

---

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**



**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ**

---



**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**  
*Αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες των αιθέριων  
ελαίων*

**Χλουβεράκη Φανουρία**  
**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011**

*Αντιμικροβιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες των αιθέριων  
ελαίων*

**ΧΛΟΥΒΕΡΑΚΗ ΦΑΝΟΥΡΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Δ. ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ**

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
ΤΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011**

**Antimicrobial and anticancer properties of the essential oils**

**CHLOUVERAKI FANOURIA**

**SUPERVISOR: D. GHANOTAKIS**

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
UNIVERSITY OF CRETE**

**HERAKLIO 2011**

## **ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Δημήτριος Γανωτάκης Καθηγητής Τμήματος Χημείας  
Πανεπιστημίου Κρήτης  
**Επιβλέπων Καθηγητής**

Γεώργιος Τσιώτης Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος  
Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Νικόλαος Χανιωτάκης Καθηγητής Τμήματος Χημείας  
Πανεπιστημίου Κρήτης

*Η εργασία αυτή αφιερώνεται στους γονείς μου,  
Μιχάλη & Μαρίνα.....  
για την υπομονή, τη στήριξη, το κουράγιο  
και πάνω απ'όλα την αγάπη που  
μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.*

## *Ευχαριστήριο Σημείωμα*

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας είχα την τιμή να συνεργαστώ στενά με ανθρώπους υπό τις καλύτερες συνθήκες που θα μπορούσαν να υπάρξουν.

Για τους ανώτερους λόγους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Δημήτριο Γανωτάκη για την ανάθεση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την πραγματοποίηση της εργασίας μου αλλά κυρίως για την συμπαράσταση και τη στήριξη του.

Ευχαριστώ τους Επίκουρους Καθηγητές κ. Τσιώτη και κ. Χανιωτάκη που δέχθηκαν να κρίνουν την παρούσα εργασία. Δε θα μπορούσα να παραλείψω να μην ευχαριστήσω την Ιωάννα Παναγάκου, τον Θεοχάρη Νάζο, τον Άρη Μίχογλου, τον Δημήτρη Στεφανάκη, τον Ελευθέριο Τουλουπάκη την Ελευθερία Βαλσαμή, την Έλλη Φουρναράκη και την Ελίζα Μυτιληνάκη που διέθεσαν τις γνώσεις και την εμπειρία τους στο αντικείμενο της Βιοχημείας στην διάθεση μου και που εκτός από την άψογη συνεργασία που είχαμε υπήρξαν και πολύ καλοί φίλοι. Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω τις φίλες μου από την Ιεράπετρα, τις Μαρία Καλαϊτζάκη, Κατερίνα Χαλκιαδάκη, Ελένη Τζανετάκη, Αθανασία Φωτιάδου και την Έρρικα Χριστοδούλου. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους πολύ καλούς μου φίλους τον Αλέξανδρο Βαρδαβά και την Άννα Τσιστράκη για την στήριξη τους και τις ωραίες στιγμές που μου χάρισαν κατά τα δύο αυτά χρόνια στο Ηράκλειο. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά του εργαστηρίου του κ. Γ. Τσιώτη για την πολύ αρμονική συνεργασία, τις γνώσεις και την φιλία τους.

Τέλος, χρωστάω πολλά περισσότερα στους γονείς μου, στην αδερφή μου και στο αγόρι μου γιατί έκαναν ότι καλύτερο μπορούσαν για μένα, καθώς χωρίς αυτούς δε θα είχα καταφέρει ό,τι έχω κάνει έως σήμερα και για την ηθική και υλική υποστήριξη που μου πρόσφεραν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Με Εκτίμηση

*Φανουρία.....*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
ABSTRACT.....	12
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	13
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	14

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Εισαγωγή.....	14
1.2 Ιστορικά στοιχεία αιθέριων ελαίων.....	14
1.3 Σύνθεση αιθέριων ελαίων.....	15
1.4 Τερπένια.....	15
1.5 Απομόνωση αιθέριων ελαίων.....	16
1.6 Χρήση αιθέριων ελαίων.....	17
1.7 Ονοματολογία αιθέριων ελαίων.....	17
1.8 Περιγραφή αιθεριων ελαίων.....	18
1.8.1 Δεντρολίβανο.....	18
1.8.2 Πευκοβελόνα.....	19
1.8.3 Περγαμοντο.....	20
1.8.4 Ευκάλυπτος.....	20
1.8.5 Τειόδενδρο.....	21
1.8.6 Ρίγανη.....	21
1.8.7 Θυμάρι.....	22

1.9 Μηχανισμοί αντιβακτηριακής δράσης των αιθέριων ελαίων.....	22
1.10 Αντιμυκητιακή δράση των αιθέριων ελαίων.....	23

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Γενικά στοιχεία για τα βακτήρια <i>Escherichia coli</i> .....	24
2.2 Ο ζυμομύκητας <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
2.3 Το άλγος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	26
2.4 Θρεπτικό υλικό.....	27
2.5 Φθορισμός χλωροφυλλής.....	27

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Γενικά στοιχεία για την ακινητοποίηση.....	28
3.2 Μηχανισμός σχηματισμού γέλης.....	28
3.3 Ιδιότητες των αλγινικών σφαιριδίων.....	30
3.4 Βιολογικές ιδιότητες.....	32

<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>33</b>
---------------------------------	-----------

## 4.ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων.....	34
4.1.1 Θρεπτικά διαλύματα.....	34
4.1.2 Παρασκευή τριβλύων.....	34
4.1.3 Τεχνική της μεθόδου bauer-kirby.....	35



4.2 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων.....	36
4.2.1 Αντιοξειδωτική μέθοδος με τη χρήση DPPH.....	36
4.2.2 Διαλύματα.....	37
4.2.3 Τεχνική της μεθόδου.....	37
4.3 Αντικαρκινικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων .....	38
4.3.1 Διαλύματα.....	38
4.3.2 Κυτταρική σειρά A431 .....	38
4.3.3 Καλλιέργεια κυττάρων A431.....	39
4.3.4 Ανακαλλιέργεια A431.....	39
4.3.5 Επώαση των κυττάρων παρουσία ουσιών.....	40
4.3.6 Μέθοδος MTT.....	40
4.4 Επίδραση των αιθέριων ελαίων με το άλγος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	41
4.4.1 Θρεπτικά διαλύματα.....	41
4.4.2 Συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	42
4.4.3 Διαδικασία ακινητοποίησης των αιθέριων ελαίων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου.....	43
4.4.4 Παρασκευή διαλύματος αλγινικού-Αιθέρια έλαια.....	44
4.4.5 Σχηματισμός σφαιριδίων.....	44
4.4.6 Ακινητοποίηση των αιθέριων ελαίων σε σφαιρίδια αλγινικού οξέος.....	45

## 5.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων.....	45
5.2 Αντιμυκητιακή δράση των αιθέριων ελαίων.....	48
5.3 Αντιοξειδωτικές δράση των αιθέριων ελαίων.....	50
5.4 Αντικαρκινικές ιδιότητες αιθέριων ελαίων.....	57
5.5 Μετρήσεις φθορισμού των αιθέριων ελαίων .....	65
5.6 Επίδραση ακινητοποιημένων αιθέριων ελαίων στο άλγος <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	72
6. Συμπεράσματα.....	75
7. Βιβλιογραφία.....	76

## Περίληψη

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση επτά αιθέριων ελαίων. Συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια που μελετήθηκαν είναι τα εξής: *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus globules*, *Thymus vulgaris*, *Citrus bergamia*, *Pinus sylvestris*, *Origanum vulgare* και *Melaleuca alternifolia*. Οι αντιβακτηριακές και οι αντιμυκητιακές ιδιότητες των συγκεκριμένων αιθέριων ελαίων μελετήθηκαν με τη μέθοδο διάχυσης δισκίων. Τα αποτελέσματα της μεθόδου έδειξαν ότι το θυμάρι εμφάνιζε την πιο ισχυρή δράση έναντι των άλλων. Όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων εφαρμόστηκε η μέθοδος αποχρωματισμού DPPH. Η μέθοδος αυτή έδειξε ότι τα αιθέρια έλαια του θυμαριού, της ρίγανης και του τεϊόδεντρου εμφάνισαν την σημαντικότερη αντιοξειδωτική δράση. Οι αντικαρκινικές ιδιότητες πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο MTT. Σημαντική αντικαρκινική δράση εμφάνισαν ο ευκάλυπτος, το περγαμόντο, και η πευκοβελόνα.

Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση των αιθέριων ελαίων έναντι του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii*. Τα αιθέρια έλαια που μελετήθηκαν ήταν τόσο σε ελεύθερη όσο και σε ακινητοποιημένη μορφή σε μήτρα αλγινικού ασβεστίου.

**Λέξεις κλειδιά:** Αιθέρια Έλαια, άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*, δενδρόλιβανο, ευκάλυπτος, θυμάρι, περγαμόντο, πευκοβελόνα, ρίγανη, τεϊόδενδρο, αντιβακτηριακές-αντιμυκητιακές-αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, μέθοδος διάχυσης δισκίων, ακινητοποίηση, αλγινικό ασβέστιο.

## Abstract

In the first part of this work, the antibacterial, antifungal, antioxidant and anticancer activity of seven essential oils was determined. In particular, *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus globules*, *Thymus vulgaris*, *Citrus bergamia*, *Pinus sylvestris*, *Origanum vulgare* and *Melaleuca alternifolia* were studied. The antibacterial and antifungal properties of these essential oils were studied by disc diffusion method. In both cases the *thymus vulgaris* had the more efficient action than the others. Regarding the antioxidant properties of essential oils was applied discoloration DPPH. This method showed that essential oils of *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* and *Melaleuca alternifolia* showed significant antioxidant activity. The anticancer properties were made using the method MTT. Significant anticancer activity showed the *Eucalyptus globules*, *Citrus bergamia* and *Pinus sylvestris*.

In the second part of this thesis examined the effect of the essential oils against the *Chlamydomonas reinhardtii*. The efficient essential oils were immobilized in a matrix of calcium alginate and their activity was studied.

**Keywords:** Essential oils, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus globules*, *Thymus vulgaris*, *Citrus bergamia*, *Pinus sylvestris*, *Origanum vulgare*, *Melaleuca alternifolia*, Antibacterial-antifungal-antioxidative-anticancer properties, activity, disc diffusion assay, immobilization, calcium alginate.

## Ευρετήριο Συντομεύσεων

<b>AE</b>	Αιθέριο Έλαιο
<b>E. Coli</b>	Βακτήριο <i>Escherichia coli</i>
<b>S.cer</b>	Μύκητας <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>
<b>LB</b>	Θρεπτικό Υλικό Luria Bertani
<b>YPD</b>	Θρεπτικό Υλικό με Yeast extract, peptone, dextrose
<b>HBSS</b>	Hank's Buffered Saline Solution
<b>A431</b>	Καρκινικά Επιθηλιακά Ανθρώπινα Κύτταρα
<b>MTT</b>	3-(4,5-διμεθυλτριαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζολικό βρωμίδιο
<b>DPPH</b>	2,2-διφαινυλ-1-πικρυλ-υδραζίλιο
<b>MEOH</b>	Μεθανόλη
<b>I50</b>	Ανασταλτική ποσότητα που προκαλεί 50% αναστολής κυτταρικής ανάπτυξης
<b>DMSO</b>	Διμεθυλο-σουλφοξίδιο
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum- Όρος αίματος Βόειου Εμβρύου
<b>Trypan Blue</b>	Χρωστική Ουσία
<b>PSII</b>	Φωτοσύστημα II
<b>Fv/Fm</b>	Μέγιστη φωτοχημική απόδοση του φωτοσυστήματος II

# 1. Θεωρητικό μέρος

## 1.1 Εισαγωγή

Τα αιθέρια έλαια είναι φυσικές οργανικές ενώσεις που χαρακτηρίζονται από μια έντονη οσμή<sup>[1]</sup>. Εκκρίνονται από ειδικούς αδένες, πόρους και κύτταρα αρωματικών φυτών και από τους χυμούς και ιστούς ορισμένων δένδρων. Βρίσκονται σε ρίζες, άνθη, φύλλα, μίσχους, καρπούς σε ποικίλες ποσότητες<sup>[2]</sup>. Σύμφωνα με τον Hergreaves (1975), αιθέρια έλαια θεωρείται η ομάδα των αρωματικών πτητικών ουσιών, οι οποίες είναι διαλυτές στην αλκοόλη, λιγότερο διαλυτές στο νερό και αποτελούνται από ένα μίγμα εστέρων, αλδευδών, κετονών και τερπενίων<sup>[3]</sup>.

Η σύσταση των αιθέριων ελαίων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η εποχή και η ώρα της ημέρας που συλλέγεται το φυτό, η σύσταση του εδάφους και οι μέθοδοι καλλιέργειας και η μέθοδος παραλαβής<sup>[4]</sup>.

## 1.2 Ιστορικά στοιχεία των αιθέριων ελαίων

Ο όρος αιθέριο έλαιο χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Paracelsus von Hohenheim τον 16<sup>ο</sup> αιώνα για το χαρακτηρισμό του δραστικού συστατικού ενός φαρμάκου (Quinta essential). Τα αρωματικά φυτά είχαν χρησιμοποιηθεί από τα αρχαία χρόνια για συντηρητικά και για φαρμακευτικές ιδιότητες, για να προσδώσουν άρωμα και γεύση στο φαγητό<sup>[5]</sup>.

Οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι χρησιμοποιούσαν όλα σχεδόν τα αρωματικά φυτά σαν αρτύματα και για τον αρωματισμό του κρασιού. Η εμπορία των αιθέριων ελαίων ξεκίνησε από την Ασία, πριν από 6000-7000 χρόνια από τους Κινέζους και συνεχίστηκε από τους Άραβες οι οποίοι το μετέφεραν στην Ευρώπη.

Η μέθοδος της απόσταξης για την παραγωγή και απομόνωση των αιθέριων ελαίων, εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από ανατολικούς λαούς και ιδίως από τους Ινδούς, Πέρσες και Αιγύπτιους. Το πρώτο αιθέριο έλαιο που αποστάχθηκε με πρωτόγονο τρόπο, ήταν το τερεβινθέλιο που βγαίνει από το ρετσίνι των κωνοφόρων δένδρων<sup>[3]</sup>.

### 1.3 Σύνθεση των αιθέριων ελαίων

Το χαρακτηριστικό άρωμα κάθε αιθέριου ελαίου είναι συνισταμένη όλων των συστατικών του, αλλά πολλές φορές η παρουσία ενός μόνο συστατικού σε αναλογία 1% ή και μικρότερη, έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή του αρώματος<sup>[3]</sup>. Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων χωρίζονται σε δυο μεγάλες ομάδες, στα οξυγονούχα και στα μη οξυγονούχα. Στην πρώτη ομάδα περιλαμβάνονται οι αλκοόλες, οι αλδεύδες, οι κετόνες, οι φαινόλες, τα οξέα, οι εστέρες που είναι συστατικά στα οποία οφείλεται το χαρακτηριστικό άρωμα των αιθέριων ελαίων. Οι εστέρες είναι οι ενώσεις που συμβάλουν περισσότερο στο άρωμα των αιθέριων ελαίων. Στην δεύτερη ομάδα ανήκουν τα μη οξυγονούχα όπου περιλαμβάνονται οι υδρογονάνθρακες με τη συμβολή τους στο άρωμα τους να είναι μικρή έως μηδαμινή. Τα κυριότερα από τα οξυγονούχα συστατικά είναι η λίναλοόλη, η γερανιόλη, κίτρονελλόλη, νερόλη, τερπιενόλη, πινεόλη, καμφορά, θυμόλη, καρβακρόλη κ.α. <sup>[3]</sup>.

### 1.4 Τερπένια

Από χημική άποψη, τα φυτικά αιθέρια έλαια αποτελούνται κυρίως από τερπένια. Τα τερπένια είναι μικρά οργανικά μόρια που εμφανίζουν τεράστια ποικιλομορφία ως προς τη δομή τους. Σήμερα γνωρίζουμε τη δομή χιλιάδων τερπενίων, μερικά από αυτά είναι υδρογονάνθρακες, άλλα περιέχουν άτομα οξυγόνου, άλλα όμως είναι μόρια ανοικτής αλυσίδας και άλλα περιέχουν δακτυλίους. Σύμφωνα με το Leopold Ruzicka για το σχηματισμό τους ισχύει ο κανόνας του ισοπρενίου όπου μπορεί να θεωρηθεί ότι τα τερπένια προέρχονται από την συννένωση κεφαλής-ουράς μονάδων ισοπρενίου (2 μεθυλο-1,3-βουταδιένιο) με τον άνθρακα 1 κεφαλή και τον άνθρακα 4 ουρά. Ανάλογα με τον αριθμό ισοπρενικών μονάδων που περιέχουν, τα τερπένια ταξινομούνται σε μονοτερπένια (10 άτομα άνθρακα, 2 ισοπρενικές μονάδες) σεσκιτερπένια (15 άτομα άνθρακα, 3 ισοπρενικές μονάδες)<sup>[6]</sup>.

**Πίνακας 1:** Ταξινόμηση τερπενίων με βάση τον αριθμό ισοπρενικών ομάδων

Ταξινόμηση των τερπενίων		
Αριθμός ατόμων άνθρακα	Μονάδες Ισοπρενίου	Ταξινόμηση
10	2	Μονοτερπένιο
15	3	Σεσκιτερπένιο
20	4	Διτερπένιο
25	5	Σεστερτερπένιο
30	6	Τριτερπένιο
40	8	Τετρατερπένιο

### 1.5 Απομόνωση Αιθέριων Ελαίων

Αρχικά, τα αιθέρια έλαια (ΑΕ) απομονώνονται από τα φυτά και κατόπιν διαχωρίζονται τα συστατικά τους.

Για την απομόνωση των ΑΕ από το φυτικό υλικό συνιστώνται τρεις βασικοί τρόποι:

- απόσταξη με υδρατμούς
- εκχύλιση με πτητικούς διαλύτες
- ψυχρή συμπίεση

Αρχικά, η απόσταξη με υδρατμούς εφαρμόζεται για την παραλαβή ΑΕ, των οποίων τα συστατικά είναι ενώσεις σχετικά σταθερές όπως π.χ το έλαιο της λεβάντας, της δάφνης, και της μέντας. Αυτή η μέθοδος δεν είναι επιτυχής στις περιπτώσεις όπου η παραμονή του φυτικού υλικού σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση για αρκετή ώρα, μπορεί να προκαλέσει σημαντικές μεταβολές στη δομή των περιεχομένων ευπαθών ενώσεων όπως π.χ υδρόλυση, οξείδωση, αφυδάτωση τριτοταγών αλκοολών, μετάθεση ή πολυμερισμό. Οι μεταβολές αυτές αλλοιώνουν την ποιότητα του ΑΕ.

Στη συνέχεια, έχουμε τη μέθοδο της εκχύλισης με πτητικούς αδρανείς διαλύτες που εφαρμόζεται κυρίως στα ευαίσθητα αρώματα.



Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην περίπτωση αυτή είναι συνήθως ο πετρελαϊκός αιθέρας, σπανιότερα ο αιθέρας ενώ ευαίσθητα και μεγάλης αξίας ΑΕ χρησιμοποιείται το υγροποιημένο βουτάνιο ή ακόμα και το υγροποιημένο διοξείδιο του άνθρακα. Με τη μέθοδο αυτή παραλαμβάνονται τα αρώματα των λουλουδιών όπως π.χ του γιασεμιού, του υάκυνθου, της γαρδένιας κ.λ.π.

Τέλος, με τη ψυχρή συμπίεση παραλαμβάνονται τα ΑΕ των φυτικών ιστών, οι οποίοι περιέχουν ελαιώδεις θύλακες όπως π.χ ο φλοιός των καρπών, των εσπεριδοειδών (πορτοκαλέλαιο, λεμονέλαιο)<sup>[7]</sup>.

## **1.6 Χρήση των αιθέριων ελαίων**

Λόγω της χαρακτηριστικής ευχάριστης οσμής τους, τα ίδια τα φυτά ή τα αρωματικά τους ή τα συστατικά τους βρίσκουν εφαρμογές στην αρωματοποιία καλλυντικών και τροφίμων ως φυσικά αρώματα. Πολλά από αυτά εμφανίζουν επιπλέον αντιμυκητιακή και αντιμικροβιακή δράση και εφαρμόζονται στην ιατροφαρμακευτική<sup>[7]</sup>. Ετσι πολλά από τα αιθέρια έλαια και τα πτητικά συστατικά τους χρησιμοποιούνται ευρέως για την πρόληψη και τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών<sup>[5]</sup>.

Η χρήση τους από τον άνθρωπο είναι ευρεία και καλύπτει τους τομείς της κοσμετολογίας, αρωματοποιίας, βιομηχανίας τροφίμων, ποτοποιίας, φαρμακευτικής και ιατρικής<sup>[4]</sup>. Επομένως, τα μίγματα των αιθέριων ελαίων σε καθορισμένη αναλογία χρησιμοποιούνται τοπικά για ανακούφιση ή θεραπεία δερματοπαθειών, ρευματικών προβλημάτων αλλά και ως αφεψήματα σε περίπτωση μολύνσεων του αναπνευστικού. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν προκαλούν εθισμό και δεν έχουν παρενέργειες<sup>[8]</sup>.

