



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

Τμήμα Φαρμακευτικής

Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

**Φυτοχημική μελέτη εκχυλισμάτων ειδών του γένους
Cistus με αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές
ιδιότητες**

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

«Απομόνωση-Ανάπτυξη-Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων»

Ηλιάννα Βουδούρη

Φαρμακοποιός

Αθήνα 2018

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Φαρμακευτικής
Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών

Απομόνωση – Ανάπτυξη - Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

Τίτλος Εργασίας

Φυτοχημική μελέτη εκχυλισμάτων ειδών *Cistus* της Ελληνικής Χλωρίδας με αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Φοιτήτρια

Ηλιάνα Βουδούρη

A. M: 230037415527

Επιβλέπων Καθηγητής

Αναπληρωτής Καθηγητής Νεκτάριος Αληγιάννης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αναπλ. Καθηγητής Νεκτάριος Αληγιάννης

Επικ. Καθηγητής Νικόλαος Φωκιαλάκης

Καθηγήτρια Σοφία Μητάκου

*"Όμως κιανείς αλαδανάρης ποτές του δεν εκρύωσενε κιας δρώνει κιας
ξεδρώνει ολημερνής τση μέρας γιατί ο θυμός τ' αλάδανου είναι μεγάλο
φάρμακο και κειοσάς ο θυμός είναι παντού όντεν αλαδανίζουμε".*

Οι αλαδανάρηδες του Μυλοπόταμου

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής της μεταπτυχιακής εργασίας, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αληγιάννη Νεκτάριο, τον Επίκουρο Καθηγητή Νικόλαο Φωκιαλάκη και την Καθηγήτρια Σοφία Μητάκου.

- Ευχαριστώ εκ βαθέων τον αναπληρωτή Καθηγητή Αληγιάννη Νεκτάριο, υπεύθυνο της παρούσας εργασίας, που με δέχτηκε στην ομάδα του, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην εκπόνηση του θέματος και τις ευκαιρίες επιστημονικής κατάρτισης που μου παρείχε.
- Τη μεταδιδάκτορα Χείλαρη Αντιγόνη για την πολύτιμη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο, τη συνεχή καθοδήγηση και τον αμέριστο ζήλο της για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.
- Τον διδάκτορα Ελευθέριο Καλπουτζάκη (ΕΔΙΠ) για τη συλλογή και βοτανική ταυτοποίηση των φυτικών δρογών, καθώς και την παραχώρηση του φωτογραφικού υλικού από το προσωπικό του αρχείο.
- Την υποψήφια διδάκτορα Ευανθία Ντίνα για την πολύτιμη βοήθεια της στην υλοποίηση των αντιοξειδωτικών ελέγχων καθώς και τις διδάκτορες Μαρία Μακροπούλου και Αργυρώ Βοντζαλίδου στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.
- Τον Καθηγητή στο Πανεπιστήμιο του Παρισιού Université Paris Descartes (Γαλλία) Assoc. Prof. Gregory-Genta Jouve και την Καθηγήτρια Assoc. Prof. Marina Kritsanida για την διεξαγωγή των βιολογικών δοκιμασιών στα εκχυλίσματα για την αξιολόγηση των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων.
- Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συμφοιτητές μου και όλα τα μέλη του τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας και επικοινωνίας.
- Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για την αδιάκοπη υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια και τους στενούς φίλους μου για τη συμπαράστασή τους.

Περίληψη

Ένας από τους κύριους στόχους του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων είναι η μελέτη χερσαίων και θαλάσσιων οργανισμών με σκοπό την ανακάλυψη βιοδραστικών φυσικών προϊόντων και την ανάδειξη σημαντικών εφαρμογών στους τομείς της φαρμακευτικής, της κοσμετολογίας, των τροφίμων και της γεωργίας.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, σκοπός ήταν η μελέτη του φυτοχημικού προφίλ εκχυλισμάτων ειδών *Cistus* της Ελληνικής Χλωρίδας. Τα είδη του γένους *Cistus*, τα οποία είναι γνωστά με την κοινή ονομασία *λαδανιά*, αποτελούν αντικείμενο μελέτης της ερευνητικής μας ομάδας στα πλαίσια της γενικότερης προσπάθειας για την ανάδειξη των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της ελληνικής παραδοσιακής θεραπευτικής.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας αποτέλεσε αρχικά η σύγκριση του φυτοχημικού προφίλ εκχυλισμάτων των υπέργειων τμημάτων των ειδών *Cistus salviifolius*, *C. creticus* subsp. *creticus*, *C. parviflorus*, *C. monspeliensis* και *C. creticus* subsp. *eriocephalus*. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η παραλαβή των εκχυλισμάτων με την τεχνική της επιταχυνόμενης εκχύλισης (ASE) και στη συνέχεια ακολούθησε η συγκριτική μελέτη τόσο του φυτοχημικού τους προφίλ με Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC), όσο και της αντιοξειδωτικής (TPC, TFC, ABTS, DPPH) και αντιμικροβιακής τους δράσης. Με βάση τα αποτελέσματα των προαναφερόμενων ελέγχων επιλέχθηκε το μεθανολικό εκχύλισμα του είδους *Cistus monspeliensis* για περαιτέρω φυτοχημική μελέτη, καθώς παρουσίασε σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα και πλούσιο φυτοχημικό προφίλ. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος με φυγόκεντρο χρωματογραφία κατανομής (FCPC), ενώ τα κλάσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν περαιτέρω με τη χρήση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία στήλης (LC), η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Sephadex) και η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (prep-TLC).

Με τη χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ταυτοποιήθηκαν 16 δευτερογενείς μεταβολίτες, εκ των οποίων 8 εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στο γένος *Cistus*, ενώ 3 εξ αυτών αποδείχθηκαν νέα φυσικά προϊόντα.

Πιο συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκαν:

✓ 9 φλαβονόλες και συγκεκριμένα η 3, 7, 4', 5'-τετρα-Ο-μεθυλομυρικετίνη (cm1), pachyrodol (3,7,3'-τριμεθυλ-αιθέρας της κερκετίνης) (cm2), η 5-Ο-γλυκοπυρανοσυλο-2-

(4, 5-διμεθοξυ-3-υδροξυφαινυλο)-3,7-διμεθοξυχρωμεν-4-όνη (cm4), η 5-Ο-γλυκοπυρανοσυλ-2-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)-3,7-διμεθοξυ-5-υδροξυχρωμεν-4-όνη (cm5), η ισοκερκετίνη (cm6), ο υπεροσίδης (cm7), ο 3-Ο-β-D-αραβινοσίδης της μυρικετίνης (cm9), ο 3-Ο-β-D-γλυκοπυρανοσίδης της μυρικετίνης (cm10) και ο 3-Ο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης της μυρικετίνης (cm11) από τις οποίες 4 ταυτοποιούνται για πρώτη φορά στο γένος *Cistus* (cm2, cm4, cm5, cm9) ενώ 2 (cm4, cm5) αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα.

