57, 89–94

Demetzos, C., Angelopoulou, D., Kolocouris, A., Daliani, I., Mavromoustakos, T., 2001. Structure elucidation, conformational analysis and thermal effects on membrane bilayers of an antimicrobial myricetin ether derivative. *J. Heterocycl. Chem.* 38, 703–710. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570380327>

Demetzos, C., Angelopoulou, D., Perdetzoglou, D., 2002b. A comparative study of the essential oils of *Cistus salviifolius* in several populations of Crete (Greece). *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 651–665. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00145-4)

Demetzos, C., Dimas, K.S., 2001. Labdane-type diterpenes: Chemistry and biological activity. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 25, 235–292. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(01\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(01)80009-0)

- Demetzos, C., Harvala, C., Philianos, S.M., Skaltsounis, A.L., 1990. A new labdane-type diterpene and other compounds from the leaves of *cistus incanus* ssp. *Creticus*. *J. Nat. Prod.* 53, 1365–1368. <https://doi.org/10.1021/np50071a039>
- Demetzos C., Homatidou VI, Loukis AE, Philianos SM. The essential oil of *Cistus creticus*: Comparison with five other species of the genus *Cistus*. (poster abstract). *Planta medica*, 1989, 55(7):633
- Demetzos, C., Katerinopoulos, H., Kouvarakis AS, Stratigakis, A., Loukis, A., Ekonomakis, C., et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*. *Planta medica* 1997, 63(5):477-479
- Demetzos, C., Loukis, A., Spiliotis, V., Zoakis, N., Stratigakis, N., Katerinopoulos, H., 1995. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential oil of *Cistus creticus* L. *J. Essent. Oil Res.* 7, 407–410.
- Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A.L., Catherine Harvala, M.C., Libot, F., 1994. Diterpene esters of malonic acid from the resin “Ladano” of *Cistus creticus*. *Phytochemistry* 35, 979–981. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90651-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90651-4)
- Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Agati, G., Tattini, M., 2014. Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environ. Exp. Bot.* 103, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.012>
- Dimas, K., Demetzos, C., Marsellos, M., Sotiriadou, R., Malamas, M., Kokkinopoulos, D., 1998. Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines in vitro. *Planta Med.* 64, 208–211. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957410>
- Dimas, K., Demetzos, C., Vaos, V., Ioannidis, P., Trangas, T., 2001. Labdane type diterpenes down-regulate the expression of c-myc protein, but not of bcl-2, in human leukemia T- cells undergoing apoptosis. *Leuk. Res.* 25, 449–454. [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(00\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(00)00150-8)
- Droebner, K., Ehrhardt, C., Poetter, A., Ludwig, S., Planz, O., 2007. CYSTUS052, a polyphenol- rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Res.* 76, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.04.001>
- Ehrhardt, C., Hrinčius, E.R., Korte, V., Mazur, I., Droebner, K., Poetter, A., Dreschers, S., Schmolke, M., Planz, O., Ludwig, S., 2007. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res.* 76, 38–47.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.05.002>

- El Euch, S.K., Bouajila, J., Bouzouita, N., 2015. Chemical composition, biological and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts. *Ind. Crops Prod.* 76, 1100–1105. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.033>
- Ellul, P., Boscaiu, M., Vicente, O., Moreno, V., Rosselló, J.A., 2002. Intra- and interspecific variation in DNA content in *Cistus* (Cistaceae). *Ann. Bot.* 90, 345–351. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf194>
- English JS, Cronin E. Allergic contact dermatitis from *Cistus creticus*. *Contact Dermatitis* 1988, 18(2):123 (only abstract)
- Falchi, A., Paolini, J., Desjobert, J.M., Melis, A., Costa, J., Varesi, L., 2009. Phylogeography of *Cistus creticus* L. on Corsica and Sardinia inferred by the TRNL-F and RPL32-TRNL sequences of cpDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 538–543. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.04.002>
- Ferrandis, P., Herranz, J.M., Martínez-Sánchez, J.J., 1999. Effect of fire on hard-coated Cistaceae seed banks and its influence on techniques for quantifying seed banks. *Plant Ecol.* 144, 103–114. <https://doi.org/10.1023/A:1009816309061>
- Fokialakis, N., Kalpoutzakis, E., Tekwani, B.L., Skaltsounis, A.L., Duke, S.O., 2006. Antileishmanial activity of natural diterpenes from *Cistus* sp. and semisynthetic derivatives thereof. *Biol. Pharm.Bull.* 29, 1775–1778. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1775>
- Gabriele, M., Parri, E., Felicioli, A., Sagona, S., Pozzo, L., Biondi, C., Domenici, V., Pucci, L., Unit, P., Unit, T., n.d. Paper Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Tuscan Bee Pollen of Different Botanic Origins 27, 2015.
- Garcia-Gonzalez JJ, Crespo V, Barber D, Miranda A, Vega-Chicote JM, Carmona MJ et al. *Cistus ladanifer* contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 2001, 45(4): 238
- Gori, A., Ferrini, F., Marzano, M.C., Tattini, M., Centritto, M., Baratto, M.C., Pogni, R., Brunetti, C., 2016. Characterisation and antioxidant activity of crude extract and polyphenolic rich fractions from *C. Incanus* leaves. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms17081344>
- Gulz, P., Herrmann, T., Hangst, K., 1996. Leaf trichomes in the genus *Cistus*. *Flora* 191, 85–104. [https://doi.org/10.1016/S0367-2530\(17\)30692-8](https://doi.org/10.1016/S0367-2530(17)30692-8)