## **1.7 Ονοματολογία των χρησιμοποιηθέντων αιθέριων ελαίων**

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι κοινές & επιστημονικές ονομασίες καθώς και οι οικογένειες τους των επτά είδη αιθέριων ελαίων που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη διατριβή (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2:** Ονοματολογία των επτά αιθέριων ελαίων της συγκεκριμένης διατριβής

<b>Κοινή Ονομασία</b>	<b>Επιστημονική Ονομασία</b>	<b>Οικογένεια</b>
Rosemary (Δενδρολίβανο)	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Lamiaceae</i>
Eucalyptus (Ευκάλυπτος)	<i>Eucalyptus globules</i>	<i>Myrtaceae</i>
Thyme (Θυμάρι)	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Lamiaceae</i>
Bergamot (Περγαμόντο)	<i>Citrus bergamia</i>	<i>Rutaceae</i>
Pine Needle (Πευκοβελόνα)	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Pinaceae</i>
Oregano (Ρίγανη)	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Lamiaceae</i>
Tea tree (Τειόδεντρο)	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Myrtaceae</i>

## 1.8 Περιγραφή των αιθέριων ελαίων

Παρακάτω αναφέρονται γενικά χαρακτηριστικά που διαθέτει το καθένα από τα επτά αιθέρια έλαια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής:



**Εικόνα 1:** Ανθισμένο Δεντρολίβανο

### 1.8.1 Δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*)

**Γενικά Χαρακτηριστικά:** Το δεντρολίβανο είναι αρωματικός αειθαλής θάμνος και ανήκει στο γένος Ροσμαρίνος και στην οικογένεια των Χειλανθών.

Το δεντρολίβανο προέρχεται από τη λατινική φράση *Ros Marinus* όπου μεταφράζεται *Δροσιά της Θάλασσας*<sup>[9]</sup>. Η καταγωγή του είναι από τις περιοχές της Μεσογείου. Είναι πυκνόφυλλος και πολύκλαδος θάμνος με ύψος που δεν ξεπερνά τα 2 μέτρα. Τα φύλλα του είναι δερματώδη, μικρά, γραμμοειδή και μοιάζουν με πευκοβελόνες<sup>[9]</sup>.

**Θεραπευτικές Ιδιότητες:** Το δεντρολίβανο χρησιμοποιείται ευρύτατα γιατί παρουσιάζει διάφορες ευεργετικές ιδιότητες όπως αυξάνει βραχυπρόσθεσμα τη λειτουργία του εγκεφάλου, της αναπνοής και την κυκλοφορία του αίματος, έχει σπασμολυτική δράση και μαλακώνει τους πόνους, διεγείρει τη λειτουργία και την έκκριση της χολής. Ακόμα, είναι ευεργετικό στο δέρμα, τονώνει τη λειτουργία του ήπατος, αναζωογονεί τον κουρασμένο οργανισμό<sup>[10,11]</sup>.

**Συστατικά & Προέλευση:** Τα πιο δραστικά συστατικά του συγκεκριμένου αιθέριου ελαίου που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη είναι η σινεόλη, το πινένιο, το καμφένιο, το λιμονένιο, το κυμένιο, η καμφορά.

### 1.8.2 Πευκοβελόνα (*Pinus sylvestris*)

**Γενικά Χαρακτηριστικά:** Χημικά, το έλαιο του πεύκου αποτελείται κυρίως από κυκλικά τερπένια αλκοολών. Μπορεί επίσης να περιέχει τερπένια υδρογονανθράκων, αιθέρες και εστέρες. Η σύνθεση του εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η ποικιλία των πεύκων που παράγεται και τα τμήματα που χρησιμοποιήθηκαν από το δέντρο. Χρησιμοποιείται στην αρωματοθεραπεία ως απολυμαντικό και στην παραγωγή ρετσίνας. Οι μεγάλες δόσεις του αιθέριου ελαίου μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στο κεντρικό νευρικό σύστημα και κατάθλιψη<sup>[12]</sup>.

**Δραστικά συστατικά:** Τα κυριότερα δραστικά συστατικά της πευκοβελόνας είναι: το πινένιο, το καρβένιο, το συλβεστρένιο, η βορνεόλη, το καμφένιο, το διπεντένιο, το φελλανδρένιο.

### 1.8.3 Περγαμόντο (*Citrus bergamia*)

**Γενικά Χαρακτηριστικά:** Το περγαμόντο είναι ένα φρούτο όπου έχει το μέγεθος ενός πορτοκαλιού, με κίτρινο χρώμα, παρόμοιο με το λεμόνι και έχει ευχάριστο άρωμα. Αναπτύσσεται σε μικρά δέντρα που ανθίζουν κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Το περγαμόντο καλλιεργείται κυρίως σε θερμά κλίματα γιατί είναι ευαίσθητο στο ψύχος όπως στη Καλαβρία και στη χώρα μας κυρίως στην Κορινθία, στην Αργολίδα, στην Κέρκυρα και στην Κεφαλλονιά<sup>[13]</sup>.

**Άλλες Χρήσεις:** Σημαντικές εφαρμογές του συγκεκριμένου αιθέριου ελαίου είναι στα καλλυντικά όπως σε σαπούνια, αρώματα, λοσιόν και αποσμητικά. Οι θεραπευτικές του ιδιότητες είναι πολλές όπως αναλγητικές, αντικαταθλιπτικές και αντισηπτικές <sup>[13]</sup>.

**Συστατικά & Προέλευση:** Τα κυριότερα συστατικά του είναι η οξική λιναλίλη, το λεμονένιο, η λιναλοολη, και το μπεργκαπτένιο. Το συγκεκριμένο αιθέριο έλαιο προέρχεται από την φλούδα του φρούτου που καλλιεργείται σε περιοχές με θερμό κλίμα όπως Ιταλία και Μαρόκο.

### 1.8.4 Ευκάλυπτος (*Eucalyptus globulus*)

**Γενικά Χαρακτηριστικά:** Ο Ευκάλυπτος ανήκει στην οικογένεια των φυτών Myrtaceae, καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο και κατάγεται από την Αυστραλία<sup>[14]</sup>.

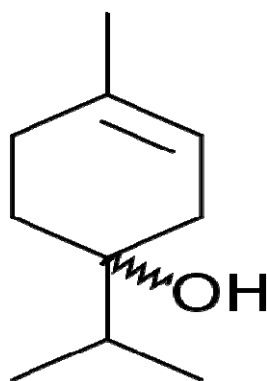
**Χρήσεις:** Το αιθέριο έλαιο του ευκαλύπτου είναι πτητικό και αντισηπτικό, κατάλληλο για τις παθήσεις και τις λοιμώξεις του ουροποιητικού όπως κυστίτιδες κ.λ.π Η σινεόλη όπου είναι το κυριότερο συστατικό του Ευκάλυπτου, χρησιμοποιείται ως συστατικό σε φαρμακευτικά σκευάσματα για την ανακούφιση από συμπτώματα γρίπης και κρυολογήματος. Το αιθέριο έλαιο αυτό έχει αντιβακτηριακές συνέπειες για τα παθογόνα βακτήρια στο αναπνευστικό σύστημα. Επίσης, μπορεί να εφαρμοστεί σε πληγές για την πρόληψη της λοίμωξης<sup>[14]</sup>.

**Συστατικά & Προέλευση:** Τα συστατικά του ευκαλύπτου είναι η σινεόλη, το πινένιο, το κυμένιο. Προέρχεται από τα φύλλα δένδρου και από δένδρα που αναπτύσσονται κατά το μεγαλύτερο μέρος τους στην Αυστραλία.

### 1.8.5 Τειόδεντρο (*Melaleuca alternifolia*)

**Χαρακτηριστικά:** Το έλαιο του τειόδεντρου έχει κίτρινο χρώμα και λαμβάνεται από τα φύλλα του *Melaleuca alternifolia* το οποίο βρίσκεται στην βορειοανατολική ακτή της Νότιας Ουαλίας στην Αυστραλία. Το αιθέριο έλαιο είναι τοξικό όταν λαμβάνεται εσωτερικά, και έτσι δεν πρέπει ποτέ να προστεθεί στα τρόφιμα και στα ποτά<sup>[15]</sup>. Το συγκεκριμένο έλαιο έχει ευεργετικές ιδιότητες στην ιατρική καθώς χρησιμοποιείται σαν αντισηπτικό, αντιμικροβιακό και αντιφλεγμονώδες<sup>[16]</sup>.

**Συστατικά & Προέλευση:** Τα κυριότερα συστατικά του είναι το πινένιο, το τερπένιο, το κυμένιο, το τερπινολένιο, η τερπιν-4-όλη, η τερπινεόλη.



Εικόνα 2: Δομή της τερπιν-4-όλης

### 1.8.6 Ρίγανη (*Origanum vulgare*)



Εικόνα 3: Ανθισμένο φυτό της ρίγανης

**Γενικά Χαρακτηριστικά:** Η ρίγανη διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο μεταξύ των εύκρατων βοτάνων στο Παγκόσμιο Εμπόριο. Καλλιεργείται σε χώρες της Ευρώπης και είναι ένα από τα πιο δημοφιλή βότανα στη Μεσόγειο για το μαγείρεμα<sup>[17]</sup>. Η ρίγανη καλλιεργείται είτε για την χρησιμοποίηση της σαν μπαχαρικό είτε για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου όπου έχει πολύ σημαντική βιολογική δράση. Η ρίγανη αντιπροσωπεύει μια πηγή φυσικών μιγμάτων αντιβακτηριακών συστατικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη σύγχρονη ιατρική για να καταπολεμήσουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς<sup>[18]</sup>. Το έλαιο της ρίγανης έχει χρησιμοποιηθεί κατά παράδοση για αναπνευστικές διαταραχές, δυσπεψία, τερηδόνα, ρευματοειδούς αρθρίτιδες και για το ουροποιητικό σύστημα<sup>[18]</sup>.

**Συστατικά:** Η καρβακρόλη είναι ένα σημαντικό ενεργό συστατικό της ρίγανης και έχει δυνατότητες να χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό στα τρόφιμα. Άλλα χημικά συστατικά της ρίγανης είναι το λιμονένιο, η λιναλόλη, το α-πινένιο και η θυμόλη<sup>[17]</sup>. Η καρβακρόλη και η θυμόλη είναι τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου *Origanum vulgare* όπου αυτά είναι αξιόπιστα για τις αντιμικροβιακές ιδιότητες<sup>[18]</sup>.

### 1.8.7 Θυμάρι (*Thymus vulgaris*)

**Γενικά Χαρακτηριστικά:** Το θυμάρι ή θύμιο (*Thymus vulgaris*) είναι αγγειόσπερμο φυτό, το οποίο ανήκει στην τάξη των Σωληνανθών (*Tubiflorae*) και στην οικογένεια των Χειλανθών (*Labiatae*). Είναι θάμνος μικρού ύψους (μέχρι 30cm), με όρθιους βλαστούς, εξαιρετικά ανθεκτικό. Έχει πολύ ευχάριστο άρωμα. <sup>[19]</sup>. Το συγκεκριμένο ΑΕ έχει αντισηπτικές, αντιβηχικές και αποχρεμπτικές ιδιότητες του αποδίδονται κυρίως στα μονοτερπένια που περιέχει (καρβακρόλη, θυμόλη)<sup>[20]</sup>.

**Συστατικά & Προέλευση:** Τα κυριότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου *Thymus Vulgaris* είναι το θυμένιο, το κυμένιο και η λιναλοολη.

## 1.9 Μηχανισμοί αντιβακτηριακής δράσης των αιθέριων ελαίων

Μέχρι σήμερα δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης των ΑΕ έναντι των μικροοργανισμών. Υπάρχει πληθώρα διαφορετικών χημικών συστατικών που πιστεύεται ότι η αντιμικροβιακή δράση αφορά αρκετούς κυτταρικούς στόχους

και δεν είναι αποτέλεσμα ενός μόνο συγκεκριμένου μηχανισμού. Σημαντικό χαρακτηριστικό των ΑΕ και των συστατικών τους επιτρέπει να διαχωρίζονται εντός των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων, διαταράσσοντας τις δομές τους και καθιστώντας αυτές περισσότερο διαπερατές. Μπορεί να συμβεί απώλεια ιόντων και άλλων κυτταρικών συστατικών. Τα ΑΕ παρουσιάζουν τις ισχυρότερες αντιβακτηριακές ιδιότητες, όπου περιέχουν υψηλό ποσοστό φαινολικών ενώσεων όπως καρβακρόλη, θυμόλη. Η ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να αλληλεπιδρούν με τον κυτταρικό μεταβολισμό επιτυγχάνεται με διαφορετικούς μηχανισμούς όπως διαταραχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, της αντλίας πρωτονίων, της ροής ηλεκτρονίων, της ενεργητικής μεταφοράς και πήξης των συστατικών των κυττάρων, ενώ έχει επιβεβαιωθεί η σημασία της παρουσίας της υδροξυλομάδας στο μόριο τους και η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με ενεργά κέντρα ενζύμων<sup>[4]</sup>. Η θυμόλη και η καρβακρόλη, σε πειράματα με τα βακτήρια *Salmonella typhimurium* και *Escherichia coli*, αποδιοργανώνουν την εξωτερική μεμβράνη και απελευθερώνουν συστατικά της στο εξωτερικό διάλυμα, μειώνουν την αποθήκη της ενδοκυτταρικής τριφωσφορικής αδενοσίνης και αυξάνουν το εξωκυτταρικό ATP. Το αντιμικροβιακό αποτέλεσμα των συστατικών αιθέριων ελαίων εξαρτάται από την υδροφοβικότητα τους και από την κατανομή τους στην κυτοπλασματική μικροβιακή μεμβράνη<sup>[21]</sup>.

## 1.10 Αντιμυκητιακή δράση των αιθέριων ελαίων

Η αντιμυκητιακή δράση των ΑΕ εξαρτάται από την περιεκτικότητά τους σε φαινολικές αλκοόλες. Αρκετά ΑΕ έχουν δείξει σημαντική αντιμυκητιακή δράση σε ζύμες και δερματόφυτα, η πλειοψηφία των αιθέριων ελαίων αποτελείται από φαινολικά δομικά συστατικά όπως η θυμόλη, η καρβακρόλη και η ευγενόλη<sup>[4]</sup>. Έχει βρεθεί σε πειράματα που έχουν γίνει σε κύτταρα ζύμης, ότι οι ουσίες α-πινένιο, β-πινένιο και λεμονένιο καταστρέφουν την κυτταρική ακεραιότητα και παρεμποδίζουν τη λειτουργία της αναπνοής στα μιτοχόνδρια. Ειδικότερα, το β-πινένιο παρεμποδίζει την αναπνοή και στα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* και σε μιτοχόνδρια που απομονώθηκαν από αυτή τη ζύμη, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του προκάλεσαν παρεμπόδιση στη μεταφορά του πρωτονίου και ιόντων καλίου, χωρίς να παρατηρείται επίδραση στη δραστηριότητα ATPάσης<sup>[21]</sup>.

Πολλές φορές τα αποτελέσματα που προκύπτουν από διάφορες μελέτες δεν είναι απόλυτα συγκρίσιμα και αυτό οφείλεται στις ποιοτικές διαφορές των φυτών, στις διαφορές στα στελέχη των μυκήτων καθώς και στη μεθοδολογία που εφαρμόζεται<sup>[4]</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2.1 Γενικά στοιχεία για τα βακτήρια (*Escherichia Coli*)

Το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*) αποτελεί ένα από τα κυριότερα είδη βακτηρίων που βρίσκεται συνήθως στο κατώτερο έντερο των θερμόαιμων ζώων. Τα *Escherichia Coli* ανακαλύφθηκαν το 1885 από τη γερμανίδα παιδίατρο και βακτηριολόγο Theodor Escherich. Τα *E.coli* είναι μέλος της οικογένειας Enterobacteriaceae η οποία περιλαμβάνει πολλά γένη όπως Salmonella, Shigella κ.τ.λ. <sup>[22]</sup>. Το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*) είναι ένα αρνητικό κατά Gram, ραβδοειδούς σχήματος κολοβακτήριο. Έχει μήκος περίπου 2μm και διάμετρο 0,5 μm<sup>[23]</sup>.

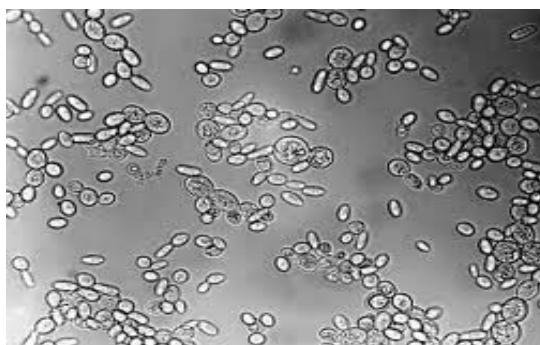
**Πίνακας 3:** Ταξινόμηση βακτηρίου *Escherichia coli*

Επιστημονική Ταξινόμηση	
Τομέας	Βακτήρια
Φύλο	<i>Proteobacteria</i>
Κατηγορία	<i>Gammaproteobacteria</i>
Σειρά	<i>Enterobacteriales</i>
Οικογένεια	<i>Enterobacteriaceae</i>
Γένος	<i>Escherichia</i>
Είδος	<i>E.coli</i>

### 2.2 Ο ζυμομύκητας (*Saccharomyces cerevisiae*)

Ο πιο γνωστός και με τις περισσότερες εφαρμογές μύκητας είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* (εικόνα 4). Είναι και ο μύκητας που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη έρευνα.





**Εικόνα 4:** Το χαρακτηριστικό σχήμα των κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*

Τα κύτταρα *Saccharomyces* προέρχονται από τη λέξεις Saccharo που σημαίνει ζάχαρη και myces μύκητας ενώ cerevisiae προέρχεται από λατινική λέξη που σημαίνει μύρα<sup>[24]</sup>. Τα κύτταρα αυτά είναι σχετικά μικροί μονοκύτταροι οργανισμοί και μορφολογικά είναι σφαιρικοί, κυλινδρικοί ή ελλειψοειδείς. Αποτελείται από κυτταρικό φάκελο, κυτταρόπλασμα, πυρήνα, μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο και άλλα οργανίδια<sup>[25]</sup>. Ο πλέον δημοφιλής ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών (κρασί & μύρα) και για την παρασκευή του ψωμιού.

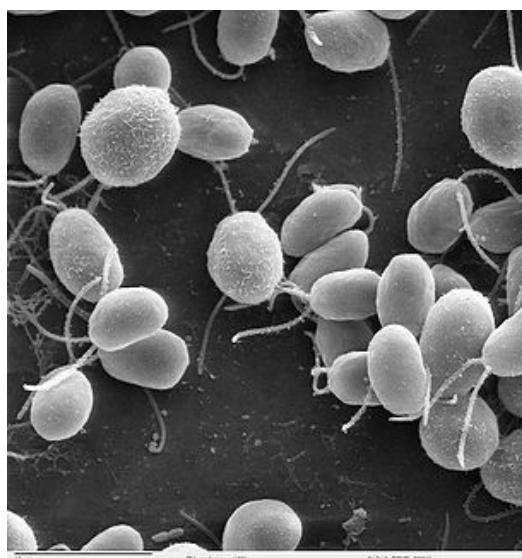
Στον **πίνακα 4** παρατηρείται η συστηματική κατάσταση του *Saccharomyces cerevisiae*:

**Πίνακας 4:** Ταξινόμηση *Saccharomyces cerevisiae*

Επιστημονική Ταξινόμηση	
Τομέας	Μύκητες
Φύλο	Μυκόφυτα
Κλάση	Ασκομύκητες
Υποκλάση	Πρωτοασκομύκητες
Τάξη	Ενδομύκητες
Οικογένεια	<i>Saccharomyceteceae</i>
Γένος	<i>Saccharomyces</i>
Είδος	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

## 2.3 Άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*

Τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* είναι μονοκύτταρα, πράσινα μικροφύκη διαμέτρου περίπου 10 μικρομέτρων που κινούνται με τη χρήση δύο μαστιγίων. Αυτά βρίσκονται στο χώμα και σε υδροβιότοπους γλυκού νερού. Έχουν περικυτταρική μεμβράνη που αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες πλούσιες σε υδροξυπρολίνη, ένα μεγάλο κυπελλοειδή χλωροπλάστη, ένα μεγάλο πυρηνοειδές σωματίο, και ένα στίγμα με το οποίο εντοπίζουν το φως<sup>[26]</sup>.



**Εικόνα 5:** Μονοκύτταρο πράσινο άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*

Το γένος *Chlamydomonas* (στα ελληνικά: *chlamys*, μανδύας· *monas*, μοναχικός, σήμερα χρησιμοποιείται ως ένας γενικός όρος για κάποια μονοκύτταρα μαστιγοφόρα) ονομάστηκε από τον C.G.Ehrenberg (1833,1838), και πιθανόν αναφέρεται στα μαστιγοφόρα *Monas* που περιγράφηκαν το 1786. Τα βασικά χαρακτηριστικά του γένους αυτού είναι δυο πρόσθια μαστίγια ίσου μήκους, ένα κυτταρικό τοίχωμα και ένας χλωροπλάστης ή χρωματοφόρο που περιέχει ένα ή περισσότερα πυρηνοειδή (pyrenoids). Παρόλο που το σχήμα και το μέγεθος του σώματος του κυττάρου ποικίλει ανάμεσα στα είδη των *Chlamydomonas* (όπως ορίζεται από μορφολογικά κριτήρια), η γενική πολική δομή, με τα συνδυασμένα μαστίγια και τον χλωροπλάστη που περιβάλλει ένα ή περισσότερα πυρηνοειδή, είναι σταθερή.