✓ 2 ακετοφαινόνες και συγκεκριμένα η 2, 4-διυδροξυ-6-μεθυλακετοφαινόνη (cm3) και η 2-Ο-γλυκοπυρανοσυλο-2,4-διυδροξυ-6-μεθυλοακετοφαινόνη (cm12), οι οποίες ταυτοποιούνται για πρώτη φορά στο γένος *Cistus*, ενώ 1 εξ αυτών (cm12) αποτελεί νέο φυσικό προϊόν.

✓ μία φλαβανόλη, η γαλλοκατεχίνη (cm8).

✓ η 1-Ο-γλυκοπυρανοσυλο-3-Ο-μεθυλοφλορογλουκινόλη (cm13).

✓ ο 3-Ο-β-D-γλυκοπυρανοσίδης του πρωτοκατεχικού οξέος (cm14), ο οποίος εντοπίζεται για πρώτη φορά στο γένος *Cistus*.

✓ η αρβουτίνη (cm15), η οποία εντοπίζεται για πρώτη φορά στο γένος *Cistus*, και τέλος,

✓ το σικιμμικό οξύ (cm16).

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:

Cistus salviifolius, *Cistus creticus* subsp. *creticus*, *Cistus parviflorus*, *Cistus monspeliensis*, *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*, λαδανιά, αντιοξειδωτική δράση, αντιμικροβιακή δράση, φλαβονοειδή, ακετοφαινόνες, φαινόλες

Abstract

One of the main purposes of the Laboratory of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products is the study of terrestrial and marine natural products that aim to research and development of important applications in the fields of medicine, cosmetics, food and agriculture.

In the context of this diploma thesis, the aim was to study the phytochemical profile of extracts of *Cistus* species belonging to the Greek Flora. The species of the genus, known by the common name *ladania*, for which there are references from antiquity for their uses and properties, are subject of study of our research team in the context of the general effort to promote the aromatic and medicinal plants of the Greek traditional therapy.

The purpose of this study was to compare the phytochemical profile of extracts of the aerial parts of the species *Cistus salviifolius*, *Cistus creticus* subsp. *creticus*, *Cistus parviflorus*, *Cistus monspeliensis*, and *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*. More specifically, there was initially performed extraction from each *Cistus* species by accelerated solvent extraction (ASE) and then a systematic comparative study of both their phytochemical profile with HPTLC and their antioxidant (TPC, TFC, ABTS, DPPH) and antimicrobial activity. The methanolic extract of *Cistus monspeliensis* was then selected for further phytochemical analysis as it showed significant antioxidant capacity and a rich phytochemical profile. First, the fractionation of the methanolic extract by centrifugal distribution chromatography (FCPC) was performed, and the resulting fractions were further analyzed using various chromatographic techniques, such as column chromatography, Sephadex, and preparative thin layer chromatography (prep-TLC).

A total of 16 secondary metabolites were identified by nuclear magnetic resonance spectroscopy (1D & 2D NMR), 8 of which were for the first time detected in the genus *Cistus*, and 3 of them affording new natural compounds.

As far as secondary metabolites are concerned, there were identified:

✓ 9 flavonols; more specifically 3, 7, 4', 5'-tetra-O-methylmyricetin (cm1), pachypodol (cm2), 5-O-glucopyranosyl-2-(4,5-dimethoxy-3-hydroxyphenyl)-3,7-dimethoxychromen-4-one (cm4), 5-O-glucopyranosyl-2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-3,7-dimethoxy-5-hydroxychromen-4-one (cm5), isoquercetin (cm6), hyperoside (cm7), myricetin 3-O-β-D-arabinoside (cm9), myricetin 3-O-β-D-glucopyranoside (cm10) and myricetin 3-O-β-D-

galactopyranoside (cm11), 4 identified for the first time in the genus *Cistus* (cm2, cm4, cm5, cm9), 2 of which (cm4, cm5) are new natural products.

✓ 2 acetophenones; more specifically 2, 4-dihydroxy-6-methyl-acetophenone (cm3) and 2-*O*-glucopyranosyl-2,4-dihydroxy-6-methyl-acetophenone (cm12), identified for the first time in the genus *Cistus*, 1 of which (cm12) is a new natural product.

✓ a flavanol; gallocatechin (cm8).

✓ 1-*O*-glucopyranosyl-3-*O*-methylphloroglucynol (cm13).

✓ Protocatechuic acid 3-glucoside (cm14); detected for the first time in the genus *Cistus*.

✓ Arbutine (cm15); also for the first time detected in the genus *Cistus*, and finally,

✓ shikimic acid (cm16).

KEY WORDS:

Cistus salviifolius, *Cistus creticus* subsp. *creticus*, *Cistus parviflorus*, *Cistus monspeliensis*, *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*, *ladania*, antioxidant activity, antimicrobial activity, flavonoids, phenolic compounds, phytochemical analysis

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	VII
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	VIII
ABSTRACT	X
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	XII
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1. ΔΡΟΓΟΪΣΤΟΡΙΑ	4
2. ΔΡΟΓΟΒΟΤΑΝΙΚΗ	7
2.1 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ CISTACEAE.....	7
2.2 ΓΕΝΟΣ CISTUS	8
2.2.1 Βοτανικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Cistus</i>	8
2.2.2 Ταξινομική του γένους <i>Cistus</i>	9
2.2.3 Είδη <i>C. salviifolius</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i>	11
2.2.3.1 Το είδος <i>C. monspeliensis</i> , Κίσθος ο μομπιλανός.....	11
2.2.3.2 Το είδος <i>C. salviifolius</i> , Κίσθος ο φασκομηλόφυλλος	13
2.2.3.3 Το είδος <i>C. parviflorus</i> , Κίσθος ο μικρανθής.....	15
2.2.3.4 Το είδος <i>C. creticus</i> , Κίσθος ο κρητικός	16
2.2.4 Λάδανο (ρητίνη).....	18
3. ΔΡΟΓΟΧΗΜΕΙΑ – ΔΡΟΓΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ	20
3.1 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΓΕΝΟΥΣ CISTUS	20
3.1.1 Τερπενοειδή.....	20
3.1.1.1 Μονοτερπένια.....	21
3.1.1.2 Σεσκιτερπένια	25
3.1.1.3 Λαβδανικού τύπου διτερπένια	30
3.1.1.4 Κλεροδάνια	34
3.1.2 Φαινυλοπροπανοειδή	35
3.1.2.1 Φλαβονοειδή	37
3.1.2.2 Ελαγitanνίνες.....	45
3.1.3 Άλλες κατηγορίες.....	46
3.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ, ΦΥΤΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ CISTUS.	47
3.2.1 Αντιοξειδωτική δράση	47
3.2.2 Αντιβακτηριακή δράση	48
3.2.3 Κυτταροτοξική / Κυτταροστατική δράση.....	49
3.2.4 Σπασμωλυτική δράση	51