- Gutfinger T. Phenols in olive oils. *JAOCS* 58: 966-998 (1981)
- Guzmán, B., Vargas, P., 2009. Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid *rbcl* and *trnL-trnF* sequences. *Org. Divers. Evol.* 9, 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.ode.2009.01.001>
- Guzmán, B., Vargas, P., 2005. Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, *trnL-trnF*, and *matK* sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 644– 660. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.04.026>
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T., 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 96, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.033>
- Johnson Jr., C.S., 1999. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy : principles and applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 34, 203–256.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., 1990. Thin-Layer Chromatography Reagents and Detection Methods. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-01031-0>
- Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Chinou, L., Charvala, C., Skaltsounis, a L., 2001. New hemisynthetic manoyl oxide derivatives with antimicrobial activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 49, 814–817. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.814>
- Kalpoutzakis, E., Chinou, I., Mitaku, S., Skaltsounis, A.L., Harvala, C., 1998. Antibacterial labdane-type diterpenes from the resin “ladano” of *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Nat. Prod. Lett.* 11, 173–179. <https://doi.org/10.1080/10575639808044943>
- Kalus, U., Grigorov, A., Kadecki, O., Jansen, J.P., Kiesewetter, H., Radtke, H., 2009. *Cistus incanus* (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract. A prospective, randomised, placebo-controlled clinical study. *Antiviral Res.* 84, 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.001>
- Kalus, U., Kiesewetter, H., Radke H. Effect of CYSTUS052® and green tea on subjective symptoms in patients with infection of the upper respiratory tract *Phytother Res* 2010, 24(1):96-100
- Karim, H., Boubaker, H., Askarne, L., Talibi, I., Msanda, F., Boudyach, E.H., Saadi, B., Ait Ben Aoumar, A., 2016. Antifungal properties of organic extracts of eight *Cistus* L. species against postharvest citrus sour rot. *Lett. Appl. Microbiol.* 62, 16–22.

<https://doi.org/10.1111/lam.12507>

- Kühn, C., Arapogianni, N.E., Halabalaki, M., Hempel, J., Hunger, N., Wober, J., Skaltsounis, A.L., Vollmer, G., 2011a. Constituents from *cistus salvifolius* (Cistaceae) activate peroxisome proliferator-activated receptor- γ but not δ And stimulate glucose uptake by adipocytes. *Planta Med.* 77, 346–353. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250382>
- Küpeli, E., Yesilada, E., 2007. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *J. Ethnopharmacol.* 112, 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.04.011>
- Lendeckel, U., Arndt, M., Wolke, C., Reinhold, D., Kaehne, T., Ansorge, S. Inhibition of human leukocyte function, alanyl aminopeptidase (APN, CD13) and dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD26) enzymatic activities by aqueous extracts of *Cistus incanus* L. ssp. *Incanus*. *J Ethnopharmacol* 2002, 79(2):221-227
- Loizzo, M.R., Ben Jemia, M., Senatore, F., Bruno, M., Menichini, F., Tundis, R., 2013. Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. *Food Chem. Toxicol.* 59, 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.040>
- Maggi, F., Lucarini, D., Papa, F., Peron, G., Dall'Acqua, S., 2016. Phytochemical analysis of the labdanum-poor *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter et Burdet growing in central Italy. *Biochem. Syst. Ecol.* 66, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.02.030>
- Mann, F.G., Saunders, B.C., 1960. *Practical Organic Chemistry*.
- Mansoor, K.A., Matalaka, K.Z., Qa'dan, F.S., Awad, R., Schmidt, M., 2015. Two new proanthocyanidin trimers isolated from *Cistus incanus* L. demonstrate potent anti-inflammatory activity and selectivity to cyclooxygenase isoenzymes inhibition. *Nat. Prod. Res.* 6419, 1–8. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1089242>
- Martínez-Ferri, E., Balaguer, L., Valladares, F., Chico, J.M., Manrique, E., 2000. Energy dissipation in drought-avoiding and drought-tolerant tree species at midday during the Mediterranean summer. *Tree Physiol.* 20, 131–138. <https://doi.org/10.1093/treephys/20.2.131>
- Matsingou, C., Dimas, K., Demetzos, C., 2006. Design and development of liposomes incorporating a bioactive labdane-type diterpene. In vitro growth inhibiting and