Τα κύτταρα αυτά συνήθως κολυμπούν ελεύθερα σε υγρό μέσο, αλλά μπορούν να αναπτυχθούν και σε στερεό υπόστρωμα όπου δεν χρησιμοποιούν τα μαστιγιά τους. Τοποθεσίες συλλογής περιλαμβάνουν εύκρατες, τροπικές και πολικές περιοχές. Είδη του *Chlamydomonas* έχουν απομονωθεί από λίμνες γλυκού νερού, λιμνούλες βοθρολυμάτων, από θαλασσινά και υφάλμυρα νερά, από χιόνια, απόβλητα κήπων και γεωργικά απόβλητα, από δάση, ερήμους, βάλτους, τοίχους με υγρασία και από μια τεχνητή λίμνη ενός ηφαιστιογενούς νησιού<sup>[26]</sup>.

## 2.4 Θρεπτικό υλικό

Μέχρι τώρα έχουν αναφερθεί κυρίως τρεις συνθήκες ανάπτυξης για άλγη, κατά τις οποίες χρησιμοποιούνται οργανικές πηγές άνθρακα. Φωτοτροφική ή φωτοαυτοτροφική ανάπτυξη συνεπάγεται μια καλλιέργεια με φωτοσυνθετικά αφομοιωμένο CO<sub>2</sub> ως μοναδική πηγή άνθρακα. Ετεροτροφική (οργανοτροφική) ανάπτυξη σημαίνει καλλιέργεια στο σκοτάδι με μια οργανική πηγή άνθρακα (συνήθως οξικό στην περίπτωση των ειδών του *Chlamydomonas*). Τέλος η φωτοετεροτροφική ανάπτυξη που είναι καλλιέργεια στο φως με προστιθέμενο οξικό. Διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης απαιτούν την προσαρμογή των κυττάρων και την περαιτέρω αλλαγή στον μεταβολισμό τους.

Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο είναι πιθανά το μέσο TAP (tris-acetate-phosphate). Προετοιμασία μιας καλής καλλιέργειας απαιτεί μια καλή πηγή νερού. Εργαστηριακό νερό καθαρισμένο με συστήματα απόσταξης ή αντίθετης ώσμωσης ίσως είναι αναγκαίο να περαστεί από μια ανιοανταλλακτική κολώνα πριν τη προετοιμασία του θρεπτικού. Το νερό μπορεί να συμβάλλει είτε στην μη ανάπτυξη των κυττάρων, είτε σε αλλαγές στον κύκλο γονιμοποίησης τους<sup>[26]</sup>.

## 2.5 Φθορισμός της Χλωροφύλλης

Η ανάλυση του φθορισμού της χλωροφύλλης είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική που εφαρμόζεται σε μελέτες της φυσιολογίας και της οικοφυσιολογίας φυτών. Ο Φθορισμός της χλωροφύλλης έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε διάφορες μελέτες για την κατανόηση του μηχανισμού της φωτοσύνθεσης, και για τους μηχανισμούς με τους οποίους ένα πλήθος περιβαλλοντικών παραγόντων επηρεάζουν τη φωτοσυνθετική λειτουργία<sup>[27]</sup>.

Η θεμελιώδης αρχή της ανάλυσης του φθορισμού της χλωροφύλλης είναι απλή. Η ενέργεια του φωτός απορροφάται από τα μόρια χλωροφύλλης, μπορεί να οδηγηθεί σε τρεις διαφορετικές διαδικασίες:

- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ξεκινήσει τη φωτοσύνθεση
- Η πλεονάζουσα ενέργεια μπορεί να αποβληθεί ως θερμότητα
- Μπορεί να επανεκπεμφθεί σαν φθορισμός φωτός της χλωροφύλλης

Η μέτρηση της απόδοσης του φθορισμού της χλωροφύλλης δίνει πληροφορίες για τις αλλαγές της απόδοσης των φωτοχημικών αντιδράσεων ή για την απώλεια ενέργειας σε θερμότητα<sup>[27]</sup>. Ο φθορισμός είναι μια ισχυρή τεχνική αλλά είναι περιορισμένη. Είναι εύκολο να μετρηθεί αλλά αν τα πειράματα δεν έχουν σχεδιαστεί σωστά, μπορεί να είναι αδύνατον να ερμηνευτούν. Ο λόγος  $F_v/F_m$  είναι η πιο συχνή χρησιμοποιούμενη παράμετρος για την αποτελεσματικότητα του PSII. Η παράμετρος αυτή φαίνεται πως μπορεί να συσχετισθεί με τον αριθμό των λειτουργικών κέντρων αντίδρασης του PSII. Πολλές εργασίες έχουν χρησιμοποιήσει αυτό το λόγο ως δείκτη ανεκτικότητας ή ευαισθησία στην καταπόνηση<sup>[28]</sup>

## **Κεφάλαιο 3**

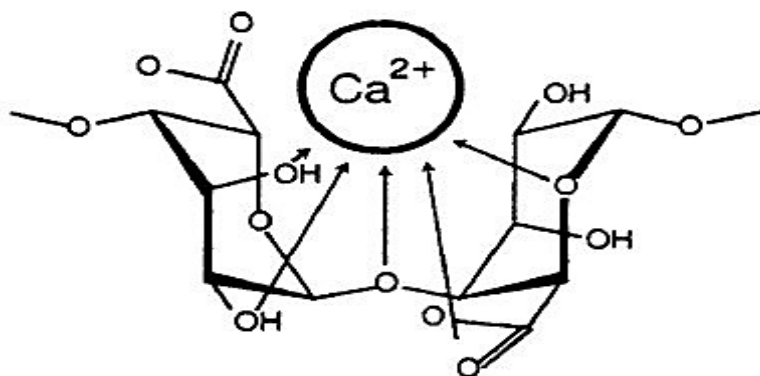
### **3.1 Γενικά στοιχεία για την ακινητοποίηση**

Η ακινητοποίηση είναι μια μέθοδο ουσιαστικής σημασίας στη μελέτη της βιοχημείας. Ένα βασικό μειονέκτημα των βιολογικών υλικών, που εμποδίζει τη χρήση τους σε τεχνολογικές εφαρμογές, είναι η μειωμένη τους σταθερότητα. Η ανάγκη όμως για διατήρηση της ουσιαστικής βιολογικής δραστηριότητας των βιολογικών συστημάτων στην έρευνα καθιστά την ακινητοποίηση αποτελεσματική λύση. Η ακινητοποίηση μιας πρωτεΐνης, ενός ενζύμου ή ενός συμπλόκου μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στη σταθεροποίησή του. Ένα σωματίδιο θεωρείται ακινητοποιημένο όταν η κινητικότητα του περιορίζεται με τεχνητό τρόπο ενώ παράλληλα διατηρείται η δραστηριότητά του<sup>[29]</sup>.

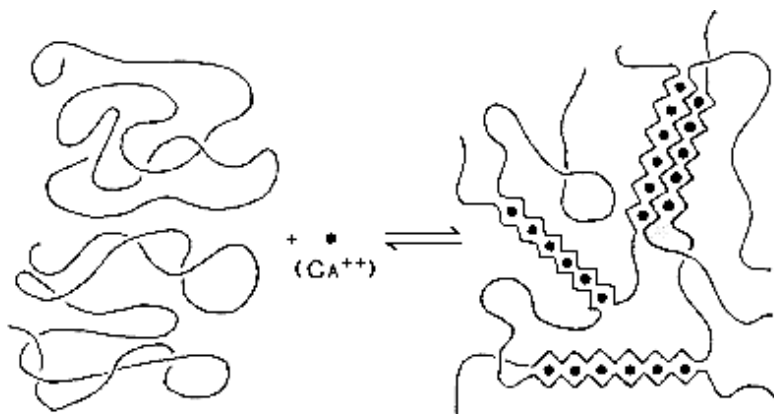
### **3.2 Μηχανισμός σχηματισμού γέλη**

Οι πιο σημαντικές ιδιότητες των αλγινικών είναι η ικανότητα τους να σχηματίζουν γέλες (gels) κατά την αντίδραση τους με δισθενή κατιόντα.

Ο σχηματισμός της γέλης πραγματοποιείται σε ήπιο περιβάλλον, απουσία τοξικών αντιδρώντων. Τα αλγινικά σφαιρίδια παρασκευάζονται προσθέτοντας διάλυμα αλγινικού νατρίου σε διάλυμα δισθενών κατιόντων όπως  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  ή  $\text{Ba}^{2+}$ . Δισθενή κατιόντα που μπορούν επίσης να σχηματίσουν γέλη είναι τα  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  και  $\text{Mn}^{2+}$ , αλλά η χρήση τους είναι περιορισμένη λόγω της τοξικότητάς τους. Τα μονοσθενή κατιόντα και τα ιόντα  $\text{Mg}^{2+}$  δεν επάγουν το σχηματισμό γέλης<sup>[30]</sup>. Η δημιουργία της γέλης και η διασύνδεση του πολυμερούς επιτυγχάνεται κυρίως με ανταλλαγή των ιόντων νατρίου του γουλουρονικού οξέος με τα παραπάνω δισθενή κατιόντα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ιονοτροπικών γελών. Στις εικόνες 6 & 7 που βρίσκονται παρακάτω, παρουσιάζονται η δέσμευση ιόντων ασβεστίου & ο μηχανισμός σχηματισμού γέλης:



Εικόνα 6: Δέσμευση ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$



Εικόνα 7: Μηχανισμός σχηματισμού της γέλης

### 3.3 Ιδιότητες των αλγινικών σφαιριδίων

- Μέγεθος

Το μέγεθος και το σχήμα των σφαιριδίων εξαρτάται κυρίως από το ιξώδες του διαλύματος του αλγινικού νατρίου, το μέγεθος της βελόνας που χρησιμοποιείται και το ύψος μεταξύ της βελόνας και του διαλύματος του  $\text{CaCl}_2$ .

Χρησιμοποιώντας βελόνα μεγάλης διαμέτρου και διάλυμα αλγινικών υψηλού ιξώδους παράγονται σφαιρίδια μεγάλου μεγέθους. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του διαλύματος του αλγινικού νατρίου, τα σφαιρίδια εμφανίζονται περισσότερο ομοιόμορφα και σφαιρικά<sup>[31]</sup>. Ωστόσο η παρασκευή τους καθίσταται δύσκολη πρακτικά, όταν αυξάνει η συγκέντρωση του αλγινικού νατρίου πάνω από 6% w/v, λόγω σημαντικής ανάλογης αύξησης του ιξώδους του διαλύματος<sup>[32] [33] [34]</sup>.

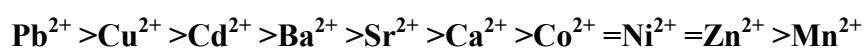
- Φυσικές ιδιότητες

Οι λειτουργικές και φυσικές ιδιότητες των αλγινικών σφαιριδίων εξαρτώνται από τη σύνθεση, την αλληλουχία στη δομή και το μοριακό βάρος του πολυμερούς<sup>[35]</sup><sup>[36]</sup>. Τα σφαιρίδια με τη μικρότερη παρατηρούμενη συρρίκνωση, μεγαλύτερη μηχανική αντοχή, μεγάλο πορώδες και μεγαλύτερη σταθερότητα προέρχονται από αλγινικά με περιεκτικότητα σε α-L-γουλουρονικό οξύ πάνω από 70% και μέσο μήκος G-περιοχών, μεγαλύτερο από 15<sup>[36]</sup>. Τα σφαιρίδια που προέρχονται από αλγινικά με υψηλό περιεχόμενο σε G-περιοχές εμφανίζουν χαρακτηριστική ακαμψία, ενώ αυτά που προκύπτουν από αλγινικά με χαμηλότερο ποσοστό σε G-περιοχών παρουσιάζουν μεγαλύτερη ελαστικότητα<sup>[37]</sup>. Καθοριστικός παράγοντας στη σκληρότητα των σφαιριδίων αποτελεί ο χρόνος παραμονής τους στο διάλυμα του  $\text{CaCl}_2$  (χρόνος σκλήρυνσης). Όσο αυξάνεται ο χρόνος σκλήρυνσης, λαμβάνει χώρα ισχυρότερη αλληλεπίδραση μεταξύ του διαλύματος των αλγινικών και του διαλύματος ασβεστίου, με αποτέλεσμα να παράγονται σφαιρίδια με μικρότερη ελαστικότητα και μεγάλη μηχανική αντοχή<sup>[38]</sup>. Η θολερότητα που παρατηρείται στα παραγόμενα σφαιρίδια είναι αντιστρόφως ανάλογη της αντοχής τους. Χρησιμοποιώντας αλγινικά με υψηλό περιεχόμενο σε G-περιοχές, επιτυγχάνεται σχηματισμός διάφανων γελών, τα οποία και παρουσιάζουν και μεγαλύτερη αντοχή. Τα αλγινικά συνθέτουν θερμοσταθερές γέλες σε μια περιοχή θερμοκρασιών από 0°C ως 100°C.

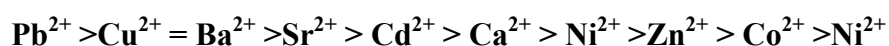
Ωστόσο ο συντελεστής σκληρότητας των γελών μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, υποδεικνύοντας ότι οι φυσικές και οι μηχανικές ιδιότητες των αλγινικών γελών είναι συνάρτηση και της θερμοκρασίας <sup>[39]</sup>. Οι γέλες δύνανται να παρασκευασθούν τόσο σε ζεστό όσο και σε κρύο περιβάλλον <sup>[37]</sup>.

- Χημική σταθερότητα

Για το σχηματισμό των γελών με χαρακτηριστική χημική σταθερότητα, ως καταλληλότερα επιλέγονται τα κατιόντα ασβεστίου, διότι πλεονεκτούν τόσο από πλευράς κόστους, όσο και από πλευράς τοξικότητας. Επίσης η ευαισθησία που παρουσιάζουν όσον αφορά τη σύνδεσή τους με χηλικές ενώσεις, όπως φωσφορικές και κιτρικές ή παρουσία κατιόντων που παρεμποδίζουν το σχηματισμό της γέλης, όπως τα κατιόντα  $\text{Na}^+$  και  $\text{Mg}^{2+}$ , καθιστά το ασβέστιο περιοριστικό αντιδραστήριο για τη δημιουργία γελών. Η απλούστερη μέθοδος προτείνει τη συντήρηση των παραγόμενων αλγινικών σφαιριδίων σε μέσο το οποίο περιέχει ελεύθερα κατιόντα ασβεστίου και τη διατήρηση της αναλογίας  $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$  σε τιμή που εξαρτάται από την σύσταση των αλγινικών <sup>[40][36]</sup>. Για την σταθεροποίηση αλγινικών γελών έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα δισθενή κατιόντα πέραν του ασβεστίου, τα οποία παρουσιάζουν υψηλότερη συγγένεια με τα αλγινικά. Η σειρά συγγένειας η οποία ωστόσο μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με την πηγή προέλευσης των αλγινικών, ακολουθεί το παρακάτω σχήμα:



Ανάλογα με τη συγγένεια του κατιόντος ως προς τα αλγινικά, λαμβάνονται σφαιρίδια με διαφορετικές μηχανικές ιδιότητες <sup>[41]</sup>. Κατιόντα με υψηλή συγγένεια οδηγούν σε άκαμπτα και σκληρά σφαιρίδια, με εξαίρεση τα κατιόντα  $\text{Ni}^{2+}$  και  $\text{Cd}^{2+}$ .



Λόγω της τοξικότητας που εμφανίζουν αρκετά από τα παραπάνω κατιόντα και ιδιαίτερα τα  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  και  $\text{Cd}^{2+}$  περιορίζεται η χρήση τους για τη δημιουργία μητρών ακινητοποίησης ζωντανών κυττάρων και πρωτεϊνών. Επίσης με την προσθήκη τρισθενών κατιόντων όπως  $\text{Ti}^{3+}$  και  $\text{Al}^{3+}$  μπορεί να πραγματοποιηθεί σταθεροποίηση γελών αλγινικού ασβεστίου <sup>[36]</sup>.

### 3.4 Βιολογικές Ιδιότητες

- Βιοσυμβατότητα

Τα αλγινικά όντας φυσικά πολυμερή, δεν παρουσιάζουν τοξικότητα και χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως βοηθητικά πήξης, γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές.

Ανήκουν στην κατηγορία των ενώσεων που είναι εγκεκριμένα από τον FDA για τη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Κατά τη χορήγηση τους δια της στοματικής οδού δεν παρατηρείται ανοσοαπόκριση, ενώ επίσης δεν παρουσιάζουν τοξικότητα και είναι βιοδιασπώμενα <sup>[30]</sup>.

- Ιδανικά χαρακτηριστικά αλγινικών σφαιριδίων

Οι απαραίτητες ιδιότητες που θα πρέπει να παρουσιάζουν τα αλγινικά σφαιρίδια ώστε να θεωρηθούν κατάλληλα ως μήτρες ακινητοποίησης είναι η μεγάλη μηχανική και χημική σταθερότητα, οι ελεγχόμενες ιδιότητες διόγκωσης, το χαμηλό ποσοστό τοξικότητας, το καθορισμένο μέγεθος πόρων και η ομοιόμορφη κατανομή τους <sup>[30]</sup>.



## Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός και η αξιολόγηση των αντιβακτηριακών, αντιμυκητιακών, αντιοξειδωτικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων 7 αιθέριων ελαίων. Συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια θα μελετηθούν είναι τα εξής: *Rosmarinus officinalis*, *Eucalyptus globules*, *Thymus vulgaris*, *Citrus bergamia*, *Pinus sylvestris*, *Origanium vulgare* και *Melaleuca alternifolia*. Παράλληλα, θα μελετηθεί η επίδραση των παραπάνω αιθέριων έναντι του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii*. Τέλος, τα πιο δραστικά αιθέρια έλαια έναντι του *Chlamydomonas reinhardtii* θα ακινητοποιηθούν σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου και θα μελετηθεί η δραστικότητά τους ως προς το στέλεχος αυτό.

## Πειραματικό Μέρος

### 4. Υλικά & Μέθοδοι

#### Αιθέρια Έλαια

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης αγοράστηκε από την Herbissimo & Vita. Τα υπόλοιπα 6 αιθέριων ελαίων που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από την Calmer Solutions Limited Surrey, England.

#### 4.1 Θρεπτικά Διαλύματα

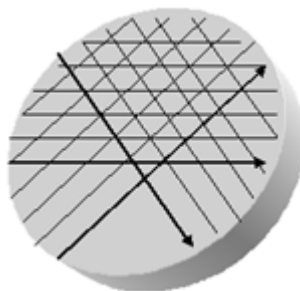
Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό διάλυμα LB για το βακτήριο *Escherichia coli* *InvaF1* (10 gr/L πεπτόνη, 5 gr/L yeast extract, 5 gr/L NaCl), και το θρεπτικό διάλυμα YPD για τους μύκητες *Saccharomyces cerevisiae* *pNAY1* (1% w/v yeast extract, 2% w/v πεπτόνη, 2% w/v δεξτρόζη). Για την παρασκευή των τρυβλίων απαιτείται επιπλέον προσθήκη 1,5% w/v άγαρ. Τα θρεπτικά διαλύματα καθώς και όλα τα σκεύη που χρησιμοποιούνται αποστειρώνονται.

##### 4.1.1 Παρασκευή Τρυβλίων

Το πάχος του άγαρ στα τρυβλία είναι καθοριστικός παράγοντας για τη διαμόρφωση της ζώνης αναστολής. Η διάχυση του αντιβιοτικού γίνεται σε 3 διευθύνσεις, εκτός αν το πάχος του υλικού είναι πολύ μικρό οπότε πολύ γρήγορα (όταν η πυκνότητα του αντιβιοτικού στον πυθμένα είναι η ίδια όπως στην επιφάνεια) γίνεται σε 2 διευθύνσεις, με αποτέλεσμα να διαμορφώνεται τελικά ζώνη αναστολής με μεγαλύτερη διάμετρο. Ενώ όταν το πάχος του θρεπτικού υλικού είναι μεγαλύτερο από 4 mm γίνεται μεγαλύτερη διάχυση του αντιβιοτικού προς το βάθος, με αποτέλεσμα μικρότερες ζώνες αναστολής. Κατά συνέπεια, πρέπει η επιφάνειά τους να είναι ομοιόμορφη και το πάχος του υλικού να είναι περίπου 4 mm. Απαιτούνται 25 mL υλικού για τρυβλία εσωτερικής διαμέτρου 9 cm, ώστε το πάχος να είναι το επιθυμητό.

#### 4.1.2 Τεχνική της μεθόδου Bauer-Kirby

1. Λαμβάνεται με κρίκο μικρό τμήμα από 4-5 αποικίες καθαρού καλλιεργήματος του εκάστοτε μικροοργανισμού και τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα με 4 mL κατάλληλου θρεπτικού.
2. Ο ζωμός επωάζεται στους 35-37°C για 24 ώρες στην περίπτωση του βακτηρίου *E.coli* και 48 ώρες στην περίπτωση του μύκητα *S.cerivisiae*. Η θολερότητα της καλλιέργειας στο τέλος της επώασης πρέπει να είναι ίση του πρότυπου θολωσιμετρικού διαλύματος McFarland No 0,5, η οποία αντιστοιχεί σε πυκνότητα κυττάρων ίση με  $1 \times 10^5$  κύτταρα.
3. Προσαρμόζεται η θολερότητα του καλλιεργήματος με φυσιολογικό ορό, σύμφωνα με το πρότυπο McFarland 0,5 το οποίο αποτελείται από 0,5mL 0,048M BaCl<sub>2</sub> και 99,5mL 1% v/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Η αραιώση γίνεται αρχικά λαμβάνοντας 1 mL του καλλιεργήματος και αναμιγνύοντας το με 1 mL φυσιολογικό ορό. Αν κρίνεται απαραίτητο, πραγματοποιείται περαιτέρω προσαρμογή της θολερότητας.
4. Στη συνέχεια, εμβαπτίζεται βαμβακοφόρος στυλεός στο καλλιέργημα.
5. Η τοποθέτηση του ενοφθαλμίσματος γίνεται με επίστρωση προς τρεις διευθύνσεις. Γίνεται κατ' αυτόν τον τρόπο για να επιτευχθεί η συρρέουσα ανάπτυξη του βακτηρίου ή του μύκητα. Τέλος, γίνεται και μια επιπλέον επίστρωση κυκλικής φοράς, κατά την περίμετρο του τρυβλίου.