3.2.5	Δράση έναντι δερματικών παθήσεων	52
3.2.6	Αντική δράση	52
3.2.7	Βιολογικές δράσεις ρητίνης λαδάνου	53
3.2.8	Άλλες δράσεις	54
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....		56
4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....		57
4.1	ΕΠΙΤΑΧΥΝΟΜΕΝΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ (ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION-ASE 300)	57
4.2	ΡΗΤΙΝΕΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ	59
5. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ		61
5.1	ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (ANALYTICAL THIN LAYER CHROMATOGRAPHY - ANALYTICAL TLC)	62
5.2	ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (PREPARATIVE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY – PREP_TLC) ..	63
5.3	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HIGH PERFORMANCE PREPARATIVE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY – HPTLC)	64
5.4	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ SILICA GEL ΩΣ ΠΛΗΡΩΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	65
5.5	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ (SERHADEX LH-20)	66
5.6	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΙΣΗ (FCPC)	67
6. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ		72
6.1	ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR).....	72
7. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΧΗΜΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΚΑΙ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ.....		73
7.1	Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης	73
7.1.1	Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH	73
7.1.2	Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο ABTS	75
7.1.3	Προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φαινόλες και φλαβονοειδή	76
7.1.3.1	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content - TPC)	77
7.1.3.2	Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (Total Flavonoid Content - TFC)	80
7.2	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	81
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ.....		84
8. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΙ ΈΛΕΓΧΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ		85
8.1	ΕΠΙΤΑΧΥΝΟΜΕΝΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ (ASE)	85
8.2	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPTLC)	86
9. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ CISTUS		90
9.1	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	90

9.1.1	Έλεγχος ικανότητας εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας DPPH.....	90
9.1.2	Έλεγχος ικανότητας εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας ABTS.....	91
9.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΣΕ ΦΑΙΝΟΛΕΣ ΚΑΙ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ.....	92
9.2.1	Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content-TPC).....	92
9.2.2	Προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC).....	93
10.	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ CISTUS	95
11.	ΡΗΤΙΝΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΧΑΔ-4	100
11.1	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	100
11.2	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΡΗΤΙΝΗΣ ΧΑΔ-4 ΜΕ ΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPTLC).....	102
12.	ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ (FCPC)	105
12.1	ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ CISTUS SALVIFOLIUS.....	107
12.2	ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ CISTUS CRETICUS SUBSP. CRETICUS	108
12.3	ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ CISTUS PARVIFLORUS.....	109
12.4	ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ CISTUS MONSPELIENSIS.....	110
12.5	ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ CISTUS CRETICUS SUBSP. ERIOCERHALUS.....	112
12.6	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ FCPC ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPTLC).....	114
13.	ΦΥΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΥΠΕΡΓΕΙΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ CISTUS MONSPELIENSIS	118
13.1	ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΜΕΘΑΝΟΛΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ (FCPC)	118
13.2	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ CISTUS MONSPELIENSIS.....	122
13.2.1	Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (prep-TLC) στο κλάσμα A3.....	123
13.2.2	Sephadex LH-20 στο κλάσμα A15	123
13.2.3	Sephadex LH-20 στο κλάσμα A17A18	125
13.2.4	Sephadex LH-20 στο κλάσμα A19	127
13.2.5	Sephadex LH-20 στο κλάσμα A21A22	129
13.2.6	Sephadex LH-20 στο κλάσμα A23	131
13.3	ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ CISTUS MONSPELIENSIS	133
13.3.1	Μεταβολίτης cm1	133
13.3.2	Μεταβολίτης cm2	136
13.3.3	Μεταβολίτης cm3	137
13.3.4	Μεταβολίτης cm4	138
13.3.5	Μεταβολίτης cm5	141
13.3.6	Μεταβολίτης cm6	143

13.3.7	Μεταβολίτης <i>cm7</i>	145
13.3.8	Μεταβολίτης <i>cm8</i>	147
13.3.9	Μεταβολίτης <i>cm9</i>	149
13.3.10	Μεταβολίτης <i>cm10</i>	151
13.3.11	Μεταβολίτης <i>cm11</i>	153
13.3.12	Μεταβολίτης <i>cm12</i>	154
13.3.13	Μεταβολίτης <i>cm13</i>	156
13.3.14	Μεταβολίτης <i>cm14</i>	158
13.3.15	Μεταβολίτης <i>cm15</i>	160
13.3.16	Μεταβολίτης <i>cm16</i>	162
14.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	163
15.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	165
	<i>CM1/CM2</i>	165
	<i>CM3</i>	167
	<i>CM4/CM5</i>	169
	<i>CM6/CM7</i>	171
	<i>CM8</i>	171
	<i>CM9</i>	172
	<i>CM10/CM11</i>	173
	<i>CM12</i>	174
	<i>CM13</i>	176
	<i>CM14</i>	176
	<i>CM15/CM16</i>	177
16.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	179

Συντομογραφίες

°C	βαθμοί Κελσίου
%	επί τοις εκατό
<	μικρότερο από
>	μεγαλύτερο από
δ	χημική μετατόπιση
K	βαθμοί Kelvin
μg	μικρογραμμάρια
1D	μιας διάστασης
2D	δύο διαστάσεων
¹ H	πρωτόνιο
¹³ C	ισότοπο άνθρακα
Acet	ακετόνη
AcN	ακετονιτρίλιο
brs	ευρεία κορυφή
BuOH	βουτανόλη
C	άνθρακας
C	συγκέντρωση
c-	κυκλο-
CCC	Countercurrent Chromatography
cm	εκατοστόμετρα
CO ₂	διοξείδιο του άνθρακα
COSY	Correlation Spectroscopy
CPC	Centrifugal Partition Chromatography
<i>d</i>	διπλή κορυφή
<i>dd</i>	διπλώς διπλή κορυφή
<i>ddd</i>	διπλώς διπλή διπλής κορυφή
DAD	Diode Array Detector
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
EtOAc	οξικός αιθυλεστέρας
EtOH	αιθανόλη
FA	φορμικό οξύ
FCPC	Fast Centrifugal Partition Chromatography
Fr	Fraction (κλάσμα)
Glu	γλυκόση
h	ώρες
H	υδρογόνο
H ₂ O	νερό
H ₂ SO ₄	θειικό οξύ
Hex	εξάνιο
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
<i>J</i>	σταθερά σύζευξης διπόλου-διπόλου