- cytotoxic activity against human cancer cell lines. *Biomed. Pharmacother.* = *Biomédecine pharmacothérapie* 60, 191–9.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.03.007>
- Moreira, H., Ślęzak, A., Szyjka, A., Oszmiański, J., Gasiński, K., 2017. Antioxidant and cancer chemopreventive activities of cistus and pomegranate polyphenols. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 74, 688–698.
- Nicoletti, M., Toniolo, C., Venditti, A., Bruno, M., Ben Jemia, M., 2015. Antioxidant activity and chemical composition of three Tunisian Cistus: *Cistus monspeliensis*, *Cistus villosus* and *Cistus libanotis*. *Nat. Prod. Res.* 29, 223–230.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2014.947486>
- Paolini, J., Falchi, A., Quilichini, Y., Desjobert, J.M., Cian, M.C. De, Varesi, L., Costa, J., 2009. Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*). *Phytochemistry* 70, 1146–1160. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.013>
- Papaefthimiou, D., Papanikolaou, A., Falara, V., Givanoudi, S., Kostas, S., Kanellis, A.K., 2014a. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front. Chem.* 2, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00035>
- Petereit, F., Kolodziej, H., Nahrstedt, A., 1991. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* 30, 981–985. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85291-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85291-7)
- Piluzza, G., Bullitta, S., 2011. Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharm.Biol.* 49, 240–247.
<https://doi.org/10.3109/13880209.2010.501083>
- Proksch, P., 1984. Methylated Flavonoids from *Cistus ladanifer* and *Cistus palhinhae* and their Taxonomic Implications. *Phytochemistry* 23, 470–471.
- Qa'dan, F., Petereit, F., Nahrstedt, A., 2003. Prodelphinidin trimers and characterization of a proanthocyanidin oligomer from *Cistus albidus*. *Pharmazie* 58, 416–419.
- Rauwald, H.W., Hutschenreuther, A., Birkemeyer, C., Grötzinger, K., Straubinger, R.K.,

2010. Growth inhibiting activity of volatile oil from *Cistus creticus* L. against *Borrelia burgdorferi* s.s. in vitro. *Pharmazie* 65, 290–295. <https://doi.org/10.1691/ph.2010.9762>
- Rebaya, A., Belghith, S.I., Hammrouni, S., Maaroufi, A., Ayadi, M.T., Chérif, J.K., 2016b. Antibacterial and antifungal activities of ethanol extracts of *Halimium halimifolium*, *Cistus salviifolius* and *Cistus monspeliensis*. *Int. J. Pharm. Clin. Res.* 8, 243–247.
- Rebensburg, S., Helfer, M., Schneider, M., Koppensteiner, H., Eberle, J., Schindler, M., Gürtler, L., Brack-Werner, R., 2016. Potent in vitro antiviral activity of *Cistus incanus* extract against HIV and Filoviruses targets viral envelope proteins. *Sci. Rep.* 6, 20394. <https://doi.org/10.1038/srep20394>
- Reuter, J., Wölfle, U., Weckesser, S., Schempp, C., 2010. Which plant for which skin disease? Part 1: Atopic dermatitis, psoriasis, acne, condyloma and herpes simplex. *JDDG J. der Dtsch. Dermatologischen Gesellschaft* 8, 788–796. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2010.07496>
- Riehle, P., Vollmer, M., Rohn, S., 2013a. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions - Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Res. Int.* 53, 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.020>
- Riehle, P., Vollmer, M., Rohn, S., 2013b. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions - Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Res. Int.* 53, 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.020>
- Singleton V. L., Joseph A, Rossi J.R, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents *Am. J. Enol. Vitic.* 16(3): 144-158 (1965)
- Singleton V. L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol* 299: 152-178 (1999)
- Skorić, M., Todorović, S., Gligorijević, N., Janković, R., Živković, S., Ristić, M., Radulović, S., 2012. Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines. *Ind. Crops Prod.* 38, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.017>

- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 579, 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>
- Sulaymon, A.H., Ebrahim, S.E., 2010. Saving amberlite XAD4 by using inert material in adsorption process. *Desalin. Water Treat.* 20, 234–242. <https://doi.org/10.5004/dwt.2010.1531>
- Thanos, C.A., Georghiou, K., Kadis, C., Pantazi, C., 1992. Cistaceae: A plant family with hard seeds. *Isr. J. Bot.* 41, 251–263. <https://doi.org/10.1080/0021213X.1992.10677232>
- Tomás-Menor, L., Barraji3n-Catal3n, E., Segura-Carretero, A., Mart3, N., Saura, D., Men3ndez, J.A., Joven, J., Micol, V., 2015. The promiscuous and synergic molecular interaction of polyphenols in bactericidal activity: An opportunity to improve the performance of antibiotics? *Phyther. Res.* 29, 466–473. <https://doi.org/10.1002/ptr.5296>
- Tom3s-Menor, L., Morales-Soto, A., Barraji3n-Catal3n, E., Rold3n-Segura, C., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2013a. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food Chem. Toxicol.* 55, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.006>
- Tom3s-Menor, L., Morales-Soto, A., Barraji3n-Catal3n, E., Rold3n-Segura, C., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2013b. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food Chem. Toxicol.* 55, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.006>
- Ulrich Kalus, H.K. and H.R., 2009. Effect of CYSTUS052" and Green Tea on Subjective Symptoms in Patients with Infection of the Upper Respiratory Tract. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 22, 557–559. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Valares Masa, C., Al3as Gallego, J.C., Chaves Lob3n, N., Sosa D3az, T., 2016. Intra-Population Variation of Secondary Metabolites in *Cistus ladanifer* L. *Molecules* 21. <https://doi.org/10.3390/molecules21070945>
- Vega, C. De, Ortiz, P.L., Herrera, C.M., Talavera, S., 2009. The ant-pollination system of *Cytinus hypocistis* (Cytinaceae), a Mediterranean root holoparasite. *Ann. Bot.* 1065–1075. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp049>

- Vitali, F., Pennisi, G., Attaguile, G., Savoca, F., Tita, B., 2011. Antiproliferative and cytotoxic activity of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. on human prostate cell lines. *Nat. Prod. Res.* 25, 188–202. <https://doi.org/10.1080/14786410802583148>
- Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant* 3, 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/spp106>
- Williams, D.H., Stone, M.J., Hauck, P.R., Rahman, S.K., 1989. Why are secondary metabolites (Natural Products) biosynthesized. *J. Nat. Prod.* 52, 1189–1208. <https://doi.org/10.1021/np50066a001>
- Wittpahl, G., Kölling-Speer, I., Basche, S., Herrmann, E., Hannig, M., Speer, K., Hannig, C., 2015. The Polyphenolic Composition of *Cistus incanus* Herbal Tea and Its Antibacterial and Anti-adherent Activity against *Streptococcus mutans*. *Planta Med.* 81, 1727–1735. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1557822>
- Yeşilada, E., Gürbüz, I., Ergun, E., 1997. Effects of *Cistus laurifolius* L. flowers on gastric and duodenal lesions. *J. Ethnopharmacol.* 55, 201–211. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(96\)01502-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(96)01502-4)
- Yeşilada, E., Gürbüz, I., Shibata, H., 1999. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *J. Ethnopharmacol.* 66, 289–293. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00219-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00219-0)
- Ατσαλάκης, Εμμανουήλ, 2017. Απομόνωση και ταυτοποίηση φυσικών προϊόντων. Μεταπτυχιακή Εργασία, Φαρμακευτική ΕΚΠΑ, Αθήνα.
- Βουδούρη, Ηλιάννα, Δεκέμβρης 2018. Φυτοχημική μελέτη εκχυλισμάτων ειδών του γένους *Cistus* με αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Φαρμακευτική ΕΚΠΑ, Αθήνα.
- Καββάδας, Δ., 1990. Εικονογραφημένος Βοτανικός Φυτολογικός Λεξικόν.