**Εικόνα 8:** Τρόποι επίστρωσης του ενοφθαλμίσματος στα τρυβλία.

6. Μετά την παρέλευση 5-15', τοποθετούνται οι δίσκοι αντιβιοτικών, οι οποίοι προηγουμένως έχουν αποστειρωθεί και στους οποίους έχει τοποθετηθεί η επιθυμητή ποσότητα της ουσίας που εξετάζεται.

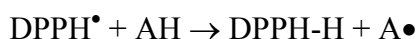
Τα τρυβλία τοποθετούνται για επώαση στους 37 °C. Εκτός από τους δίσκους που είναι εμποτισμένοι με την επιθυμητή ουσία, παρασκευάζεται και σειρά δίσκων που είναι εμποτισμένοι με τα κατάλληλα αντιβιοτικά (θετικοί μάρτυρες). Οι μάρτυρες είναι, 10 μL διαλύματος Ampicillin 50mg/mL (η τελική ποσότητα αμπικιλίνης είναι 0,5mg) και 10 μL διαλύματος Miconazole 1mg/mL (η τελική ποσότητα μικοναζόλης είναι 0,01mg). Οι δίσκοι αυτοί θα χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες, δηλαδή ως μάρτυρες που σχηματίζουν ξεκάθαρες ζώνες αναστολής στα τρυβλία με τους μικροοργανισμούς *E.coli* και *S.cer.*, αντίστοιχα. Ως αρνητικός μάρτυρας και στις δύο περιπτώσεις, χρησιμοποιείται δίσκος, ο οποίος δεν έχει εμποτιστεί με τίποτα και κατά συνέπεια δεν θα εμφανίσει καμία αναστολή στα στελέχη που αναπτύσσονται.

7. Με το πέρας των 24 ή 48 ωρών μετρώνται τα αποτελέσματα. Η μέτρηση γίνεται ακριβώς μέχρι το πλησιέστερο χιλιοστό. Σαν όριο της ζώνης αναστολής θεωρείται το σημείο όπου δεν παρατηρείται μικροβιακή ανάπτυξη με γυμνό μάτι.

## 4.2 Αντιοξειδωτικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων

### 4.2.1 Αντιοξειδωτική μέθοδο με τη χρήση DPPH

Τα τελευταία χρόνια, μια μέθοδος που χρησιμοποιεί μια διαφορετική προσέγγιση για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενώσεων έχει περιγραφεί στην βιβλιογραφία. Για να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική δράση συγκεκριμένων συστατικών ή εκχυλισμάτων, τα τελευταία αφήνονται να αντιδράσουν με μια σταθερή ρίζα, το 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλιο (DPPH<sup>•</sup>) σε ένα μεθανολικό διάλυμα. Η αναγωγή του DPPH<sup>•</sup> όπως επισημαίνεται παρακάτω ακολουθείται από μια καταγραφή της μείωσης στην απορρόφηση του σε ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Στην μορφή του της ρίζας, το DPPH<sup>•</sup> απορροφά στα 515nm, αλλά μετά την αναγωγή από ένα αντιοξειδωτικό (AH) ή ένα είδος ρίζας (R<sup>•</sup>), η απορρόφηση εξαφανίζεται<sup>[42]</sup>.



Η ικανότητα παροχής ηλεκτρονίου ή ατόμου υδρογόνου των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους μετρήθηκε από τον αποχρωματισμό ενός ιώδους χρώματος

μεθανολικού διαλύματος του DPPH. Αυτός ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός χρησιμοποιεί την σταθερή ρίζα 2,2-διφαινυλπικρυλυδραζίλιο (DPPH) ως ένα αντιδραστήριο. Πενήντα μικρόλιτρα από διαφορετικές συγκεντρώσεις των αιθέριων ελαίων σε μεθανόλη προστέθηκαν σε 5 ml ενός 0,002% (w/v) μεθανολικού διαλύματος του DPPH. Μετά από μια περίοδο επώασης 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, καταγράφηκε η απορρόφηση στα 517 nm. Η αναστολή της ελεύθερης ρίζας, του DPPH, σε ποσοστό ( I% ) υπολογίστηκε με τον παρακάτω τρόπο:

$$I \% = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100$$

όπου το  $A_{\text{blank}}$  είναι η απορρόφηση της αντίδρασης ελέγχου (που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από την ένωση που δοκιμάζεται), και  $A_{\text{sample}}$  είναι η απορρόφηση της υπό δοκιμασία ένωσης. Η ποσότητα του αιθέριου ελαίου που παρέχει 50% αναστολή ( $I_{50}$ ) υπολογίστηκε από το γράφημα που απεικονίζει το ποσοστό σε συνάρτηση με την ποσότητα του αιθέριου ελαίου<sup>[43]</sup>.

#### 4.2.2 Διαλύματα

- Διάλυμα DPPH
- Μεθανόλη (MEOH)
- Αιθέρια έλαια σε διάφορες ποσότητες (50μl, 40μl, 25μl, 20μl, 10μl και 5μl)

#### 4.2.3 Τεχνική της μεθόδου

Καταρχάς δημιουργήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των αιθέριων ελαίων σε μεθανόλη (MEOH). Έτσι, σε σειρά δοκιμαστικών σωλήνων κατάλληλα σημασμένων προστέθηκαν κατά σειρά: 50 μl, 40 μl, 25 μl, 20 μl, 10 μl και 5 μl του υπό εξέταση αιθέριου ελαίου και στην συνέχεια συμπληρώθηκε ο όγκος αυτών με μεθανόλη (MEOH) μέχρι να φτάσει τα 50μl σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Στην συνέχεια από το ήδη έτοιμο διάλυμα του DPPH σε μεθανόλη (2 mg DPPH ανά 100 ml MEOH), το οποίο φέρει ένα ανοιχτόχρωμο ιώδες χρώμα και το οποίο φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη και προστατευμένο από το ηλιακό φως, ενώ περίπου ανά δύο φορές την εβδομάδα ανανεώνεται, λήφθηκαν από 5 ml διαλύματος και τα οποία προστέθηκαν στους έξι δοκιμαστικούς σωλήνες με τις αντίστοιχες αραιώσεις των αιθέριων ελαίων. Τέλος, ετοιμάστηκε κι ένας έβδομος δοκιμαστικός σωλήνας (αναφορά), ο οποίος έφερε 5 ml του διαλύματος του DPPH και 50 μl σκέτης

μεθανόλης. Τα δείγματα αυτά αφέθηκαν σε θερμοκρασία και φως δωματίου για 30 min. Μετά την παρέλευση των 30 min και αφού έχει πραγματοποιηθεί ο αποχρωματισμός των διαλυμάτων ανάλογα με την πυκνότητα των αιθέριων ελαίων που περιέχουν πραγματοποιείται μέτρηση των απορροφήσεων αυτών σε SLM-AMINCO DW-2000 UV-Vis Spectrophotometer. Έτσι, ως τυφλό λαμβάνεται η καθαρή MEOH που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του διαλύματος του DPPH, ενώ οι κάθε φορά απορροφήσεις αντικατοπτρίζουν την απορρόφηση κάθε πυκνότητας αιθέριου ελαίου. Στο τέλος λαμβάνεται και η απορρόφηση του έβδομου δοκιμαστικού σωλήνα που αποτελεί το  $A_{\text{blank}}$ , δηλαδή το μέτρο σύγκρισης των απορροφήσεων των υπόλοιπων δοκιμαστικών σωλήνων. Η αλλαγή του χρώματος των διαλυμάτων κάποιων επιλεγμένων υπό μελέτη αιθέριων ελαίων καθώς και οι γραφικές παραστάσεις των ποσοστών αναστολής της ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των αιθέριων ελαίων παρατίθενται στα αποτελέσματα. Η δοκιμασία αυτή επαναλήφθηκε εις τριπλούν για καθένα από τα 7 αιθέρια έλαια.

### **4.3 Αντικαρκινικές Ιδιότητες των Αιθέριων Ελαίων**

#### **4.3.1 Διαλύματα**

1. Θρεπτικό διάλυμα DMEM: 4500mg glucose/L, 110mg Sodium Pyruvate/L και L-glutamine προσθέστηκε 10% v/v FBS (Fetal bovine serum-ορός αίματος βόειου εμβρύου).
2. Διάλυμα HBSS 10x: 4 gr/L KCl, 0.6gt/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 80gr/L NaCl, 0.621gr/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
3. Διάλυμα θρυψίνης: 0,25% v/v θρυψίνη σε διάλυμα HBSS

Τα διαλύματα πριν χρησιμοποιηθούν, φιλτράρονται με φίλτρο whatman 0.2 $\mu\text{m}$ , και θερμαίνονται σε υδατόλουτρο στους 37°C. Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα.

#### **4.3.2 Κυτταρική σειρά A431**

Τα A431 είναι μια σειρά επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων που χρησιμοποιούνται στην βιοιατρική έρευνα. Πιο συγκεκριμένα, αυτά χρησιμοποιούνται σε μελέτες του κυτταρικού κύκλου, και του καρκίνου που σχετίζονται με τη κυτταρική πορεία σηματοδότησης όπου εκφράζουν πολύ υψηλά επίπεδα του

επιδερμικού αυξητικού παράγοντα Τα A431 κύτταρα δημιουργήθηκαν από επιθηλιακό καρκίνωμα στο αιδίο της 85χρονης ασθενής γυναίκα<sup>[44]</sup>.

### 4.3.3 Καλλιέργεια Κυττάρων A431

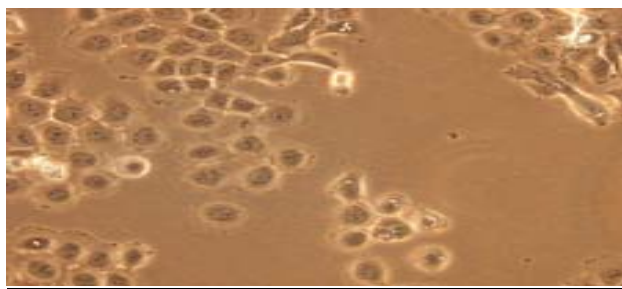
Τα κύτταρα A431 από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  επωάζονται σε υδατόλουτρο των  $37^{\circ}\text{C}$  μέχρι να ξεπαγώσουν. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 400g για 2min, έκπλυση με 3ml θρεπτικό υλικό και φυγοκέντρηση για 2min. Στη συνέχεια, προστίθενται 3mL θρεπτικού υλικού τοποθετούνται σε φλάσκα επιφάνειας  $25\text{ cm}^2$ , (εικόνα 9). Η φλάσκα επωάζεται σε συνθήκες  $37^{\circ}\text{C}$  και 5%  $\text{CO}_2$  μέχρι να αναπτυχθούν τα κύτταρα επαρκώς.



**Εικόνα 9:** Μικρή φλάσκα όπου περιέχει 6ml θρεπτικό υλικό και 1ml κύτταρα A431

### 4.3.4 Ανακαλλιέργεια Κυττάρων

Όταν τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί και έχουν καλύψει την επιφάνεια της φλάσκας (εικόνα 10), τότε το θρεπτικό απορρίπτεται και τα κύτταρα ξεπλένονται τρεις φορές με 5 mL διαλύματος HBSS. Έπειτα τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια της φλάσκας, με τη χρήση 2 mL θρυψίνης. Στο διάλυμα προστίθενται 3mL θρεπτικού διαλύματος και το αιώρημα φυγοκεντρείται στα 400g για δύο λεπτά περίπου. Αφού μετρηθεί η πυκνότητα των κυττάρων χρησιμοποιώντας τη πλάκα , Neubauer το αιώρημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για ανακαλλιέργεια είτε σε περαιτέρω εφαρμογές.



**Εικόνα 10:** Μονοστοιβάδα κυττάρων A431

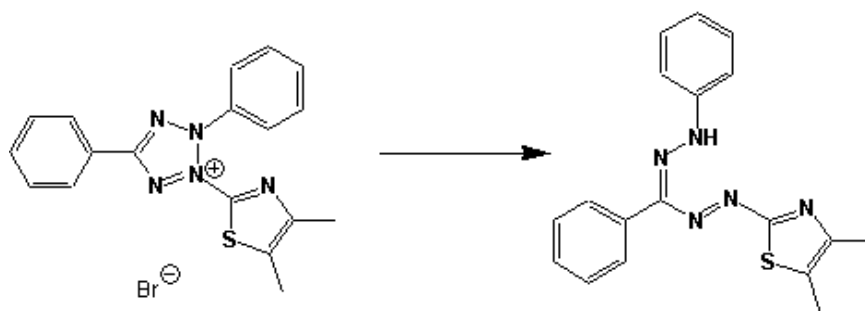
#### **4.3.5 Επώαση των κυττάρων παρουσία των ουσιών**

Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιείται σε τριβλία 24 θέσεων. Σε κάθε θέση εισάγεται τόση ποσότητα κυττάρων ώστε ο τελικός της αριθμός κυττάρων να είναι  $3 \cdot 10^4$  κύτταρα. Ακολουθεί προσθήκη θρεπτικού υλικού, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 800μl. Τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν μία μέρα. Τέλος, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται εκ νέου ποσότητα θρεπτικού υλικού μαζί με την προς εξέταση ουσία σε τελικό όγκο 800μl. Σε κάθε θέση τοποθετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου και το υπόλοιπο θρεπτικό υλικό ώστε να είναι τελικός όγκος 800 μL. Για τη καλύτερη διαλυτοποίηση του αιθέριου ελαίου χρησιμοποιήθηκε χολικό νάτριο αρχικής συγκέντρωσης 1,5% w/v. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h.

#### **4.3.6 Μέθοδος MTT**

Η μέθοδος MTT στηρίζεται στο διαχωρισμό του κίτρινου άλατος του τετραζολίου (MTT), προς αδιάλυτους σκούρους μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης (εικόνα 11). Ο διαχωρισμός αυτός, γίνεται μόνο από τα ζωντανά κύτταρα, και συγκεκριμένα από το ένζυμο σουκινική δεϋδρογονάση στα μιτοχόνδρια των κυττάρων [45,46,47]. Οι αδιάλυτοι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλύονται στην ισοπροπανόλη ή άλλο οργανικό διαλύτη (π.χ. DMSO). Η οπτική πυκνότητα του διαλυμένου υλικού μετράται φασματοφωτομετρικά (556nm) λόγω απορρόφησης της βαφής (μωβ χρώμα), η οποία αντιστοιχεί στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων στο διάλυμα.





**Εικόνα 11:** Μετατροπή του άλατος του τετραζολίου σε κρυστάλλους φορμαζάνης

#### 4.4 Επίδραση των αιθέριων ελαίων στο άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*

##### 4.4.1 Θρεπτικά διαλύματα

Θρεπτικό υλικό για υγρή καλλιέργεια TAP, pH=7,2 :

TAP	1L pH=7,2
Tris base	2,42g
Phosphate buffer	1ml
Hunter's Trace Metals	1ml
Solution A	10ml
Acetic acid	1ml

##### Phosphate Buffer:

Ενωση	100ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,8g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,6g

##### Hutner's trace elements:

EDTA disodium salt	5 g	25 ml
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,2 g	10 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,14 g	20 ml
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,506 g	5 ml
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,161 g	5 ml
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,157 g	5 ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,110 g	5 ml
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,499 g	5 ml
*Final Volume = 100ml		

### Solution A:

Ένωση	500ml
NH <sub>4</sub> Cl	20g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2,5g

Το υγρό θρεπτικό TAP εισάγεται σε κωνικές φιάλες και αποστειρώνεται στους 120°C για 15 λεπτά.



Εικόνα 12: Καλλιέργειες του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii*

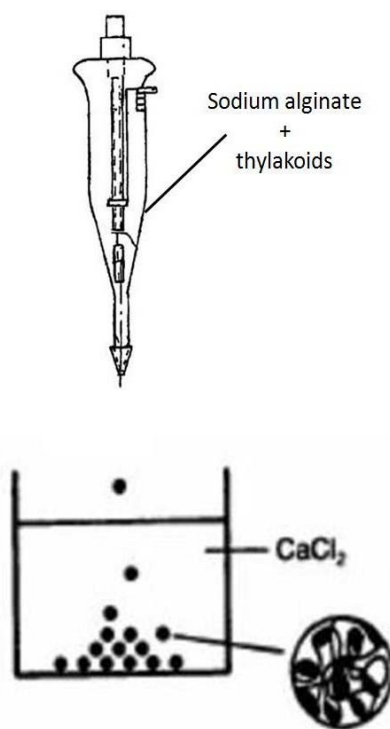
#### 4.4.2 Συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii*

Σε κωνικές φιάλες που περιέχουν 100mL θρεπτικού υλικού TAP (Tris-acetate-phosphate), εμβολιάζεται με 1000μL κύτταρα wild type (CC) *Chlamydomonas reinhardtii*. Σε κάθε φιάλη εισάγεται 5μl αιθέριου ελαίου. Ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας σε θερμοκρασία 25°C υπό ανάδευση, κάτω από λευκές λάμπες φθορισμού (ένταση φωτισμού 100 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Harris. Ο μάρτυρας μας είναι 1000μL κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*. Μετρήσεις φθορισμού πραγματοποιούνται με φθορισμόμετρο Hansatech Handy Pea κάθε 1h. Πριν από κάθε μέτρηση οι κωνικές φιάλες αφήνονται στο σκοτάδι για τουλάχιστον 15 min Η παράμετρος που εξετάστηκε από τις μετρήσεις του φθορισμού είναι Fv/Fm (μέγιστη αποδοτικότητα του Φωτοσυστήματος II).

#### 4.4.3 Διαδικασία ακινητοποίησης αιθέριων ελαίων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου

Κατά την διαδικασία ακινητοποίησης, αιθέριο έλαιο & χολικό νάτριο αναμιγνύεται με διάλυμα αλγινικού νατρίου. Στη συνέχεια το μίγμα εισάγεται στάγδην σε διάλυμα, το οποίο περιέχει πολυσθενές κατιόν (συνήθως  $\text{Ca}^{2+}$ ). Οι σταγόνες σχηματίζουν αυθόρμητα σφαιρίδια, παγιδεύοντας το αιθέριο έλαιο.

Στην εικόνα παρουσιάζεται η διαδικασία ακινητοποίησης σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου.



**Εικόνα13 :** Διαδικασία ακινητοποίησης σε αλγινικά σφαιρίδια

Όλη η διαδικασία της ακινητοποίησης πραγματοποιείται στο Laminar flow ενώ όλα τα σκεύη και τα διαλύματα που έχουν αποστειρωθεί στο κλίβανο σε θερμοκρασία  $120^\circ \text{C}$ .

Πιο αναλυτικά η διαδικασία ακινητοποίησης σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου απαιτεί τα ακόλουθα βήματα:

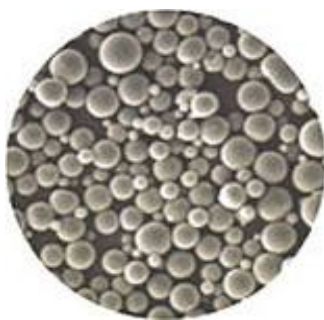
#### 4.4.4 Παρασκευή διαλύματος αλγινικού - αιθέριου ελαίου

Το αλγινικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στον σχηματισμό των σφαιριδίων παρασκευάζεται με διάλυση, κατόπιν ανάδευσης, του αλγινικού νατρίου σε απιονισμένο νερό. Η ανάδευση που πραγματοποιείται είναι ήπια προκειμένου να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Τα διαλύματα αλγινικού νατρίου που χρησιμοποιήθηκαν είχαν αρχική συγκέντρωση 5% w/v. Στη συνέχεια, σε διάλυμα 1mL αλγινικού νατρίου προστίθεται 200μL αιθέριου ελαίου ρίγανης ή θυμαριού και 50 μL χολικού νατρίου. Για την καλύτερη διαλυτοποίηση του αιθέριου ελαίου χρησιμοποιείται ποσότητα χολικού νατρίου.

#### 4.4.5 Σχηματισμός σφαιριδίων

Το μίγμα αλγινικού με το αιθέριο έλαιο εισάγεται στάγδην με τη βοήθεια σύριγγας σε 10 ml διαλύματος 0.1M CaCl<sub>2</sub>. Κατά την εισαγωγή εφαρμόζεται ήπια ανάδευση στο διάλυμα του ασβεστίου προκειμένου να αποφευχθεί η συγκόλληση των σφαιριδίων. Η διάμετρος εξόδου είναι περίπου 1 mm ενώ το ύψος της σύριγγας είναι 20cm από την επιφάνεια του διαλύματος του CaCl<sub>2</sub>. Όταν έρθουν σε επαφή σταγόνες του παραπάνω μίγματος με το διάλυμα του ασβεστίου, παρατηρείται ο σχηματισμός των σφαιριδίων. Τα σχηματιζόμενα σφαιρίδια αφήνονται υπό ανάδευση για 1 ώρα ώστε να υποστούν την διαδικασία της σκλήρυνσης.