K_d	Συντελεστής Κατανομής
L	λίτρα
LP	Lower Phase (κάτω φάση)
L.	Carl Linnaeus, βοτανικός
MeOH	μεθανόλη
MeOD	δευτεριωμένη μεθανόλη
mg	χιλιοστόγραμμα
MHz	Megahertz
min	λεπτά
mL	χιλιοστόλιτρα
mm	χιλιοστά
mol	Mole
MTBE	tert-Βουτυλομεθυλαιθέρας
nm	νανόμετρα
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
O	οξυγόνο
ppm	Parts per Million
psi	Δύναμη λίβρας ανά τετραγωνική ίντσα (μονάδα μέτρησης πίεσης)
<i>q</i>	Quartet (τετραπλή) κορυφή
RP	Reverse Phase (αντίστροφη φάση)
rpm	Rotation per Minute (στροφές ανά λεπτό)
<i>s</i>	Singlet (απλή) κορυφή
<i>s</i>	δευτερόλεπτα
<i>t</i>	Triplet (τριπλή) κορυφή
TLC	Thin Layer Chromatography
Tol	Τολουόλιο
UPo	Upper Phase zero (αρχική πάνω φάση)
UP	Upper Phase (πάνω φάση)
UV	Ultra Violet (υπεριώδες)
μ.Χ.	μετά Χριστόν
π.Χ.	προ Χριστού

Εισαγωγή

1. Δρογοϊστορία

Η σπουδαιότητα των φυτικών ειδών του γένους *Cistus* ήταν ήδη γνωστή από την αρχαιότητα. Σύμφωνα με τον πάπυρο Ebers, οι Αιγύπτιοι κατά την εποχή των Φαραώ χρησιμοποιούσαν το φυτό ως φάρμακο και την ρητίνη που παράγουν κάποια είδη, γνωστή



Εικόνα 1 Νωπογραφία γαλάζιο πουλί

και ως λάδανο (*labdanum*), ως αφροδισιακό βάλσαμο (Nicoletti et al., 2015). Επίσης, η αρωματική ρητίνη κάποιων φυτών χρησιμοποιήθηκαν από αρχαιοτάτων χρόνων τόσο έναντι της χολέρας όσο και για την ταρίχευση των νεκρών. Ευρύτατη ήταν η χρήση του φυτού και στην Μινωϊκή Κρήτη, ενώ τα άνθη

του απεικονίζονται στη νωπογραφία «γαλάζιο

πουλί»(Εικόνα 1).

Αναφορές για το γένος *Cistus* γίνονται αργότερα και από τον Ηρόδοτο (484 π.Χ.-425 π.Χ.) Ο πατέρας της Ιστορίας περιγράφει τους Άραβες και τη σχέση τους με το λάδανο καθώς και τον τρόπο που το μαζεύαν, από τα γενιά των τράγων: *Τὸ δὲ δὴ λήδανον, τὸ καλέουσι Ἀράβιοι λάδανον, ἔτι τούτου θωμασιώτερον γίνεται· ἐν γὰρ δυσσοδομοτάτῳ γινόμενον εὐωδέστατον ἐστί· τῶν γὰρ αἰγῶν τῶν τράγων ἐν τοῖσι πώγωσι εὐρίσκεται ἐγγινόμενον οἶον γλοιὸς ἀπὸ τῆς ὕλης. χρήσιμον δ' ἐς πολλὰ τῶν μύρων ἐστί, θυμιῶσί τε μάλιστα τοῦτο Ἀράβιοι.* Αργότερα, ο Ιπποκράτης (460 π.Χ.-377 π.Χ.) είναι ο πρώτος που αποκάλεσε το γένος «Κίσθος». Αναφορές στο φυτό γίνονται και από τον Θεόφραστο (371 π.Χ.-287 π.Χ.): *κίσθος, κίστος, κίσσαρος, κίσθαρος* «κίστος ὃν ἐνιοὶ κίσθαρον ἢ κίσσαρον καλοῦσι» αναδεικνύοντας το φυτό ως πηγή πολύτιμης ρητίνης. Σήμερα τα είδη του γένους είναι γνωστά με τα δημώδη ονόματα: κιστά, κιστάρια, αλίσσαρος, αλιταριές, ατίσσαρος, λαδανιές, κουνουκλιές, ξιστάρια, ξισταριές. (Καββαδάς, 1990). Ο Ρωμαίος ιατρός Celsus (25 π.Χ.-50 μ.Χ.), αναφέρει τη χρήση της ρητίνης, ως έμπλαστρο σε κακοήθη σαρκώματα. Ιδιαίτερη αναφορά στο φυτό *Cistus* γίνεται και από τον Διοσκουρίδη (10 μ.Χ.-90 μ.Χ.) στο σύγγραμμά του «Περί ὕλης Ιατρικῆς», αναδεικνύοντας ότι το φυτό έχει χρησιμοποιηθεί για πάνω από 2.000 χρόνια στην περιοχή της Ταυγus της Νότιας Ανατολίας, γενέτειρας του μεγαλύτερου Φαρμακολόγου της Αρχαιότητας. Ο ίδιος δίνει μια λεπτομερή περιγραφή για τον τρόπο συλλογής της ρητίνης: «*ἡ ἐκκρίση τοῦ φυτοῦ κολλᾷ στα γένια καὶ στα πόδια τῶν τράγων καὶ*

των αιγών όταν βόσκουν και από εκεί μαζεύεται και ζυμώνεται για να πάρει την τελική μορφή του.». Ο Ορειβάσιος, διαπρεπής Βυζαντινός ιατρός που έζησε τον 4^ο αιώνα μ.Χ., παρασκεύαζε αλοιφή με λάδανο κατά της τριχόπτωσης για το Ρωμαίο Αυτοκράτορα Ιουλιανό. Τέλος, ο Πέρσης ιατρός Αβικέννας που έζησε στην Περσία (980-1037 μ.Χ.) και ασχολήθηκε εκτεταμένα με την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας, αναφέρει τη χρήση του λαδάνου για την αποσκλήρυνση του στομάχου και του εντέρου και με τη μορφή αλοιφής για τη θεραπεία του σπλήνα.

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

Στην παραδοσιακή Ιατρική πολλών χωρών έχει αναφερθεί η χρήση τους για την αντιμετώπιση ρευματισμών, ελκών, αιμορροΐδων, μικροβιακών μολύνσεων, μυκητιασικών μολύνσεων, αιμορραγιών και πυρετού. Επίσης έχει καταγραφεί η χρήση για τη θεραπεία της στειρότητας, σε φλεγμονές των νεφρών και των ουροποιητικών οδών, ως αποχρεμπτικό, ως καταπραϋντικό σε περιπτώσεις πεπτικού έλκους, καθώς και για την αντιμετώπιση του σακχαρώδη διαβήτη (Ahmad et al., 1993; Attaguile et al., 2000; M. M. Azevedo et al., 2015; Barraji n-Catal n et al., 2010; K hn et al., 2011a; K peli and Yesilada, 2007; Papaefthimiou et al., 2014a; Rebaya et al., 2016b; Ulrich Kalus, 2009). Πολλά από τα είδη *Cistus* χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν σε όλες σχεδόν τις περιοχές της Μεσογείου (Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Τουρκία) για την αντιμετώπιση της διάρροιας και των πεπτικών ελκών, δερματολογικών παθήσεων, ως αντιφλεγμονώδη και σπασμολυτικά (Ahmad et al., 1993; Yesilada et al., 1997). Στην Ιορδανία χρησιμοποιήθηκε αφέψημα προερχόμενο από είδος *Cistus* για την αντιμετώπιση της ουρικής αρθρίτιδας (Al-khalil, 1995). Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η χρήση φύλλων από είδη *Cistus* sp στην Τουρκία σε λουτρό για την ανακούφιση από ρευματισμούς, αλλά και η τοπική εφαρμογή βρασμένων φύλλων στην περιοχή των νεφρών για την θεραπεία φλεγμονής του ουροποιητικού συστήματος (K peli and Yesilada, 2007).

Επιπλέον, τα φύλλα ειδών *Cistus* (πιο συγκεκριμένα *C. ladanifer*, *C. creticus* subsp. *creticus*) που επικαλύπτονται από τη ρητίνη (Maggi et al., 2016), αποτελούν ένα από τα 57

συστατικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του Αγίου Μύρου στο Πατριαρχείο της Κωνσταντινουπόλεως.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα χρήσης του φυτού στην ελληνική παραδοσιακή θεραπευτική δίνεται από την παρακάτω συνταγή της Κρήτης: **Βραστάρι (Cretan Tea)**. Σύμφωνα με το ladano.blogspot.com, τα πράσινα μέρη της λαδανιάς, φύλλα, δροσερά μέρη και βολβοί γίνονται “βραστάρια” με πολλά βότανα μαζί για την αντιμετώπιση των νεφροπαθειών (πέτρες στους νεφρούς). Κατά τη διαδικασία της παρασκευής, ζεσταίνουμε 50 με 60 g του φυτού σε κατσαρόλι με νερό 500 mL για 20 λεπτά της ώρας. Αφού έρθει το νερό στο σημείο βρασμού το αφήνουμε να πάρει «δυο βράσεις», μέχρι το χρώμα του νερού να «πάρει το χρώμα του κρασιού». Ο χρόνος αποτελεί κρίσιμο σημείο στην όλη διαδικασία γιατί αν βράζει περισσότερη ώρα το Βραστάρι, παίρνει πολύ πικρή γεύση και δεν πίνεται. Μετά τη διαδικασία του βρασμού ακολουθεί η διήθηση ώστε να απομακρυνθούν τα ξερά μέρη και να γίνει το Βραστάρι καθαρό. Κατόπιν τοποθετείται σε μπουκάλια στο ψυγείο στην συντήρηση. Η δοσολογία περιλαμβάνει ένα ποτήρι του κρασιού κάθε πρωί, σχεδόν δύο με τρεις εβδομάδες. Η πετρά διαλύεται και απομακρύνεται από το σώμα του ασθενή κατά την διάρκεια της ούρησης.

Τέλος, στις ρίζες της λαδανιάς παρασιτεί ένα φυτό (*Cytinus hypocistis*) με εκτυφλωτικό κόκκινο χρώμα που το χαρακτηρίζει η παντελής έλλειψη χλωροφύλλης. Το παρασιτικό αυτό φυτό, με την κοινή ονομασία *λύκος της λαδανιάς*, **Κύτινος ο υπόκιστος**, έχει φύλλα κόκκινα, σαρκώδη σε επάλληλη επικάλυψη. Τα άνθη του έχουν 4 τέπαλα, λευκά ή κίτρινα, καλυμμένα από τα φύλλα, σε πυκνά κεφάλια, τα εξωτερικά αρσενικά και τα εσωτερικά θηλυκά. Το όνομα υπόκιστος (υποκιστής) είναι από τον Διοσκουρίδη. Οι αρχαίοι χρησιμοποιούσαν το χυμό που βγαίνει από το παράσιτο αυτό για στομαχικές παθήσεις (Vega et al., 2009).

2. Δρογοβοτανική

2.1 Οικογένεια *Cistaceae*

Η Οικογένεια *Cistaceae*, ή άλλως *Rock Rose Family*, (*Αγγειόσπερμα*, *Malvales*) είναι μία πολυπληθής οικογένεια ποωδών φυτών και πολυετών θάμνων ευδοκιμούντα στις εύκρατες ζώνες (Comandini et al., 2006; Tomás-Menor et al., 2013a). Η Οικογένεια *Cistaceae* αποτελείται από 180 είδη ταξινομημένα σε 8 γένη (Guzmán and Vargas, 2005), εκ των οποίων τα 5 (*Cistus*, *Fumara*, *Halimium*, *Helianthemum* και *Tuberaria*) είναι εδώδιμα της Μεσογειακής Γής. (Falchi et al., 2009; Guzmán and Vargas, 2009). Τα φύλλα των φυτών της οικογένειας *Cistaceae* είναι συνήθως αντίθετα, τα δε άνθη μονήρη ή οργανωμένα σε ταξιανθίες, υπόγυνα και ερμαφρόδιτα. Το άνθος αποτελείται από 3 έως 5 σέπαλα, 5 πέταλα ευκόλως αποσπώμενα. Ο καρπός είναι διαρηγνυόμενη κάψα με πολλά σπέρματα, κρεμαστή και σπανίως όρθια (Heywood & Ball, 1968).

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

Να σημειώσουμε επίσης τη χρήση των περισσότερων ειδών αυτής της Οικογένειας από την βιομηχανία αρωμάτων λόγω του ότι είναι ιδιαιτέρως εύοσμα, όπως επίσης και την καλλιέργεια κάποιων ειδών ως διακοσμητικά για τα λευκά και ερυθρά τριανταφυλλόμορφα άνθη τους (Ben-Jemina et al., 2013a; El Euch et al., 2015; Tomás-Menor et al., 2013a).