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία της σκλήρυνσης, τα σφαιρίδια ξεπλένονται με άφθονο αποστειρωμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί το ελεύθερο CaCl<sub>2</sub> και κατόπιν μεταφέρονται σε αποστειρωμένο Falcon όπου φυλάσσονται στο ψυγείο στους 4°C. Έπειτα, σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη η οποία περιέχει 100mL θρεπτικού TAP pH=7.2, 1000μL διαλύματος κυττάρων *Chlamydomonas Reinhardtii* εισάγεται 1 ή 2 σφαιρίδια με αιθέριο έλαιο (θυμάρι ή ρίγανη αντίστοιχα).



**Εικόνα 14:** Αλγινικά σφαιρίδια

#### **4.4.6 Ακίνητοποίηση αιθέριων ελαίων σε σφαιρίδια αλγινικού οξέος**

Τα πιο ισχυρά αιθέρια έλαια ακίνητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου και εν συνέχεια προσδιορίστηκε η δραστηρότητα τους σε καλλιέργειες του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii*. Σε κωνικές φιάλες που περιέχουν 100mL θρεπτικού υλικού TAP (Tris-acetate-phosphate), εμβολιάζεται με 1000μL κύτταρα wild type (CC) *Chlamydomonas reinhardtii*. Συγκεκριμένα σε 3 διαφορετικές καλλιέργειες *Chlamydomonas reinhardtii* εισάγονται 1 σφαιρίδιο αλγινικού ασβεστίου με ρίγανη, 1 σφαιρίδιο με θυμάρι και 1 σφαιρίδιο χωρίς αιθέριο έλαιο. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται με 2 σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου. Ακολουθεί επώαση της καλλιέργειας σε θερμοκρασία 25°C υπό ανάδευση, κάτω από λευκές λάμπες φθορισμού (ένταση φωτισμού 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Harris. Ο μάρτυρας μας είναι 1000μL κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*.

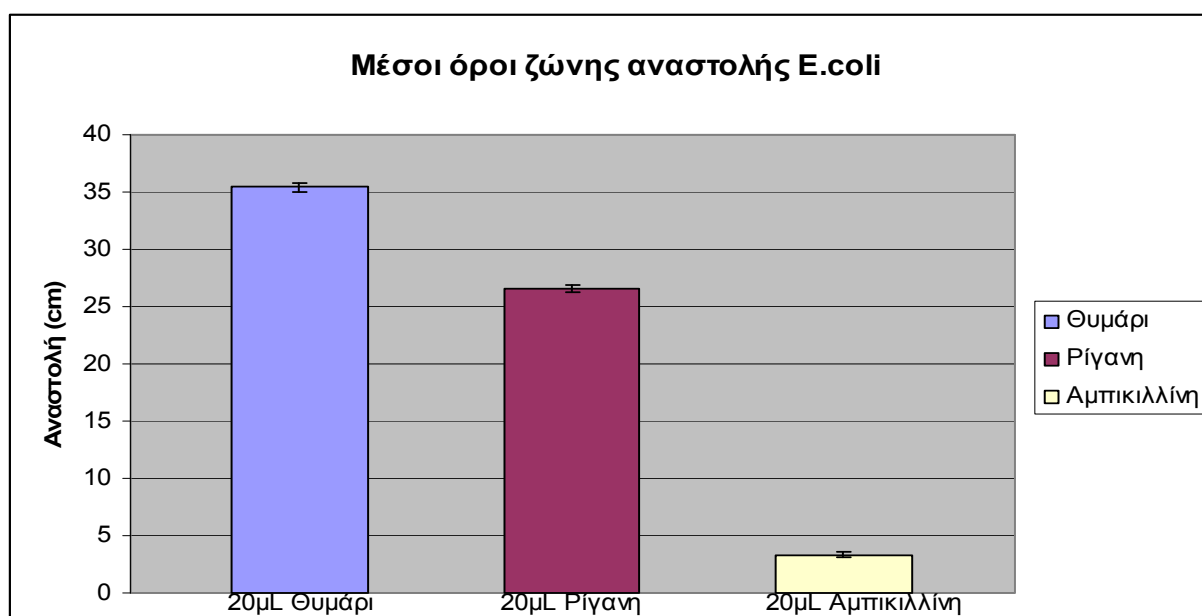
### **5.Αποτελέσματα –Συζήτηση**

#### **5.1 Αντιβακτηριακή δράση των Αιθέριων Ελαίων**

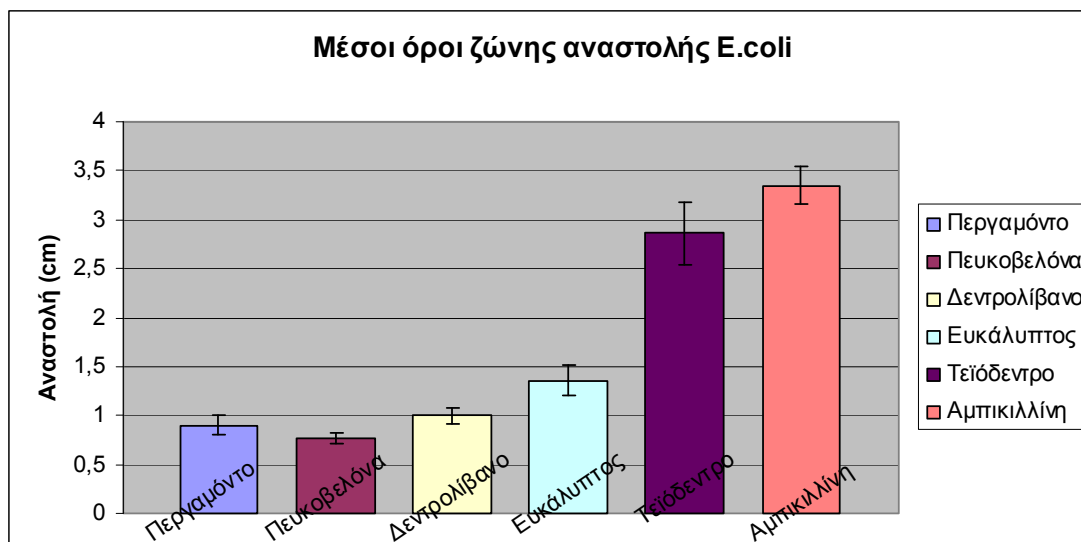
Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του αντιβακτηριακού προσδιορισμού της μεθόδου διάχυσης δίσκων. Στη 3 στήλη παρατηρούνται οι ζώνες αναστολής για το κάθε αιθέριο έλαιο. Οι τιμές αυτές αποτελούν το μέσο όρο των τριών μετρήσεων για το κάθε αιθέριο έλαιο.

**Πίνακας 5:** Αντιβακτηριακή δράστικότητα των 7 αιθέριων ελαίων έναντι του βακτηρίου *E.coli*

Αιθέρια έλαια (κοινή ονομασία)	Αιθέρια έλαια (επιστημονική ονομασία)	Μ.Ο	Τυπική Απόκλιση
Δεντρολίβανο	<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,0cm	0,08
Πευκοβελόνα	<i>Pinus Sylvestris</i>	0,77cm	0,06
Περγαμόντο	<i>Citrus bergamia</i>	0,90cm	0,10
Ευκάλυπτος	<i>Eucalyptus globules</i>	1,36cm	0,15
Τειοδεντρο	<i>Melaleuca alternifolia</i>	2,86cm	0,32
Ρίγανη	<i>Origanum vulgare</i>	2,66cm	0,28
Θυμάρι	<i>Thymus vulgaris</i>	1,77cm	0,38



**Εικόνα 15:** Γραφική απεικόνιση των ζωνών αναστολής των αιθέριων ελαίων θυμαριού και ρίγανης ενάντια του βακτηρίου *E.coli*.



**Εικόνα 16:** Γραφική απεικόνιση των ζωνών αναστολής, 5 αιθέριων ελαίων ενάντια του βακτηρίου *E.coli*.

Για τη μελέτη της δραστηριότητας των αιθέριων χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *E.coli* – στέλεχος *InvaF1*. Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα τα αιθέρια έλαια με την μεγαλύτερη δραστηριότητα ήταν το θυμάρι, η ρίγανη και το τειόδεντρο ενώ αυτά με τη πιο χαμηλή δράση ήταν η πευκοβελόνα και το περγαμόντο. Η αντιβακτηρική δράση του θυμαριού ήταν αξιοσημείωτα ισχυρότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια. Η ρίγανη είναι το αιθέριο έλαιο που ακολουθεί σε δραστηριότητα. Μάλιστα, πρέπει να αναφερθεί ότι το αιθέριο έλαιο του θυμαριού έχει υποστεί αραίωση 1:20 με μεθανόλη (MeOH). Στο δίσκο αναστολής τοποθετήθηκαν 19μl MeOH και 1μl αιθέριο έλαιο από θυμάρι λόγω της υψηλής δραστηριότητας του. Στη ρίγανη πραγματοποιήθηκε αραίωση 1:10 με MeOH, όπου τοποθετήθηκαν στο δίσκο αναστολής 18μl MeOH και 2μl αιθέριο έλαιο Ρίγανης. Σε κάθε δίσκο αναστολής τοποθετήσαμε συνολικά 20μL δείγματος αιθέριου ελαίου. Οι ζώνες αναστολής που σχηματίστηκαν από την αμπικικιλίνη δηλαδή το αντιβιοτικό μας και στους τρεις κύκλους επανάληψης πειραμάτων κυμαίνονται από 2,9 cm έως 3,6 cm. Επίσης, πρέπει να αναφέρουμε ότι σε καμία περίπτωση στον αρνητικό μάρτυρα (-) δεν σχηματίστηκε ζώνη αναστολής.

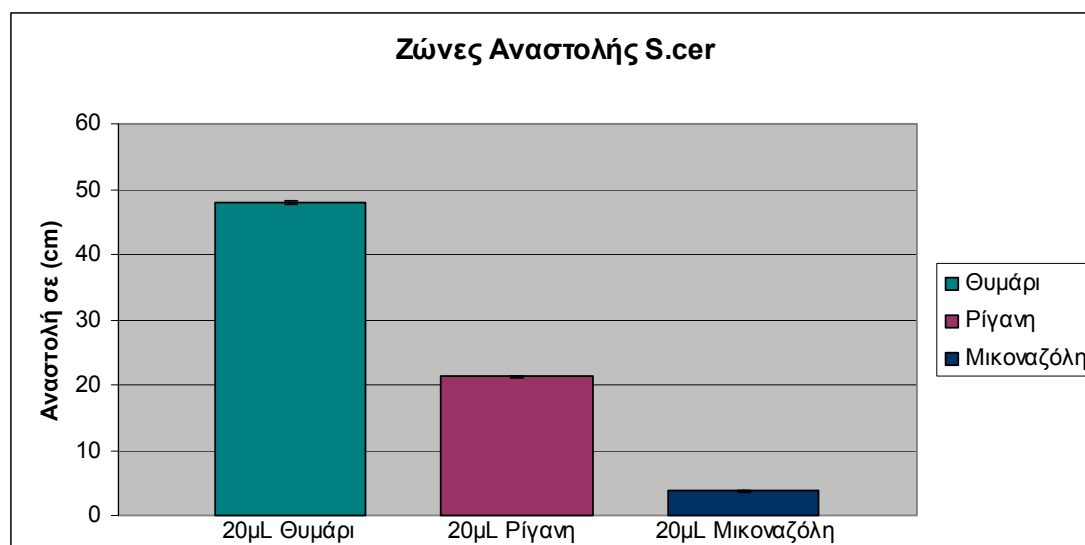
Τέλος, η σειρά ταξινόμησης των αιθέριων ελαίων που προκύπτει από το παραπάνω διάγραμμα σε σχέση με την αντιβακτηριακή δράση είναι η εξής: θυμάρι>ρίγανη>τειόδεντρο>ευκάλυπτος>δεντρολίβανο>περγαμόντο>πευκοβελόνα.

## 5.2 Αντιμυκητιακή δράση των αιθέριων ελαίων

Ο πίνακας 6 που ακολουθεί απεικονίζει τα αποτελέσματα της αντιμυκητιακής δράσης των αιθέριων ελαίων με τη μέθοδο της διάχυσης δισκίων. Η 3 στήλη απεικονίζει το μέσο όρο των τριών μετρήσεων της διαμέτρου της ζώνης αναστολής σε εκατοστά για το κάθε αιθέριο έλαιο.

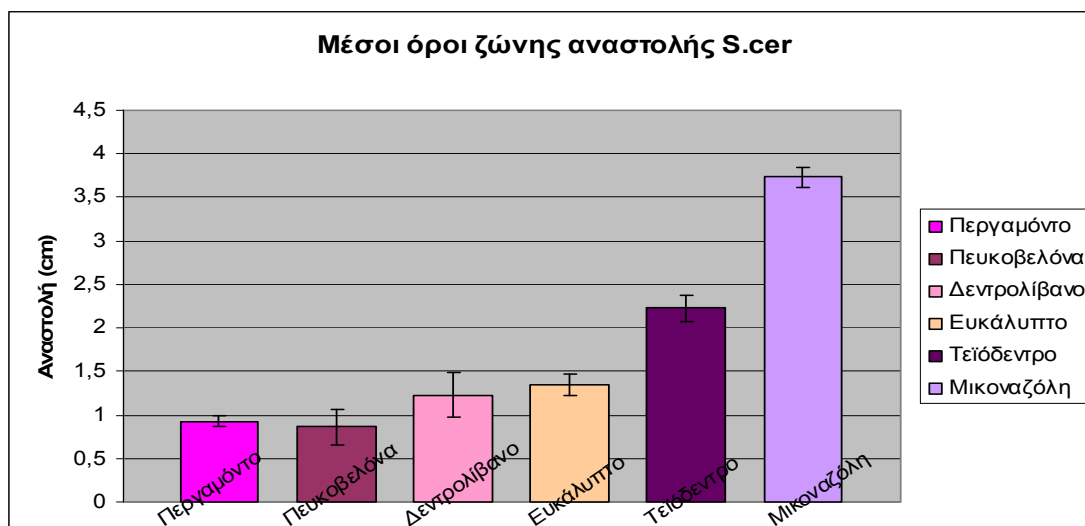
**Πίνακας 6:** Αντιμυκητιακή δράση εκφρασμένη ως διάμετρος των ζωνών αναστολής ενάντια στον μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* των 7 αιθέριων ελαίων της μελέτης.

Αιθέρια έλαια (κοινή ονομασία)	Αιθέρια έλαια (επιστημονική ονομασία)	Μ.Ο	Τυπική Απόκλιση
Δεντρολίβανο	<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,23cm	0,25
Πευκοβελόνα	<i>Pinus Sylvestris</i>	0,86cm	0,21
Περγαμόντο	<i>Citrus bergamia</i>	0,93cm	0,06
Ευκάλυπτος	<i>Eucalyptus globules</i>	1,4cm	0,1
Τειόδεντρο	<i>Melaleuca alternifolia</i>	2,23cm	0,15
Ρίγανη	<i>Origanum vulgare</i>	2,3cm	0,17
Θυμάρι	<i>Thymus vulgaris</i>	2,4cm	0,26



**Εικόνα 17:** Γραφική απεικόνιση των διαμέτρων των 2 πιο ισχυρότερων αιθέριων ελαίων ενάντια του μύκητα *S.cer*.





**Εικόνα 18:** Γραφική απεικόνιση των διαμέτρων (cm) των 5 αιθέριων ελαίων ενάντια του μύκητα *S.cer*.

Για την μελέτη της αντιμυκητιακής δράσης χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Saccharomyces Cerevisiae* - στέλεχος *pNAY1*. Από το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνουμε ότι την ισχυρότερη αντιμυκητιακή δράση εμφανίζει το θυμάρι (*Thymus vulgaris*) και μετά έπεται η ρίγανη (*Origanum vulgare*). Οι μέσοι όροι των ζωνών αναστολής του θυμαριού και της ρίγανης ήταν 2,4cm και 2,125cm αντίστοιχα. Πρέπει να σημειωθεί ότι έγινε αραίωση στο θυμάρι και στη ρίγανη όμοια με αυτή των αντιβακτηριακών μετρήσεων. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι οι διάμετροι των ζωνών αναστολής του θετικού μάρτυρα ήταν 2,9-3,6cm για τον 1<sup>ο</sup> κύκλο του πειράματος, 2,5-3,8 cm για τον 2<sup>ο</sup> κύκλο και τέλος 2,8-3,8cm για τον 3<sup>ο</sup> κύκλο. Θετικός μάρτυρας είναι η Miconazole δηλαδή το αντιβιοτικό του σακχαρομύκητα. Όπως αναμενόταν, ο αρνητικός μάρτυρας δεν αναπτύχθηκε στους μύκητες.

Συμπεραίνουμε, ότι το θυμάρι και στις δυο περιπτώσεις είναι το ισχυρότερο αιθέριο έλαιο. Τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια (ευκάλυπτος, δεντρολίβανο, περγαμόντο κ.λ.π) έδωσαν ζώνες αναστολής με μικρότερους διαμέτρους. Η αντιμυκητιακή δράση των αιθέριων ελαίων παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τη αντιβακτηριακή δράση.

Η σειρά δραστηριότητας των αιθέριων ελαίων στους μύκητες είναι η παρακάτω: Θυμάρι>Ρίγανη>Τειόδεντρο>Ευκάλυπτος>Δεντρολίβανο>Περγαμόντο>Πευκοβελό

να.

Στην εικόνα 19 εμφανίζεται ενδεικτικά ένα τριβλίο στο οποίο έχει αναπτυχθεί ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae* και οι δίσκοι αναστολής έχουν εμποτιστεί με 10 μL μικοναζόλη και 20 μL αιθέριο έλαιο περγαμόντου.



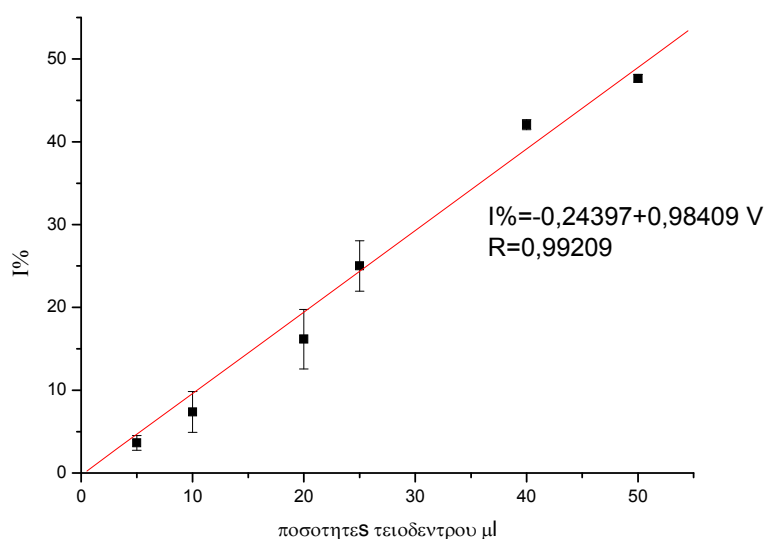
**Εικόνα 19:** Τριβλίο με μύκητες *S.cer*. A. δίσκο παρουσία 10μL μικοναζόλη (αντιβιοτικό) και B. δίσκος 20μL αιθέριο έλαιο περγαμόντο

### 5.3 Αντιοξειδωτική δράση των αιθέριων ελαίων

Οι γραφικές παραστάσεις του ποσοστού αναστολής I % της ελεύθερης ρίζας του DPPH σε συνάρτηση με τις ποσότητες των αιθέριων ελαίων απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα. Οι καμπύλες αυτές προέκυψαν από την εφαρμογή της εξίσωσης  $I\% = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100$ .

Τειόδεντρο (*Melaleuca alternifolia*)

Ποσότητες Τειόδεντρου (μl)	Μ.Ο Μετρήσεων % Ποσοστό αναστολής DPPH	Τυπική Απόκλιση
5	3,68	0,89
10	7,38	2,48
20	16,70	3,61
25	25,01	3,04
40	42,07	0,61
50	47,66	0,46



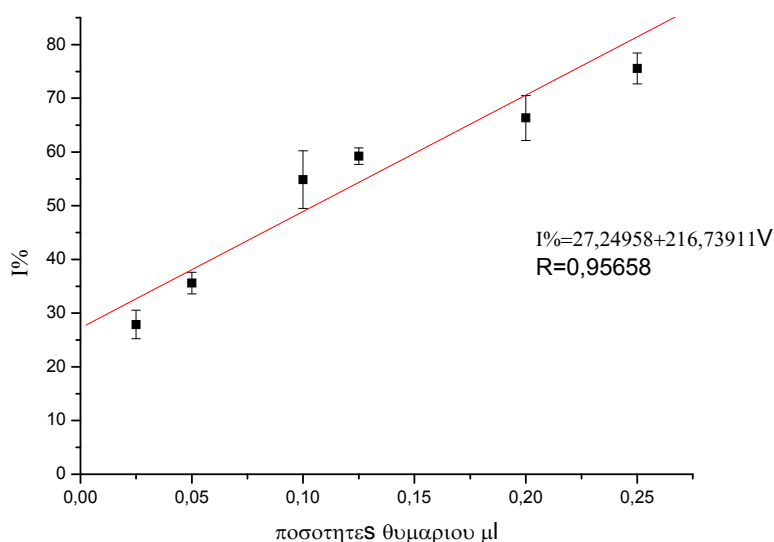
**Εικόνα 20:** Γραφική απεικόνιση ποσοστών αναστολής DPPH-τειόδεντρου

Όπως βλέπουμε και στο διάγραμμα, το τειόδεντρο παρουσιάζει υψηλά ποσοστά αναστολής του DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλιο) ενώ η γραμμική ευθεία ταυτίζεται με την καμπύλη των ποσοστών αναστολής.