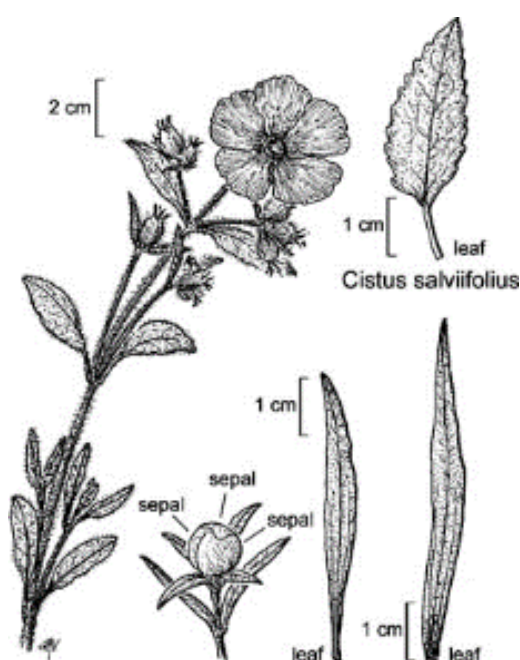
2.2 Γένος *Cistus*

Το γένος *Cistus* L., η ονομασία του οποίου προέρχεται από την ελληνική λέξη κίστος ή κισθός, αποτελεί ένα γένος φυτών που ευδοκιμεί σε βραχώδη και άγονα εδάφη και συχνά περιλαμβάνει θαμνώδη είδη (Dimitra Angelorouli et al., 2001; Gulz et al., 1996). Πλήθος θεραπευτικών ιδιοτήτων μπορούν να αποδοθούν στα φυτά της οικογένειας Cistaceae, και κυρίως στο γένος *Cistus*, τα είδη του οποίου χρησιμοποιούνται για αντιμετώπιση πολλών ασθενειών ανθρώπων και ζώων στον κόσμο της υπαίθρου στην περιοχή της Μεσογείου (Barrajon-Catalan et al., 2010). Αναφέρεται π.χ. η χρήση αφεψήματος των φύλλων του φυτού *Cistus* στην Τουρκία για την αντιμετώπιση της δυσπεψίας αλλά και του κοινού κρυολογήματος (Ahmad et al., 1993; M. M. Azevedo et al., 2015; Paraefthimiou et al., 2014a).

Ερευνητικές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι θεραπευτικές ιδιότητες των φυτών του γένους *Cistus* οφείλονται σε πλήθος δευτερογενών μεταβολιτών (Williams et al., 1989), όπως τερπενοειδή (τερπένια, διτερπένια τύπου λαβδανίου και κλεροδάνια), φαινυλο-προπανοειδή (φλαβονοειδή και ελαγιταννίνες), αλκαλοειδή και άλλα (Demetzos et al., 2002a, 1994, 1990; Kalpoutzakis et al., 2001; Maggi et al., 2016; Nicoletti et al., 2015; Paraefthimiou et al., 2014a), οι οποίοι βρίσκονται τόσο στα υπόγεια όσο και στα υπέργεια τμήματά τους.

2.2.1 Βοτανικά χαρακτηριστικά του γένους *Cistus*

Τα φυτά *Cistus* είναι μικροί, ξυλώδεις θάμνοι και σπανίως πόες που μπορούν να φτάσουν το ένα μέτρο ύψος. Έχουν κεντρικό ευθύγραμμο στέλεχος με αντίθετες και πλούσιες διακλαδώσεις. Στα κλαδιά αναπτύσσονται συνήθως κυματιστά φύλλα με διακλαδισμένα νεύρα, απλά και αδιαίρετα, αντίθετα ή εναλλασσόμενα και φέρουν τρίχες αστεροειδείς. Στο γένος *Cistus* παρουσιάζονται δύο τύποι τριχωμάτων το μη αδενικό και το αδενικό, το οποίο παράγει ένα ρητινώδες έκκριμα, το



Εικόνα 2 Γενικά βοτανικά χαρακτηριστικά ειδών *Cistus*

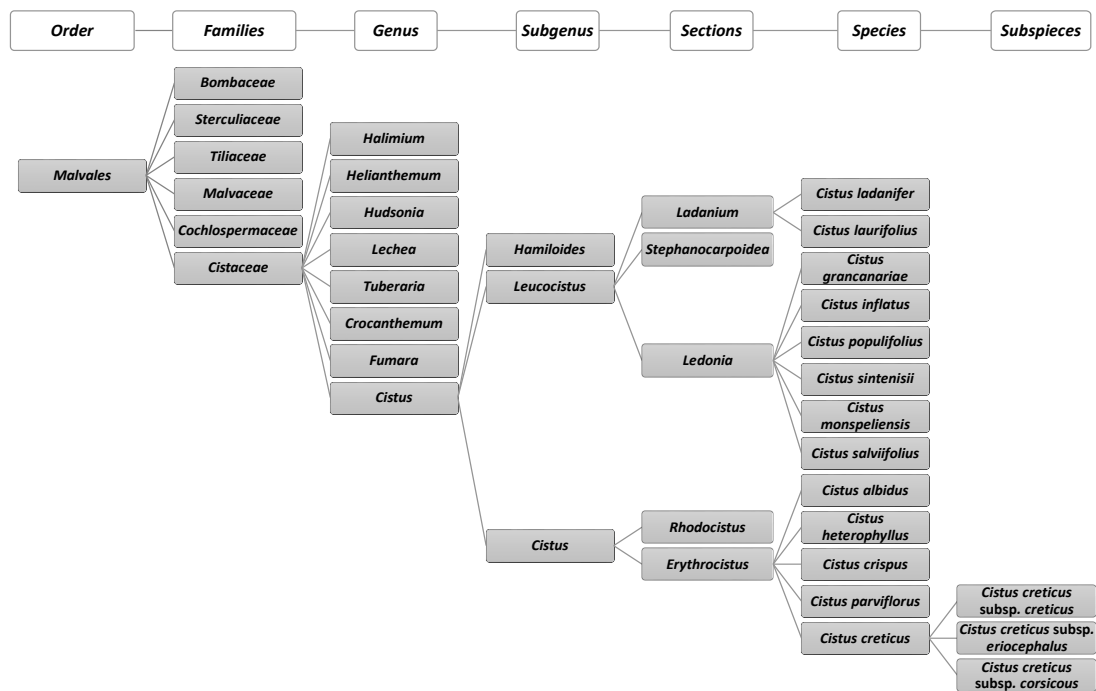
‘λάδανο’, που είναι υπεύθυνο για το χαρακτηριστικό άρωμα του είδους (Gulz et al., 1996). Τα φυτά έχουν μια ακραία ταξιανθία με 1-7 μονήρη άνθη (Guzmán and Vargas, 2009). Τα λουλούδια είναι εφήμερα, διεγείρονται από το πρωινό φως, έχουν είτε άσπρα είτε ροζ / μωβ πέταλα και 3-5 σέπαλα. Υπάρχουν πολλοί στήμονες, ενώ η ωοθήκη είναι πεντάχωρη και σπάνια δεκάχωρη (αλλά μπορεί επίσης να είναι 6-12 χώρων) και το στίγμα είναι μεγάλο, σε σχήμα δίσκου με 5-12 λοβούς (Guzmán and Vargas, 2009). Τα φυτά *Cistus* έχουν πολυάριθμους σπόρους με δύο κοτυληδόνες. Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων τους είναι $n = 9$ ($2n = 18$) (Guzmán and Vargas, 2009). Τα φυτά συμβιώνουν με μυκόρριζες με διάφορα είδη μανιταριών, τα οποία ανήκουν κυρίως στο γένος *Lactarius* (Comandini et al., 2006). Αυτά χαρακτηρίζονται από ένα πολυστρωματικό μανδύα που περιλαμβάνει τόσο επιδερμικά όσο και φλοιώδη κυτταρικά στρώματα (Gulz et al., 1996).

2.2.2 Ταξινόμηση του γένους *Cistus*

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

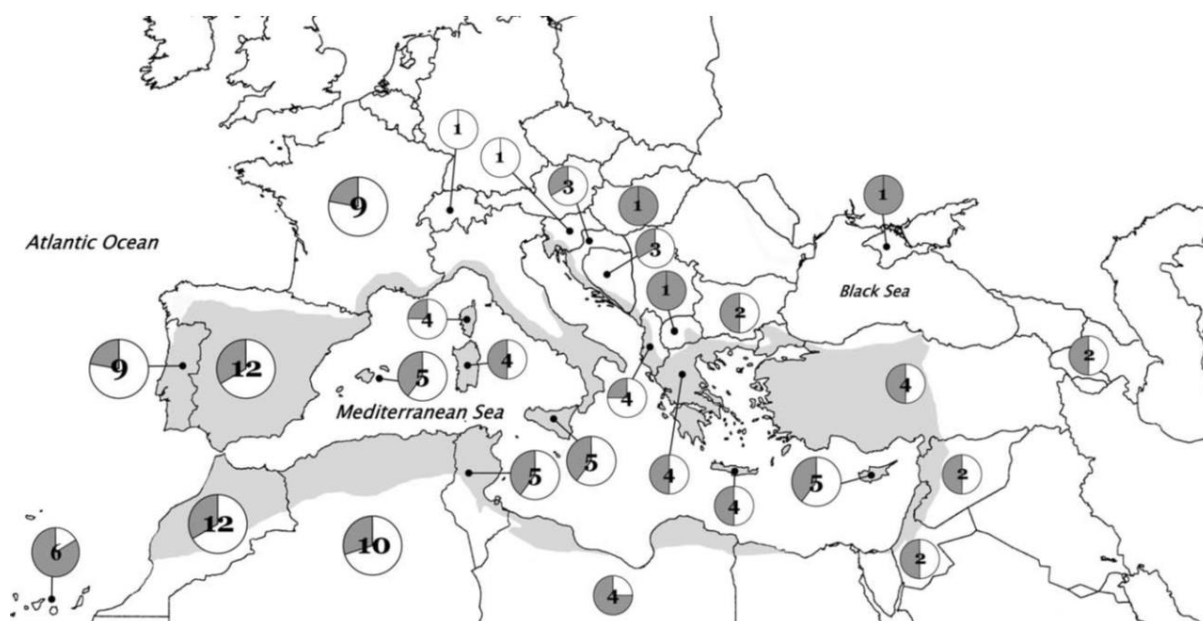
Η προσπάθεια ταξινόμησης του *Cistus* αρχίζει ήδη πριν από το 1800 (Linnaeus, 1753). Το 1824 πραγματοποιείται η πρώτη ολοκληρωμένη κατάταξη, η οποία περιγράφει 28 είδη διαιρούμενα σε 2 τμήματα, *Erythrocistus* και *Ledonia* (Dunal, 1824). Ακολούθησαν και άλλες προσπάθειες ταξινόμησης με διάφορα κριτήρια (Spach, 1836, Grosser, 1903, Dansereau, 1939) για να καταλήξουμε στην κατάταξη των Demoly και Mosterrrat το 1993 στην οποία αναφέρονται 12 ειδών του γένους *Cistus* που αναπτύσσονται στην Ιβηρική Χερσόνησο.

Μια πρόσφατη προσπάθεια ταξινόμησης των ειδών της οικογένειας Cistaceae βασίστηκε στη σύγκριση του DNA του πυρήνα και των πλασμιδίων των φυτικών κυττάρων, βάσει της οποίας διαιρέθηκε το γένος *Cistus* σε 3 υπογένη: το υπογένος *Cistus* με τα μωβ άνθη και τα υπογένη *Leucocistus* και *Hamiloides* με τα λευκά άνθη (Εικόνα 3) (Guzman και Vargas, 2005, Guzman et al., 2009).



Εικόνα 3 Ταξινομική απεικόνιση των ειδών *Cistus*

Ορισμένα από τα είδη *Cistus* είναι ενδημικά και άλλα ευρέως διαδεδομένα στην Ιβηρική Χερσόνησο, τα Κανάρια Νησιά, τη Βορειοδυτική Αφρική, την Ιταλία, την Ελλάδα και την Τουρκία. Τα είδη αυτά διαδίδονται σε διαφορετικές περιοχές της Μεσογείου, αλλά δεν κατανέμονται όλα τα είδη με τον ίδιο τρόπο (Guzmán and Vargas, 2009). Έτσι, κάθε περιοχή αποικίζεται από διαφορετικά είδη *Cistus*, ανάλογα με τις κλιματολογικές και τις εδαφικές συνθήκες (Dimitra Angeloroulou et al., 2001) (Εικόνα 4). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, παρόλο που το *Cistus* είναι ένα σχετικά μικρό γένος, να παρουσιάζει αξιοσημείωτη μορφολογική διαφοροποίηση, λόγω του πολυμορφισμού πολλών ειδών και της υβριδοποίησης μεταξύ των σχετικών ειδών (Ellul et al., 2002). Πράγματι, ο υβριδισμός έχει αναφερθεί ότι είναι μια ενεργή διαδικασία του είδους *Cistus* και πολλοί υβριδικοί συνδυασμοί εντός και μεταξύ των μωβ ή λευκών ανθοφόρων ειδών έχουν καταγραφεί με βάση ενδιάμεσους μορφολογικούς χαρακτήρες (Guzmán and Vargas, 2005).



Εικόνα 4 Χάρτης κατανομής και αριθμός ειδών *Cistus*. Τα διαγράμματα πίτας περιλαμβάνουν την αναλογία των ειδών λευκού - κοκκινωπού (λευκό) και μοβ-γκρίζου (γκρίζου) σε κάθε χώρα. Η περιοχή της Μεσογείου εμφανίζεται με γκρι χρώμα (Guzmán and Vargas, 2005).

Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τη μελέτη 5 ειδών του γένους *Cistus*. Από αυτά, τα 2 ανήκουν στο υπογένος *Leucocistus* (*C. monspeliensis* και *C. salviifolius*), ενώ το *C. parviflorus* στο υπογένος *Cistus* L. και τα υποείδη του είδους *C. creticus* (*C. creticus* subsp. *creticus* και *C. creticus* subsp. *eriocephalus*) ανήκουν στο υπογένος *Cistus* L.

2.2.3 Είδη *C. salviifolius*, *C. monspeliensis*, *C. parviflorus*, *C. creticus*

2.2.3.1 Το είδος *C. monspeliensis*, Κίσθος ο μομπιλιανός

Το είδος *C. monspeliensis* ή κίσθος ο μομπιλιανός ευδοκίμει από την Δυτική Μεσόγειο έως τις Καναρίους Νήσους και τη Μαδέρα. Η εικόνα που παρουσιάζει η κατανομή του δεν έχει σχέση με την ανθρώπινη παρέμβαση αλλά έχει καθοριστεί φυσικά (Guzmán and Vargas, 2009). Ο αποικισμός και η διαφοροποίησή του στις Καναρίους Νήσους μοιάζει να επιτεύχθηκε λόγω ευνοϊκών οικολογικών συνθηκών που επικράτησαν για το συγκεκριμένο είδος στα νησιά της Τενερίφης και της Gran Canaria (Guzmán and Vargas, 2010).