Τα ποσοστά που προκύπτουν στο συγκεκριμένο αιθέριο έλαιο είναι από περίπου 4% έως και περίπου 48%. Επομένως, το τειόδεντρο ταξινομείται στα ισχυρά αιθέρια έλαια σύμφωνα με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

#### Θυμάρι (*Thymus vulgaris*)

Ποσότητες Θυμαριού(μl)	Μ.Ο Μετρήσεων % Ποσοστό αναστολής DPPH	Τυπική Απόκλιση
0,025	27,88	2,653
0,05	35,61	2,01
0,10	54,86	5,38
0,125	59,22	1,54
0,20	66,33	4,18
0,25	75,55	2,85



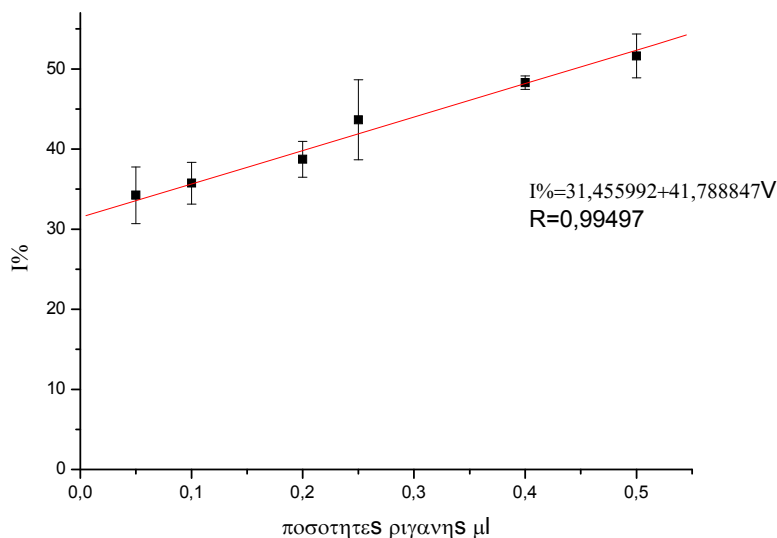
**Εικόνα 21:** Γραφική απεικόνιση ποσοστών αναστολής DPPH-θυμαριού

Αρχικά, πρέπει να αναφερθεί ότι στο θυμάρι επειδή ήταν πολύ δραστικό πραγματοποιήθηκε αραιώση όπως στις αντιμικροβιακές ιδιότητες. Επομένως, στο θυμάρι πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:20 με μεθανόλη (ΜΕΟΗ).

Τα ποσοστά αναστολής του DPPH κυμαίνονται μεταξύ του 28 % έως 75,55%. Το θυμάρι είναι τόσο πολύ δραστικό όπου ο αποχρωματισμός από την αναγωγή του DPPH γίνεται αμέσως. Το  $I_{50}$  είναι ίσο με 0,104μl. Άρα, το θυμάρι παρουσιάζει τις ισχυρότερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

#### Ρίγανη (*Origanum vulgare*)

Ποσότητες Ρίγανης(μl)	Μ.Ο Μετρήσεων % Ποσοστό αναστολής DPPH	Τυπική Απόκλιση
0,05	34,23	3,53
0,1	35,74	2,61
0,2	38,72	2,24
0,25	43,65	5,00
0,4	48,30	0,84
0,5	51,63	2,73

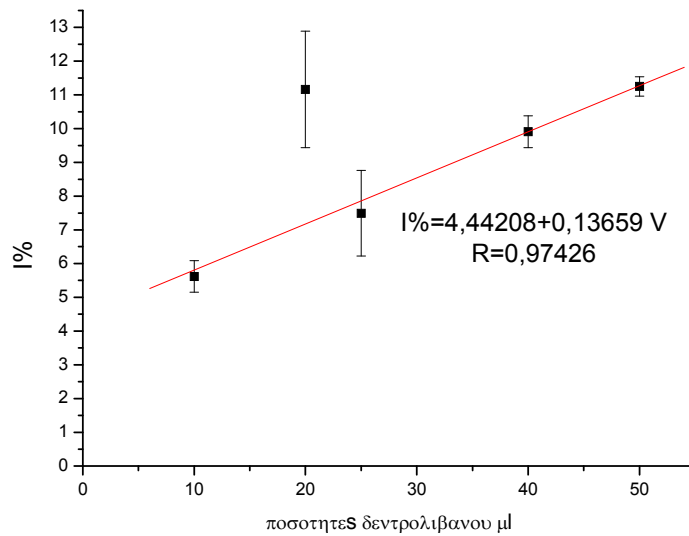


**Εικόνα 22:** Γραφική απεικόνιση ποσοστού αναστολής DPPH -ρίγανης

Όπως φαίνεται από την γραφική παράσταση της ριγανής, η καμπύλη που προκύπτει είναι κοντά στην γραμμική ευθεία, ενώ τα ποσοστά αναστολής του DPPH κυμαίνονται από περίπου 17,5% μέχρι 36,55%. Το  $I_{50}$  που προκύπτει είναι ίσο με 0,443μl. Ακόμα πρέπει να αναφερθεί ότι στη ριγανή πραγματοποιήθηκε αραίωση 1:10 με μεθανόλη (ΜΕΟΗ). Επομένως, η ριγανή κατατάσσεται στα ισχυρά αιθέρια έλαια.

*Δεντρολίβανο (Rosmarinus officinalis)*

Ποσότητες Δεντρολίβανου (μl)	Μ.Ο Μετρήσεων % Ποσοστό αναστολής DPPH	Τυπική Απόκλιση
5	1,98	0,892
10	5,62	0,465
20	11,16	1,723
25	7,49	1,269
40	9,91	0,470
50	11,25	0,286

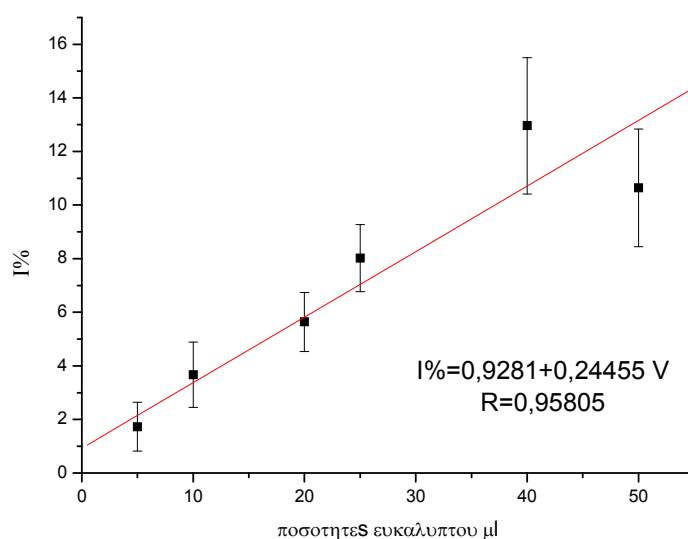


**Εικόνα 23:** Γραφική απεικόνιση ποσοστό αναστολής DPPH-δεντρολίβανου

Στο διάγραμμα αυτό βλέπουμε ότι το μέγιστο ποσοστό αναστολής του DPPH παρατηρείται στα 20μl όπου είναι 11,16% ενώ για τα 50μl είναι 11,25%. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι το δεντρολίβανο έχει μειωμένες αντιοξειδωτικές δράσεις.

Ευκάλυπτος (*Eucalyptus globulus*)

Ποσότητες Ευκαλύπτου (μl)	Μ.Ο Μετρήσεων % Ποσοστό αναστολής DPPH	Τυπική Απόκλιση
5	1,73	0,912
10	3,67	1,216
20	5,67	1,102
25	8,02	1,248
40	12,96	2,544
50	10,64	2,196

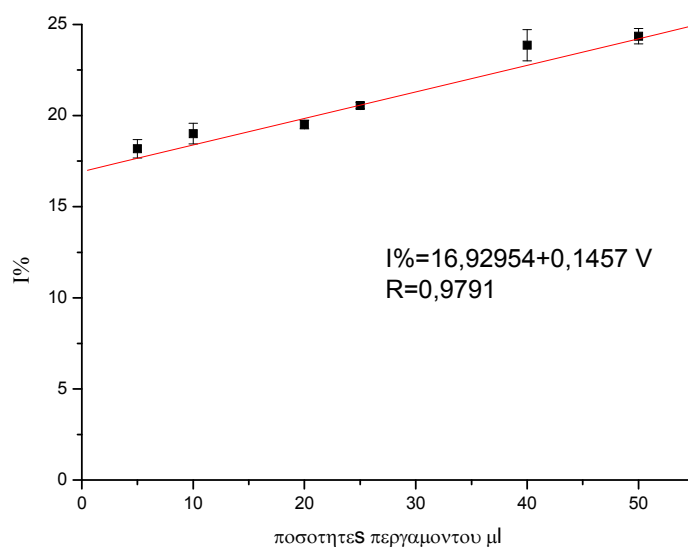


**Εικόνα 24:** Γραφική απεικόνιση ποσοστού αναστολής DPPH-ευκαλύπτου

Ο ευκάλυπτος εμφανίζει σχετικά χαμηλά ποσοστά αντιοξειδωτικής δράσης. Τα ποσοστά αναστολής του DPPH κυμαίνονται από 1,73% για τα 5μl έως και 13% για τα 40μl. Ενώ παρατηρούμε στο διάγραμμα ότι στα 50μl έχουμε μικρότερο ποσοστό αναστολής του DPPH από ότι στα 40μl.

Περγαμόντο (*Citrus bergamia*)

Ποσότητες Περγαμόντου (μl)	Μ.Ο Μετρήσεων % Ποσοστό αναστολής DPPH	Τυπική Απόκλιση
5	18,18	0,501
10	19,01	0,566
20	19,51	0,244
25	20,55	0,174
40	23,86	0,860
50	24,36	0,422



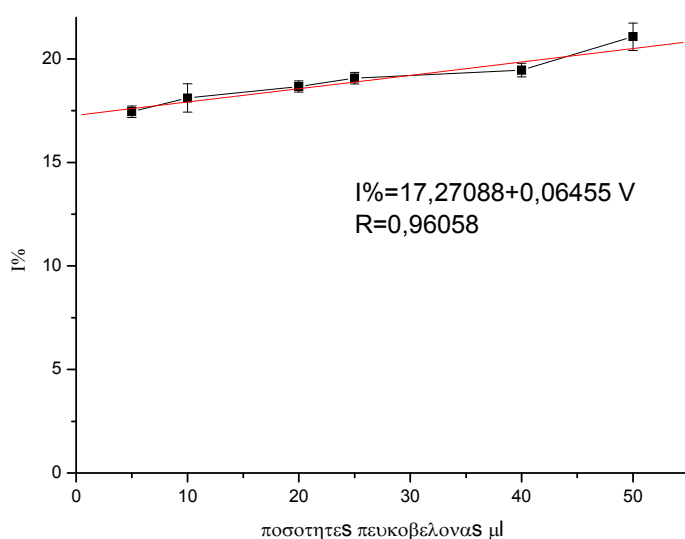
**Εικόνα 25:** Γραφική απεικόνιση ποσοστού αναστολής DPPH-περγαμόντου

Το περγαμόντο ανήκει στα σχετικά ασθενή αιθέρια έλαια όσο αφορά τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, η καμπύλη είναι κοντά στην γραμμική ευθεία. Τα ποσοστά αναστολής του DPPH για τα 50μl είναι 24,36% ενώ για τα 5μl είναι 18,18.

Πευκοβελόνα (*Pinus sylvestris*)

Ποσότητες Πευκοβελόνας (μl)	Μ.Ο Μετρήσεων % Ποσοστό αναστολής DPPH	Τυπική Απόκλιση
5	17,45	0,280
10	18,11	0,686
20	18,67	0,271
25	19,07	0,280
40	19,46	0,325
50	21,07	0,661





**Εικόνα 26:** Γραφική απεικόνιση ποσοστού αναστολής DPPH- πευκοβελόνας

Σύμφωνα με το διάγραμμα βλέπουμε ότι στα 50μl το ποσοστό αναστολής είναι ίσο με περίπου 21% ενώ για τα 5μl είναι 17,45%. Βλέπουμε και στο διάγραμμα ότι φαίνεται μια ικανοποιητική ταύτιση της καμπύλης με την γραμμική ευθεία. Το αιθέριο έλαιο της πευκοβελόνας είναι λιγότερο δραστικό.

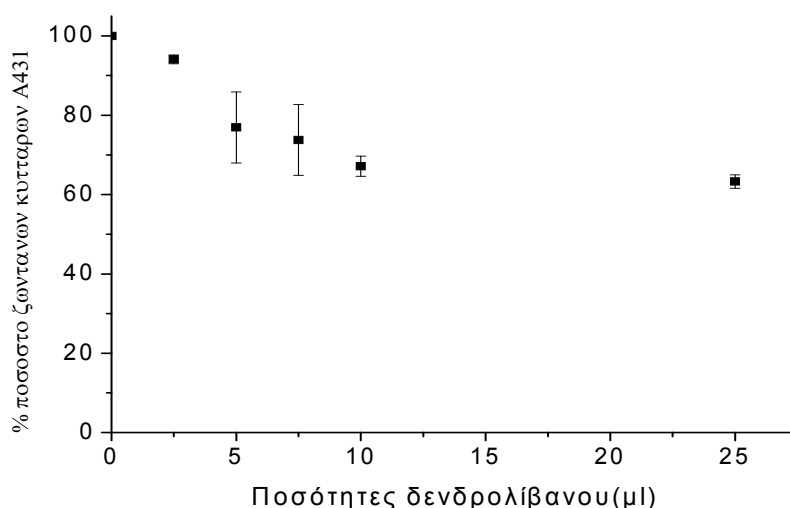
Από άποψη αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων αρκετά από τα αιθέρια έλαια εμφάνισαν αξιοσημείωτη δράση. Συγκεκριμένα τα αιθέρια έλαια του θυμαριού, της ρίγανης και του τεϊόδεντρου εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση. Τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια κατατάσσονται σε χαμηλότερες θέσεις.

#### 5.4 Αντικαρκινικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων

Τα επτά αιθέρια έλαια εξετάστηκαν για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Παρακάτω παρουσιάζονται οι τιμές και τα γραφήματα της μεταβολής των ζωντανών κυττάρων σε σχέση με τη συγκέντρωση κάθε αιθέριου ελαίου. Οι παρακάτω τιμές της 2 στήλης είναι ο μέσος όρος δύο πειραμάτων. Στη 3 στήλη παρατηρείται η τυπική απόκλιση των πειραμάτων. Πρέπει να αναφερθεί, ότι για την καλύτερη διαλυτοποίηση των αιθέριων ελαίων, πραγματοποιήθηκε αραιώση αυτών 1:1 με χολικό νάτριο.

Το διάλυμα του Χολικού Νατρίου που χρησιμοποιήθηκε έχει συγκέντρωση 1,5% w/v. Έτσι το 'Control' μας αποτελεί το θρεπτικό υλικό όπου έχει διαλυτοποιηθεί με το χολικό νάτριο.

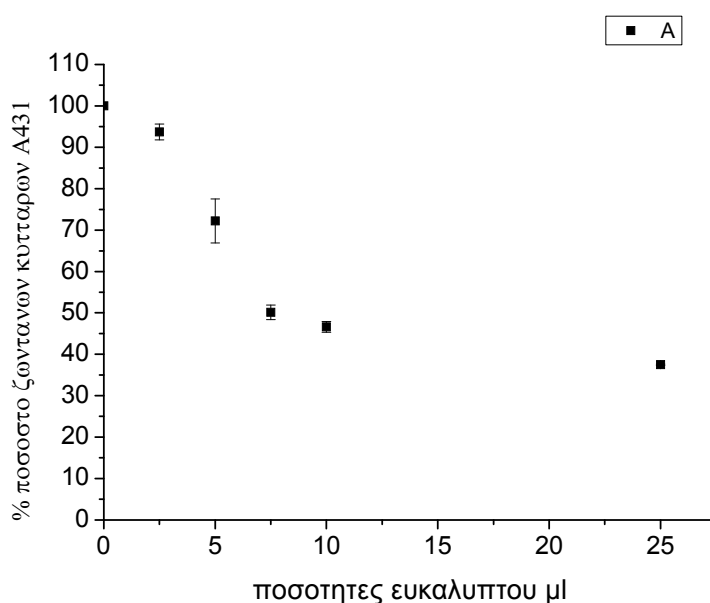
Δεντρολίβανο στα 800μL	M.O % Ποσοστό Ζωντανών Κυττάρων A431	Τυπική Απόκλιση
0	100	0
2,5	94,10	1,11
5	76,92	8,97
7,5	73,78	8,93
10	67,13	2,54
25	63,30	1,67



**Εικόνα 27:** Αναστολή των κυττάρων A431, παρουσία διαφόρων ποσοτήτων δεντρολίβανου

Στο παραπάνω γράφημα παρατηρείται η επίδραση του αιθέριου ελαίου του δεντρολίβανου σε σχέση με την ανθρώπινη κυτταρική σειρά A431. Τα A431 επωάστηκαν με το συγκεκριμένο αιθέριο έλαιο για 24h σε διάφορες ποσότητες. Το αιθέριο έλαιο αυτό, είχε τοξική επίδραση στη σειρά A431. Στα 25μL αιθέριου ελαίου το ποσοστό ζωντανών κυττάρων περιορίζεται στο 63,30%. Άρα, το αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου βρίσκεται σε μέτρια κατάσταση από άποψη αντικαρκινικής δράσης.

Ευκάλυπτος στα 800μL	Μ.Ο % Ποσοστό Ζωντανών Κυττάρων Α431	Τυπική Απόκλιση
0	100	0
2,5	93,69	1,92
5	72,19	5,32
7,5	50,13	1,75
10	46,64	1,29
25	37,47	0,15



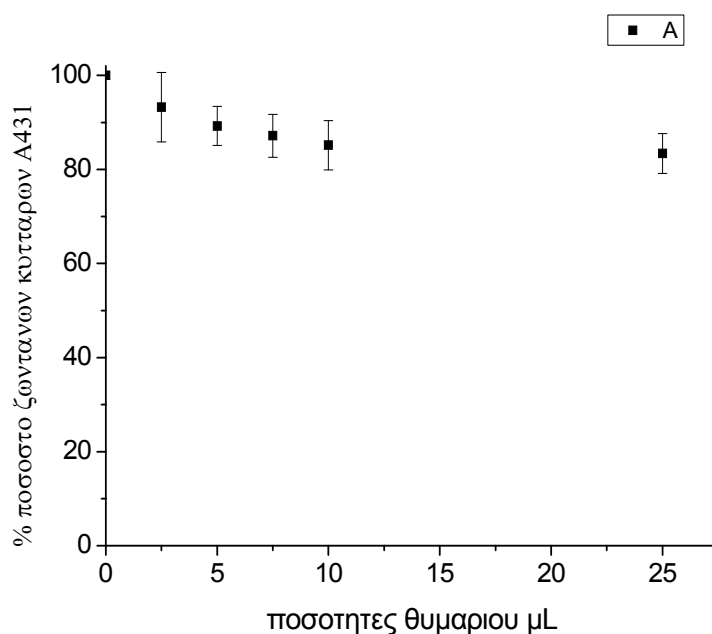
**Εικόνα 28:** Αναστολή των κυττάρων Α431, παρουσία διαφόρων ποσοτήτων ευκαλύπτου

Στο σχήμα 28 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από επίδραση του ευκαλύπτου σε διαφορετικές ποσότητες (2,5, 5, 7,5, 10, 25μL) στα Α431 κύτταρα για 24h και εκφράζουν % ικανότητα ζωντανών κυττάρων σε σχέση με το Control. Τελικώς, παρατηρείται ότι στα 25μL αιθέριο έλαιο το ποσοστό ζωντανών κυττάρων είναι ίσο 37,47. Από το παραπάνω διάγραμμα βλέπουμε ότι ο προσδιορισμός του I<sub>50</sub> του ευκαλύπτου μας δίνει τη τιμή ίση με 9,89μl .

$$I_{50} = 9,89\mu\text{l}$$

Συνεπώς, μπορούμε να πούμε ότι ο ευκάλυπτος είναι από τα αιθέρια με τη μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση.

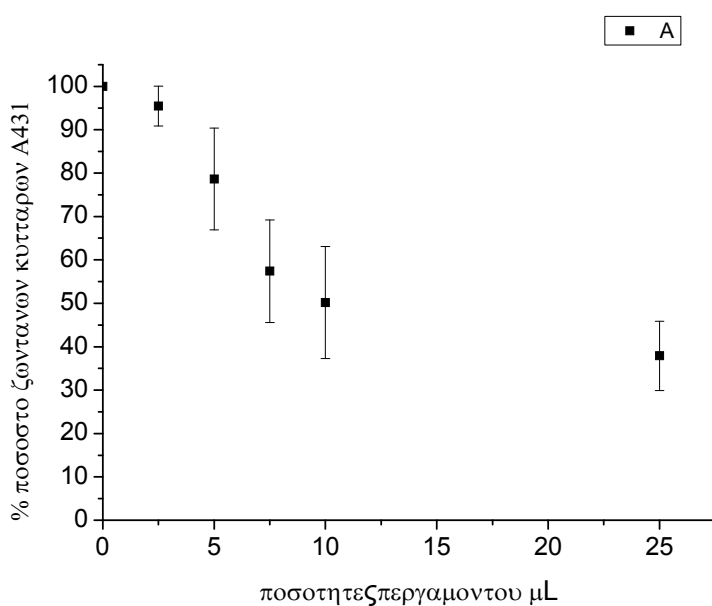
Θυμαρί στα 800μL	Μ.Ο % Ποσοστό Ζωντανών Κυττάρων Α431	Τυπική Απόκλιση
0	100	0
2,5	93,25	7,38
5	89,24	4,14
7,5	87,15	4,56
10	85,14	5,25
25	83,38	4,25



**Εικόνα 29:** Αναστολή των κυττάρων Α431, παρουσία διαφόρων ποσοτήτων θυμαριού

Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού έχει μικρή επίδραση στη ζωτικότητα των κυττάρων. Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα βλέπουμε ότι στα 25μl θυμαριού το ποσοστό ζωντανών κυττάρων είναι ίσο με 83,38%. Επομένως, μπορούμε να πούμε ότι το θυμάρι είναι από τα αιθέρια έλαια με τη χαμηλότερη αντικαρκινική δράση.

Περγαμόντο στα 800μL	Μ.Ο % Ποσοστό Ζωντανών Κυττάρων Α431	Τυπική Απόκλιση
0	100	0
2,5	95,45	4,59
5	78,64	11,73
7,5	57,41	11,83
10	50,16	12,92
25	37,89	7,98



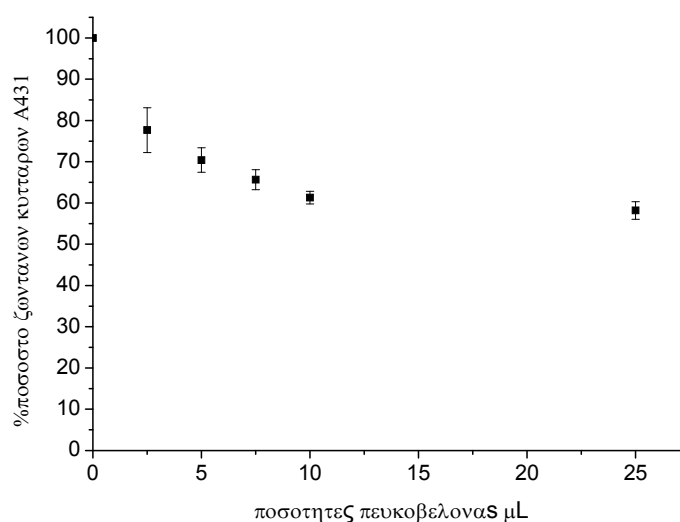
**Εικόνα 30:** Αναστολή των κυττάρων Α431, παρουσία διαφόρων ποσοτήτων περγαμόντου

Το περγαμόντο είναι δραστικό όσο αφορά τις αντικαρκινικές του ιδιότητες. Με βάση την εικόνα παρατηρείται ότι στα 25μL αιθέριου ελαίου το % ποσοστό ζωντανών κυττάρων είναι ίσο με 37,89%. Από το παραπάνω διάγραμμα είναι εμφανές ότι το  $I_{50}$  του περγαμόντου είναι με 10,67μl .

**$I_{50} = 10,67\mu\text{l}$ .**

Το αιθέριο έλαιο του περγαμόντου χαρακτηρίζεται από ισχυρή αντικαρκινική δράση.

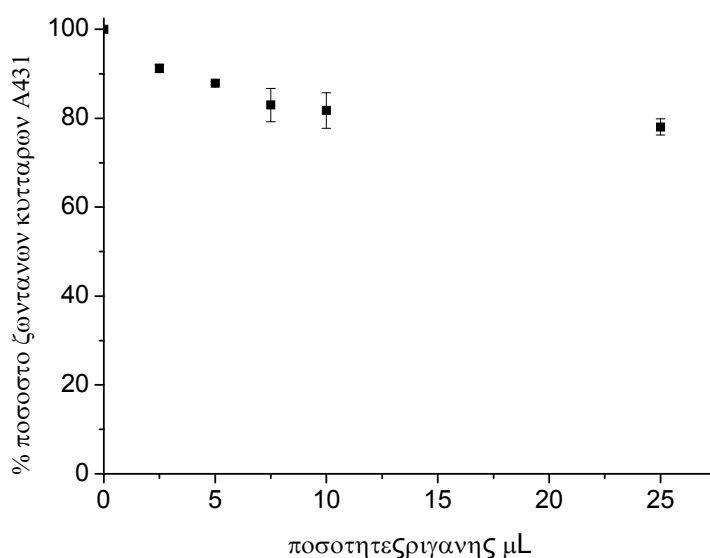
Πευκοβελόνας στα 800μL	Μ.Ο % Ποσοστό Ζωντανών Κυττάρων A431	Τυπική Απόκλιση
0	100	0
2,5	77,65	5,43
5	70,4	2,98
7,5	65,63	2,41
10	61,3	1,53
25	58,19	2,13



**Εικόνα 31:** Αναστολή των κυττάρων A431, παρουσία διαφόρων ποσοτήτων πευκοβελόνας

Όπως βλέπουμε στο παραπάνω διάγραμμα, η πευκοβελόνα είναι σχετικά δραστικό αιθέριο έλαιο όσο αφορά τις αντικαρκινικές ιδιότητες. Με βάση το σχήμα 31 παρατηρείται ότι στα 25μL αιθέριου ελαίου, το ποσοστό ζωντανών κυττάρων είναι ίσο με 58,19%.

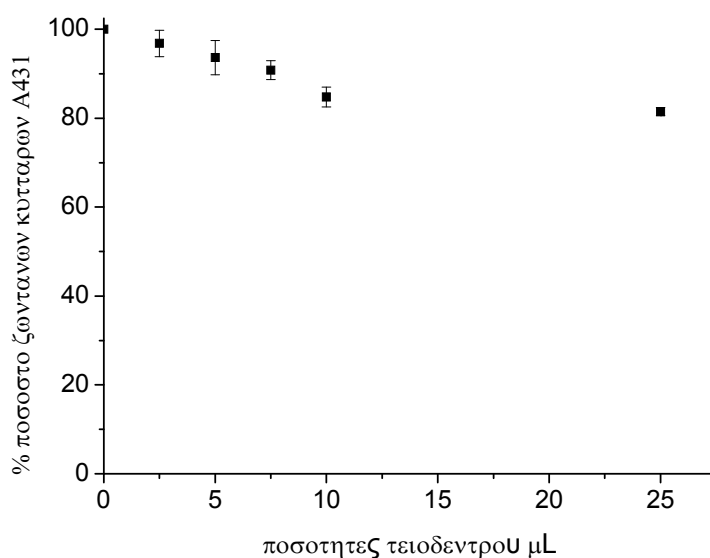
Ρίγανη στα 800μL	M.O % Ποσοστό Ζωντανών Κυττάρων A431	Τυπική Απόκλιση
0	100	0
2,5	91,20	0,91
5	87,91	0,35
7,5	82,99	3,73
10	81,76	4,02
25	78,06	1,80



**Εικόνα 32:** Αναστολή των κυττάρων A431, παρουσία διαφόρων ποσοτήτων ρίγανης όπου είχε διαλυτοποιηθεί με Χολικό Νάτριο

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι στα 25μL το ποσοστό ζωντανών κυττάρων είναι 78,06%. Άρα, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης έχει μειωμένη αντικαρκινική δράση. Συνεπώς συμπεραίνουμε ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης βρίσκεται σε χαμηλή κατάσταση από άποψη αντικαρκινικής δραστηριότητας.

Τειόδεντρο Στα 800μL	Μ.Ο % Ποσοστό Ζωντανών Κυττάρων Α431	Τυπική Απόκλιση
0	100	0
2,5	96,84	2,98
5	93,64	3,85
7,5	90,81	2,13
10	84,75	2,24
25	81,48	0,91



**Εικόνα 33:** Αναστολή των κυττάρων Α431, παρουσία διαφόρων ποσοτήτων τειόδεντρου

Με βάση την εικόνα 33 παρατηρείται ότι στα 25μL το ποσοστό ζωντανών κυττάρων είναι ίσο με 81,48%. Στο παραπάνω διάγραμμα βλέπουμε ότι το τειόδεντρο είναι σχετικά ασθενή αιθέριο έλαιο όσον αφορά την αντικαρκινική δράση.

Από άποψη αντικαρκινικών ιδιοτήτων ορισμένα από τα αιθέρια έλαια εμφάνισαν αξιοσημείωτη δράση. Συγκεκριμένα, τα αιθέρια έλαια του ευκαλύπτου, του περγαμόντου και της πευκοβελόνας εμφανίζουν σημαντική αντικαρκινική δράση. Τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια κατατάσσονται σε χαμηλότερα επίπεδα.

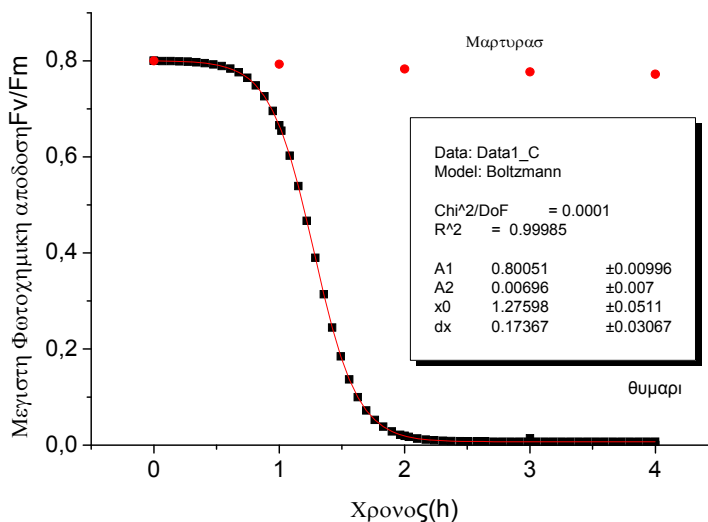


## 5.5 Μετρήσεις φθορισμού των αιθέριων ελαίων

Παρακάτω παρουσιάζονται τα γραφήματα Fv/Fm σε σχέση με το χρόνο για τις καλλιέργειες *Chlamydomonas reinhardtii* στις οποίες έχει γίνει προσθήκη ποσότητας αιθέριου ελαίου.

Θυμάρι (*Thymus vulgaris*)

Χρόνος	Fv/Fm (Μάρτυρας)	Fv/Fm (Θυμάρι)
0	0,800	0,800
1	0,793	0,666
2	0,783	0,019
3	0,777	0,014
4	0,772	0

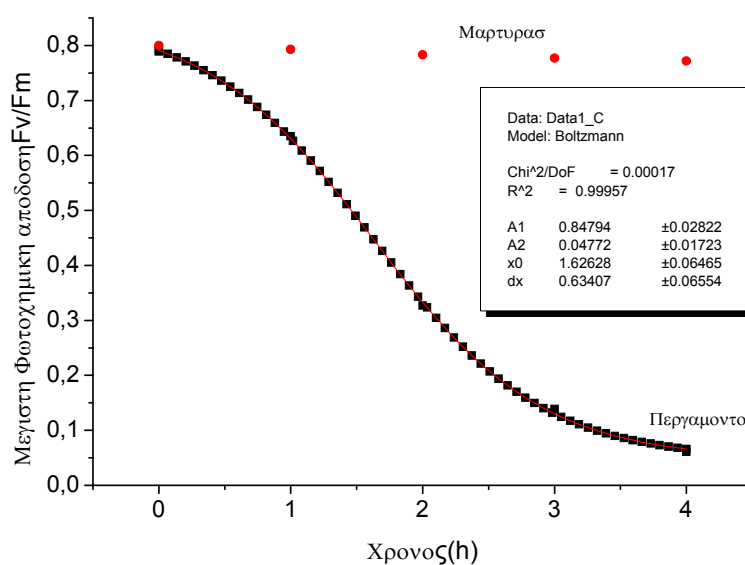


**Εικόνα 34:** Ημερήσια διακύμανση μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης Fv/Fm θυμαριού (*Thymus vulgaris*)

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι το θυμάρι (*Thymus vulgaris*) είναι ένα ισχυρό αιθέριο έλαιο. Κατά τη διάρκεια των 2 πρώτων ωρών το ποσοστό της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης σχεδόν μηδενίζεται. Ενώ μετά την πάροδο τεσσάρων ωρών τα κύτταρα *Chlamydomonas Reinhardtii* θανατώνονται πλήρως. Διαπιστώνεται ότι το θυμάρι ανήκει στα δραστικά αιθέρια έλαια

Περγαμόντο (*Citrus Bergamia*)

Χρόνος	Fv/Fm (Μάρτυρας)	Fv/Fm (Περγαμόντο)
0	0,800	0,789
1	0,793	0,635
2	0,783	0,327
3	0,777	0,139
4	0,772	0,061

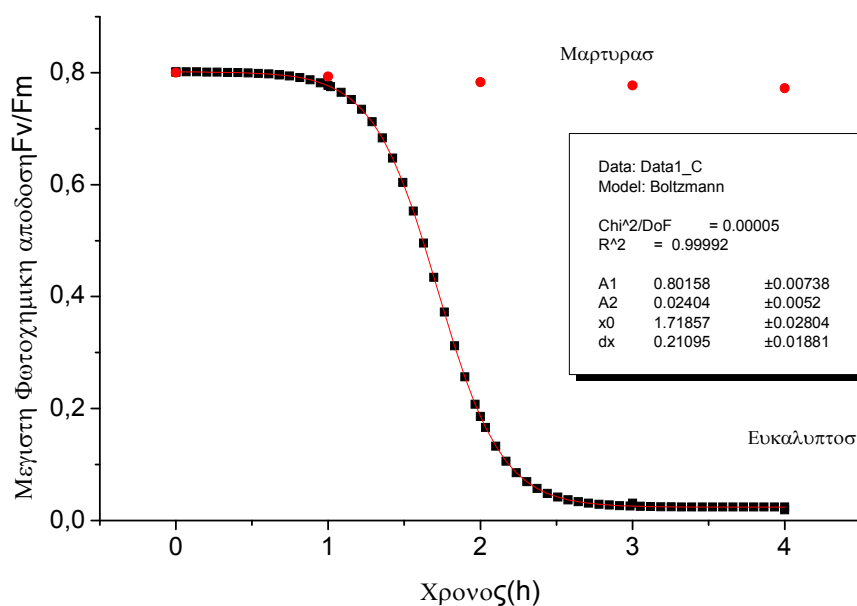


**Εικόνα 35:** Ημερήσια διακύμανση μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης Fv/Fm του περγαμόντου (*Citrus Bergamia*)

Το αιθέριο έλαιο του περγαμόντο προκαλεί γραμμική μείωση της μέγιστης αποδοτικότητας του PSII. Στην εικόνα 35 παρατηρείται ότι η μέγιστη φωτοχημική απόδοση μετά από 1 ώρα είναι 0,635..Μετά από 4 ώρες ο λόγος Fv/Fm μειώνεται στην τιμή 0,061. Συμπερασματικά, το περγαμόντο εμφανίζει αποτελεσματικά επίπεδα αναστολής.

Ευκάλυπτος (*Eucalyptus globulus*)

Χρόνος	Fv/Fm (Μάρτυρας)	Fv/Fm (Ευκάλυπτος)
0	0,800	0,801
1	0,793	0,777
2	0,783	0,186
3	0,777	0,031
4	0,772	0,019

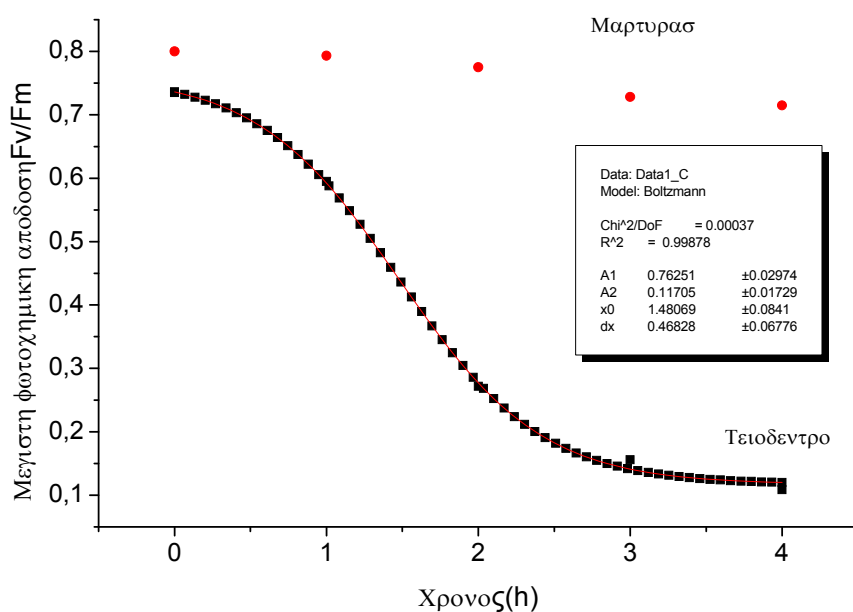


**Εικόνα 36:** Ημερήσια διακύμανση μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης Fv/Fm του Ευκάλυπτου (*Eucalyptus globules*)

Η δραστηκότητα του αιθέριου ελαίου του ευκαλύπτου έναντι των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* παρουσιάζεται στο παραπάνω γράφημα. Διαπιστώνεται ότι με τη πάροδο του χρόνου η μέγιστη φωτοχημική απόδοση μειώνεται δραστικά. Παρατηρείται από την εικόνα 36 ότι ο λόγος Fv/Fm του ευκαλύπτου είναι 0,186 μετά από 2 ώρες. Συγκεκριμένα μετά από 4 ώρες η φωτοχημική απόδοση προσεγγίζει το μηδέν. Πράγμα που κατατάσσει τον ευκάλυπτο στα δραστικά αιθέρια έλαια.

Τειόδενδρο (*Melaleuca alternifolia*)

Χρόνος	Fv/Fm (Μάρτυρας)	Fv/Fm (Τειόδεντρο)
0	0,800	0,735
1	0,793	0,595
2	0,775	0,272
3	0,728	0,156
4	0,715	0,109

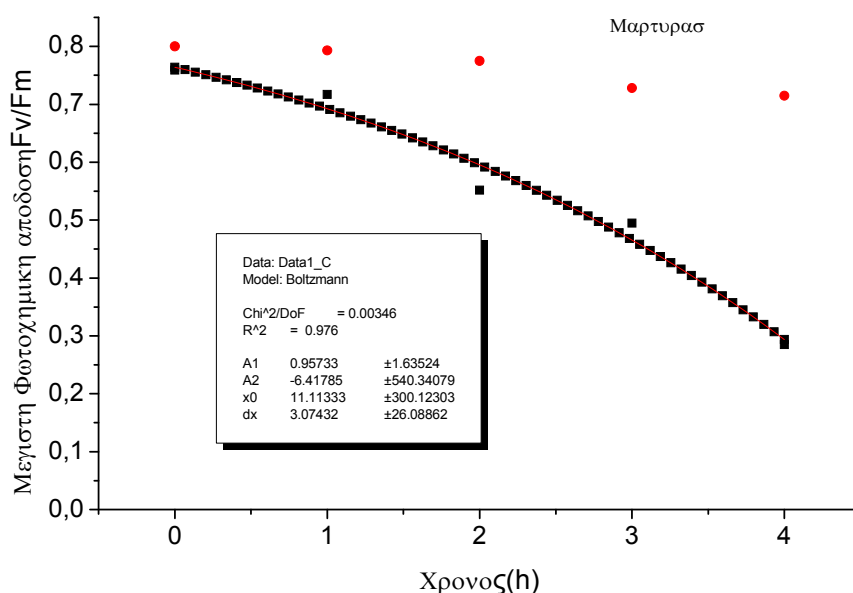


**Εικόνα 37:** Ημερήσια διακύμανση μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης του Τειόδεντρου (*Melaleuca alternifolia*)

Στο διάγραμμα 37 παρατηρείται ότι ο λόγος Fv/Fm σχηματίζει σιγμοειδή καμπύλη με τη πάροδο του χρόνου. Μετά από 1h διαπιστώνεται ότι η μέγιστη φωτοχημική απόδοση του PSII προσεγγίζει το 0,6. Ενώ στη μέτρηση μετά από 4 ώρες παρατηρείται ότι η μέγιστη φωτοχημική απόδοση είναι 0,109. Άρα το τειόδεντρο κατατάσσεται στα χαμηλής ισχύος δράσης αιθέρια έλαια σε σχέση με το Θυμάρι, τον Ευκάλυπτο και το Περγαμόντο.

Δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*)

Χρόνος	Fv/Fm (Μάρτυρας)	Fv/Fm (Δεντρολίβανο)
0	0,800	0,759
1	0,793	0,717
2	0,775	0,552
3	0,728	0,495
4	0,715	0,285

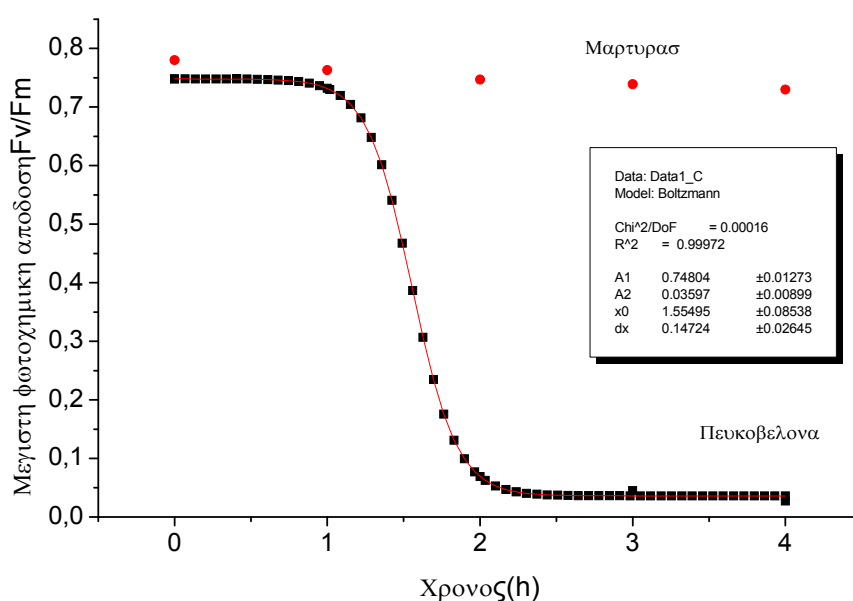


**Εικόνα 38:** Ημερήσια διακύμανση μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης του δεντρολίβανου (*Rosmarinus officinalis*)

Στο διάγραμμα αυτό βλέπουμε ότι ο λόγος Fv/Fm του δεντρολίβανου μειώνεται σχεδόν γραμμικά με χαμηλή κλίση, η οποία είναι από τις χαμηλότερες στα αιθέρια έλαια που έχουμε μελετήσει. Μετά από 2h παρατηρείται ότι ο λόγος Fv/Fm του δεντρολίβανου έχει μειωθεί κατά περίπου 30%. Ενώ με την πάροδο των τεσσάρων ωρών το ποσοστό μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης προσεγγίζει το 60%. Με βάση τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι το δεντρολίβανο έχει τη πιο χαμηλή δράση από τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια.

Πευκοβελόνα (*Pinus sylvestris*)

Χρόνος	Fv/Fm (Μάρτυρας)	Fv/Fm (Πευκοβελόνα)
0	0,780	0,748
1	0,763	0,732
2	0,747	0,069
3	0,739	0,045
4	0,730	0,027

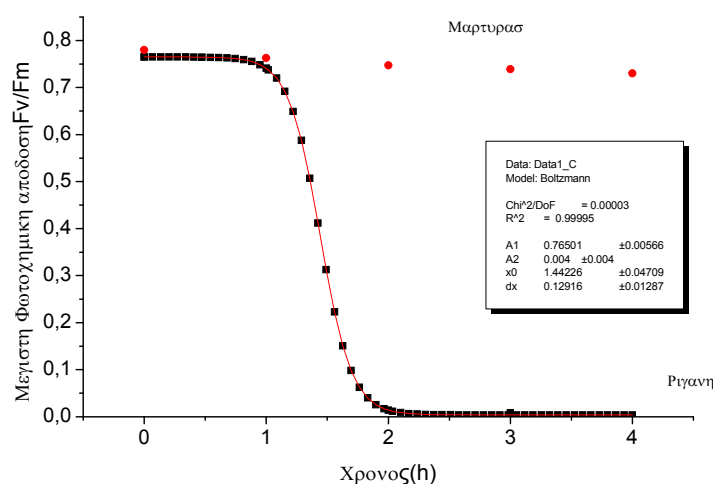


**Εικόνα 39:** Ημερήσια διακύμανση μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης της πευκοβελόνας (*Pinus sylvestris*)

Το αιθέριο έλαιο της πευκοβελόνας εμφανίζει σημαντική δράση ως προς τη μέγιστη φωτοχημική απόδοση. Η καμπύλη που προκύπτει είναι σιγμοειδής, με τη μέγιστη φωτοχημική απόδοση να περιορίζεται δραστικά μετά από 2h. Συγκεκριμένα, μετά από 2h, η αποδοτικότητα του PSII είναι 0,069. Έτσι, η πευκοβελόνα ταξινομείται στα ισχυρά αίθερα έλαια

Ρίγανη (*Origanum vulgare*)

Χρόνος	Fv/Fm (Μάρτυρας)	Fv/Fm (Ρίγανη)
0	0,780	0,765
1	0,763	0,741
2	0,747	0,014
3	0,739	0,008
4	0,730	0



**Εικόνα 40:** Ημερήσια διακύμανση μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης της ρίγανης (*Origanum vulgare*)

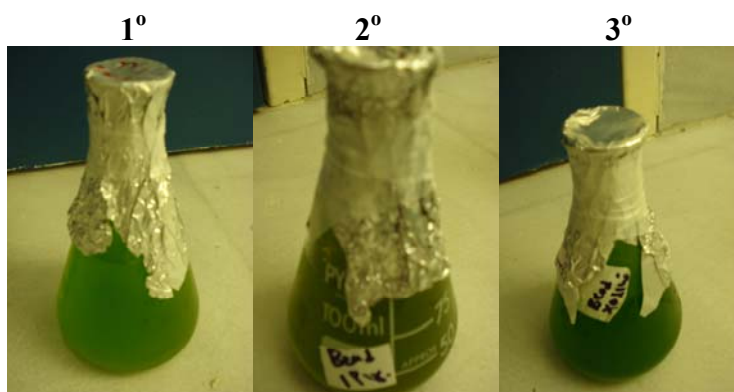
Στη παραπάνω γραφική παράσταση παρατηρείται ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης επιδρά ισχυρά στα κύτταρα *Chlamydomonas*. Η καμπύλη που προκύπτει είναι σιγμοειδής, με τη μέγιστη φωτοχημική απόδοση να μηδενίζεται μετά από 2h. Συγκεκριμένα, ο λόγος Fv/Fm μειώνεται από 0,765 σε 0,014 κατά την πάροδο των 2 ωρών. Τελικά μετά από 4h, η μέγιστη αποδοτικότητα του PSII στη ρίγανη είναι μηδέν. Επομένως, η ρίγανη κατατάσσεται στα ισχυρά αιθέρια έλαια.

Συγκεκριμένα τα αιθέρια έλαια του θυμαριού, της ρίγανης είναι ισχυρά και επιδρούν στα κύτταρα *Chlamydomonas Reinhardtii*. Η πιο σημαντική επίδραση στο παράγοντα Fv/Fm προκαλείται από τα αιθέρια έλαια του θυμαριού και της ρίγανης. Τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια κατατάσσονται σε χαμηλότερα επίπεδα. Η χαμηλότερη τιμή της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης του φωτοσυστήματος II καταγράφεται στο αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου και μετά ακολουθεί το τεϊόδεντρο.

## 5.6 Επίδραση ακινητοποιημένων αιθέριων ελαίων στο άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*.

Παρακάτω παρατηρούνται οι πίνακες και οι φωτογραφίες με τις υγρές καλλιέργειες του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii*, στις οποίες έχει γίνει προσθήκη 1 σφαιρίδιου αλγινικού ασβεστίου με ακινητοποιημένα αιθέρια έλαια.

1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>
100ml Θρεπτικό TAP	100ml Θρεπτικό TAP	100ml Θρεπτικό TAP
1000μl κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1000μl κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1000μl κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
1 σφαιρίδιο θυμαριού	1 σφαιρίδιο ρίγανης	1 σφαιρίδιο χολικό νάτριο

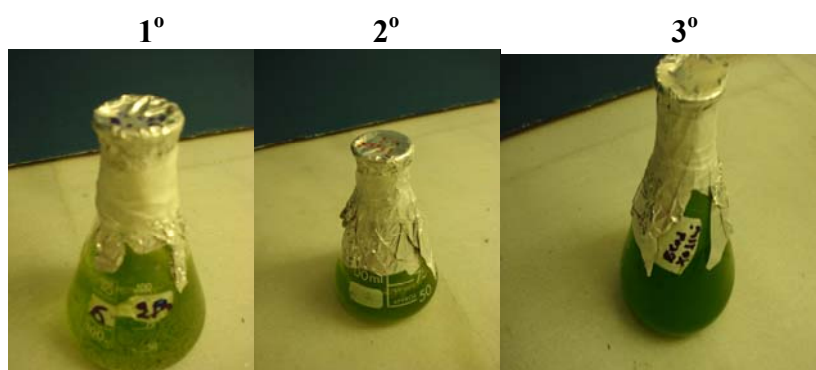


**Εικόνα 41:** Καλλιέργειες του άλγους *Chlamydomonas Reinhardtii* με 1 σφαιρίδιο *Thymus vulgaris*, 1σφαιρίδιο *Origanium vulgare*, 1 σφαιρίδιο χολικό νάτριο

Οι καλλιέργειες 1<sup>ο</sup> & 3<sup>ο</sup> του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii* αναπτύσσονται φυσιολογικά, σε αντίθεση με τη 2<sup>η</sup> καλλιέργεια που εμφανίζει σημάδια αλλοίωσης. Αυτό οφείλεται στο αιθέριο έλαιο της ρίγανης, το οποίο έχει ακινητοποιηθεί στο σφαιρίδιο του αλγινικού ασβεστίου. Η προσθήκη 2 σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου, με τα ακινητοποιημένα αιθέρια έλαια, σε καλλιέργειες του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii* έχει σαν αποτέλεσμα την θανάτωση του.



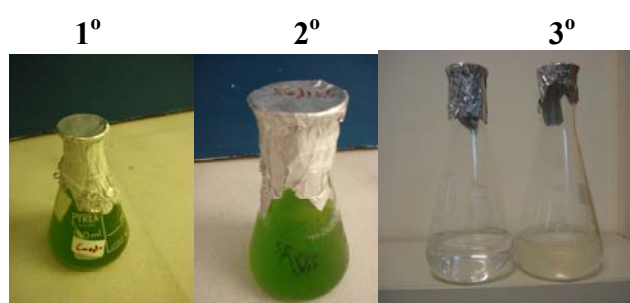
1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>	3 <sup>ο</sup>
100ml Θρεπτικό TAP	100ml Θρεπτικό TAP	100ml Θρεπτικό TAP
1000μl κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1000μl κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1000μl κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
2 σφαιρίδια θυμαριού	2 σφαιρίδια ρίγανης	2 σφαιρίδια χολικού νατρίου



**Εικόνα 42:** Καλλιέργειες του άλγους *Chlamydomonas Reinhardtii* με 2 σφαιρίδια *Thymus vulgaris*, 2σφαιρίδια *Origanium vulgare*, 2 σφαιρίδια χολικό νάτριο

Συγκεκριμένα όπως παρατηρείται από την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> καλλιέργεια, η προσθήκη 2 σφαιριδίων με θυμάρι & ρίγανη προκαλεί την αλλοίωση της οπτικής εικόνας της καλλιέργειας. Λόγω της ισχυρής δραστηριότητας του θυμαριού και της ρίγανης η καλλιέργεια παύει να αναπτύσσεται. Στην 3<sup>η</sup> καλλιέργεια παρατηρείται ότι η προσθήκη 2 σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου μόνο με χολικό νάτριο δεν επηρεάζει το άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*.

1°	2°	3°
100ml Θρεπτικό TAP	100ml Θρεπτικό TAP	100ml Θρεπτικό TAP
1000μl κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1000μl κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1000μl κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
(control)	5μl χολικό νάτριο	5μl Θυμαρί/5μl Ρίγανη



**Εικόνα 43:** Καλλιέργειες του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii* με χολικό νάτριο, θυμάρι & ρίγανη αντίστοιχα

Σε καλλιέργειες του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii* γίνεται προσθήκη ελεύθερου αιθέριου ελαίου ίδιας ποσότητας με αυτή που έχει ακινητοποιηθεί σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου, έτσι ώστε να συγκριθεί η δραστηριότητα του ακινητοποιημένου και του ελεύθερου αιθέριου ελαίου.

Στη εικόνα 43 παρατηρείται ότι το ελεύθερο αιθέριο έλαιο του θυμαριού και της ρίγανης δεν επιτρέπει στα κύτταρα να αναπτυχθούν. Στην 2<sup>η</sup> καλλιέργεια παρατηρείται ότι το χολικό νάτριο δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii*.

Συνοψίζοντας, τα αιθέρια έλαια του θυμαριού και της ρίγανης εμφανίζουν την ισχυρότερη δραστηριότητα ως προς το άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*. Η ρίγανη και το θυμάρι μελετήθηκαν τόσο σε ελεύθερη όσο και σε ακινητοποιημένη μορφή σε αλγινικό ασβέστιο. Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης και του θυμαριού σε ελεύθερη και σε ακινητοποιημένη μορφή (2 σφαιρίδια) επηρεάζουν εξίσου το στέλεχος *Chlamydomonas reinhardtii*.

## 6. Συμπεράσματα

Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι τα αιθέρια έλαια έχουν αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές δράσεις. Όσον αφορά τις αντιβακτηριακές δράσεις το αιθέριο έλαιο του θυμαριού (*Thymus vulgaris*) ήταν το δραστικότερο και αμέσως μετά ακολουθεί η ρίγανη (*Origanum vulgare*).

Οι αντιμυκητιακές δραστικότητες παρουσίασαν μεγάλη ομοιότητα με τις αντιβακτηριακές. Έτσι, και στις δυο περιπτώσεις το πιο αποδοτικό έλαιο ήταν του θυμαριού (*Thymus vulgaris*).

Επιπλέον, μετά από τη μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας που επιδεικνύουν, βρέθηκε ότι το αιθέριο έλαιο με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν του θυμαριού και τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια κατατάσσονται σε χαμηλότερες θέσεις.

Όσον αφορά τις αντικαρκινικές δράσεις των αιθέριων ελαίων που μελετήθηκαν βρέθηκε ότι ο ευκάλυπτος (*Eucalyptus globulus*) και το περγαμόντο (*Citrus bergamia*) ταξινομούνται στα πιο ισχυρά αιθέρια έλαια σύμφωνα με τις αντικαρκινικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, για τα A431 με σειρά αύξουσας δραστικότητας τα αιθέρια έλαια κατατάχθηκαν ως εξής: ευκάλυπος>περγαμόντο>πευκοβελόνα>δεντρολίβανο>ρίγανη>τειόδενδρο>θυμάρι.

Επιπλέον, μελετήθηκε η φωτοσυνθετική λειτουργία των αιθέριων ελαίων όπου έδειξε ότι σε όλα τα αιθέρια έλαια μειώνεται μετά από 4 ώρες. Πιο συγκεκριμένα τα αιθέρια έλαια του θυμαριού, της ρίγανης έχουν ισχυρή δράση και επηρεάζουν το άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*.

Η πιο σημαντική επίδραση στο παράγοντα Fv/Fm προκαλείται από τα αιθέρια έλαια του θυμαριού και της ρίγανης. Τα υπόλοιπα αιθέρια έλαια κατατάσσονται σε χαμηλότερα επίπεδα. Η πιο χαμηλή τιμή της μέγιστης φωτοχημικής απόδοσης καταγράφεται στο αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου.

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης και του θυμαριού που μελετήθηκε τόσο σε ελεύθερη όσο και ακινητοποιημένη μορφή έδειξε ότι επηρεάζει το στέλεχος *Chlamydomonas reinhardtii* και δεν αναπτύσσονται οι καλλιέργειες. Ένω το χολικό νάτριο χρησιμοποιήθηκε και με τις 2 μορφές όπου δεν επηρεάζει τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*.

## 7. Βιβλιογραφία

1. F.Bakkali, S.Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar (2008) Food and Chemical Toxicology 46, 446-475
2. <http://www.aromatherapeia.eu/essential/definition.html>
3. Σκουμπρής Γ.Β . (1985) Αρωματικά Φυτά και Αιθέρια Έλαια
4. Η. Σακκάς, Χ. Παπαδοπούλου (2009) Αιθέρια έλαια φυτών :αντιβακτηριακή, αντιμυκητιασική και αντιπαρασιτική δράση, Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
5. . Edris Amr E (2007) Wiley InterScience, DOI: 10. 1002/ptr.2072
6. Mc Murry, J., (1999) Οργανική Χημεία, Τόμος ΙΙ, Ηράκλειο
7. Βαλεντίνη Ιγνατιάδου –Ραγκούση (1996)Αθήνα Χημεία Φυσικών Προϊόντων
8. J Grassmann and E F Elstner (2003) - Essential Oils/Properties and Uses-Technical University of Munich, encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition) pages 2177-2184
9. [en.wikipedia.org/wiki/Rosemary](http://en.wikipedia.org/wiki/Rosemary)
10. Etter S.C (2005) J Herbs Spice Med plants, 11 (1), 121-159
11. Gachkar L, Yadegan D, Rezaei MB, et al (2007) Food Chem 102 (3),898-904
12. [en.wikipedia.org/wiki/pine](http://en.wikipedia.org/wiki/pine)
13. [en.wikipedia.org/wiki/bergamot\\_orange](http://en.wikipedia.org/wiki/bergamot_orange)
14. [en.wikipedia.org/.../eucalyptus oil](http://en.wikipedia.org/.../eucalyptus_oil)
15. [en wikipedia.org/.../teatree](http://en.wikipedia.org/.../teatree)
16. Carson C.F & Riley T.V (1993) Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*, Letters in Applied Microbiology 16, 49-55
17. Sabahat Saeed and Perween Tariq, (2009) J. Pharm. Sci , 22(4) .421-424
18. Derwich Elhoussine, Benziane Zineb, Manar A,(2010), J Scient Res 5(2):120-129
19. [el.wikipedia.org/wiki/θυμάρι](http://el.wikipedia.org/wiki/θυμάρι)
20. Kulisic T, Dragovic-Ubelac A, Milios M, (2006) Food Techol Biotechnol,44 (4),485-492
21. Δαφερέρα Δ, Ταραντίλης Π.Α, Πολυσιού Μ, Θυμαρί (Thyme) :Φαρμακολογική – Βιολογική δράση, Εργαστήριο Χημείας Γενικό Τμήμα,Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
22. [en.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli-Wikipedia the free encyclopedia](http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli-Wikipedia_the_free_encyclopedia)

23. Gross C.A (1999) *Escherichia coli* and salmonella: Cellular and Molecular Biology American society for Microbiology Washington 1382-1399
24. [en.wikipedia.org/.../Saccharomyces\\_cerev...](http://en.wikipedia.org/.../Saccharomyces_cerev...)
25. Walker G.M ‘Yeast Physiology and biotechnology’ John Wiley and Sons, New York, 1998
26. Harris,E (2009).In *The Chlamydomonas*.Elsevier
27. Maxwell Kate, Johnson G.N (2000). *J. Exp bot*, 51, pp. 659-668
28. Critchley C. (1998) Photoinhibition. In *Phytosynthesis* A.S Raghavendra(Ed) Cambridge, Cambridge University press, p.p 264-272
29. Lalonde, J., & Margolin, A. (2002). Immobilization of Enzymes. In K. Drauz, & H. Waldmann (Eds.), *Enzyme Catalysis in Organic Chemistry* (2nd ed., pp. 163-184). Weinheim: Wiley-VCH.
30. Sutherland, I. (1991). Novel Materials from Biological Sources. In *Biomaterials* (pp. 309-331). New York: Stockton
31. Badwan, A., Abumaloooh, A., Sallam, E., Abukalaf, A., & Jawan, O. (1985). *Drug Dev. Ind. Pharm* , 11, 239–256
32. Thu, B., Gaserod, O., Paus, D., Mikkelsen, A., Skjak-Braek, G., Toffanin, R., et al. (2000). *Biopolymers* , 53, 60-71.
33. Stokke, B., Draget, K., Smidsrød, O., Yuguchi, Y., Urakana, H., & Kajiwara, K. (2000). *Macromolecules* , 33, 1853-1863.
34. A. Mikkelsen, A. Elgsaeter, *Biopolymes*, 36 (1995) 174
35. Smidrod, O. Glover, R., & Whittington, S. (1973). *Carbohydr.Res.* 26,107-118
36. Martinsen, A., Skjak –Braek, G., Smidsrod, O., Zanetti, F., & Paoletti, S. (1991). *Carbohydr.Polym*, 15,171-193
37. Chapman, V., & Chapman, D. (1980). In *Seaweeds and their Uses*. New York: Chapman and Hall
38. Meera, G., & Emilia, A. (2006). *Journal of Controlled Release* , 114, 1-14.
39. Gacesa, P. (1988). Alginates. *Carbohydr. Polym.* , 8, 161-182.
40. Martisen, A., Skjak-break, G. and Smidsred, O.(1989). *Biotechnol.Bioeng.*33, 79-89
41. Smidsrod, O. (1974). *araday Discussions Chem. Soc* , 57, 263–274.
42. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995) *Lebensm.-Wiss u. - Technol.*, 28, 25-30

43. Eminagaoglu O , Tepe B, Yumrutas O, Akpulat A , Daferera D, Moschos Polissiou, Sokmen A (2007). *Food Chemistry* 100, 339-343
44. [en.wikipedia.org/wiki/A431\\_cells-](http://en.wikipedia.org/wiki/A431_cells)
45. Mosmann T. *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 65, p. 55-63
46. Slater T.F., Sawyer B., Strauli U. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1963**, 77, 383-393
47. Petty R.D., Sutherland L.S., Hunter E.M., Cree I.A. *J. Biolumin Chemilumin*, **1995**, 10, p. 29-34.