Εικόνα 5 *Cistus monspeliensis*, φωτογραφία: Ελευθέριος Καλπουτζάκης

Η εξάπλωση του φυτού προς τα Νοτιοδυτικά πραγματοποιήθηκε μέσω διασποράς μεγάλων αποστάσεων, ενώ σήμερα το είδος απαντάται σε διάφορες περιοχές της λεκάνης της Μεσογείου από Ισπανία, Ελλάδα, Κύπρο, Μαρόκο και Τυνησία (Dimitra Angelopoulou et al., 2001; Guzmán and Vargas, 2009).

Το έδαφος στο οποίο αναπτύσσεται το είδος *C. monspeliensis* είναι ξηρό και όξινο, ενώ απαντάται συνήθως είτε σε πέτρινες πλαγιές, ασβεστολιθικούς και πυριτολιθικούς λόφους και περιοχές πλούσιες σε δένδρα *Quercus* και *Pinus* ή σε δασικές περιοχές που έχουν διαταραχθεί από πυρκαγιά (Güvenç et al., 2005; Robles and Garzino, 2000).

Το *C. monspeliensis* (Εικόνα 5) διακρίνεται από τα φύλλα του που είναι ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του είδους: έχουν μέγεθος 15 - 50 x 4 - 8 mm και είναι άμισχα, στενά, τρίνευρα και λογχοειδή, πολύ κολλώδη, με αδενικές τρίχες, τα οποία έχουν στην εξωτερική τους επιφάνεια ένα σκούρο αλλά λαμπερό πράσινο χρώμα ενώ η εσωτερική τους πλευρά καλύπτεται από γκρι τριχίδια. Επίσης, παρουσιάζει εποχικό διμορφισμό φύλλων με εναλλασσόμενο φαρδύ και λεπτό φύλλο προς το τέλος του φθινοπώρου και τις αρχές του χειμώνα, και παχύ φύλλο κατά το τέλος της άνοιξης με μεγαλύτερη πυκνότητα τριχώματος. Επίσης είναι δυνατό και οι δύο τύποι να συνυπάρχουν στο ίδιο φυτό κατά την αρχή της άνοιξης (de Dato et al., 2010). Τα σέπαλά του είναι 5, καριόσημα ή με σχήμα ωοειδέ. Τα άνθη του είδους *C. monspeliensis* είναι μικρά, 2-3 εκατοστά, άσπρα με συχνά κίτρινες κηλίδες, οργανωμένα σε ένα μονόπλευρο σύμπλεγμα από 2-10 σχεδόν άτριχα άνθη. Το συγκεκριμένο είδος είναι ένας πολύ αρωματικός, όρθιος, διακλαδισμένος θάμνος ύψους 30-100 cm. Η περίοδος της ανθοφορίας του είναι από τον Απρίλιο έως και τον Ιούνιο.

Η συλλογή του φυτικού υλικού (υπέργεια τμήματα του είδους *C. monspeliensis*) που χρησιμοποιήθηκε κατά τη μεταπτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στις 12 Ιουνίου 1998 στην περιοχή της Αναβύσσου από τον Δρ. Ελευθέριο Καλπουτζάκη.

2.2.3.2 Το είδος *C. salviifolius*, Κίσθος ο φασκομηλόφυλλος

Πρόκειται για το πλέον διαδεδομένο είδος του γένους *Cistus* γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου (Guzmán and Vargas, 2009). Παρότι δεν υπάρχει γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών του *C. Salviifolius*, παρατηρείται υψηλή γενετική ποικιλότητα στους πληθυσμούς, ενώ λόγω τουλάχιστον τριών διηπειρωτικών αποικισμών το είδος χαρακτηρίζεται από ευρεία κατανομή (Guzmán and Vargas, 2009; Paolini et al., 2009). Η διασπορά του *C. salviifolius* γύρω από τη Μεσόγειο οφείλεται κυρίως σε λόγους οικολογικούς (κλίμα και έδαφος). Το είδος *C. salviifolius* απαντάται συχνά στο εσωτερικό δασικών περιοχών (Paolini et al., 2009) ενώ αναπτύσσεται σε εδάφη πλούσια σε πυρίτιο και ασβεστόλιθο, ενώ επίσης το συναντάμε σε αμμώδη εδάφη με ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών (Guzmán and Vargas, 2009).

Εικόνα 6 *Cistus salviifolius*, φωτογραφία: Ελευθέριος Καλπουτζάκης



Το είδος *C. salviifolius* (Εικόνα 6) είναι ένας χαμηλός λευκός ανθοφόρος θάμνος με ύψος 30-80 cm. Τα φύλλα του είναι μαλακά, ελάχιστα αρωματικά, δεν είναι κολλώδη, και μοιάζουν με φύλλα φασκόμηλου. Είναι ελλειπτικά ή ωοειδή, με πράσινο χρώμα και τρίχες αστεροειδούς σχήματος στην εξωτερική τους επιφάνεια και λευκή τριχωτή επιφάνεια στην εσωτερική τους πλευρά. Τα άνθη του (4-5 cm) είναι μονήρη ή οργανωμένα σε μικρές ομάδες τοποθετημένα σε μακρύ στέλεχος. Τα πέταλα είναι λευκά, με κίτρινο χρωματισμό στο κεντρικό μέρος και σε αριθμό έως και διπλάσιο από τα σέπαλα. Τα εξωτερικά 3 σέπαλα είναι αρκετά πιο πλατιά σε σχέση με τα εσωτερικά 2 (Heywood & Ball, 1968). Η περίοδος ανθοφορίας του είναι από τον Μάρτιο έως και τον Ιούνιο.

Η συλλογή του φυτικού υλικού (υπέργεια τμήματα του είδους *C. salviifolius*) που χρησιμοποιήθηκε κατά τη μεταπτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στις 13 Ιουνίου 1998 στον όρμο Φόδελε της Κρήτης από τον Δρ. Ελευθέριο Καλπουτζάκη.

2.2.3.3 Το είδος *C. parviflorus*, Κίσθος ο μικρανθής

Το είδος *C. parviflorus* (Εικόνα 7) είναι ένα ιδιαίτερο μέλος του γένους *Cistus* με μωβ άνθη. Παρότι μοιάζει η αρχική διαφοροποίησή του να έγινε στη Δυτική Μεσόγειο, το *C. parviflorus* εμφανίζεται αποκλειστικά στην Ανατολική Μεσόγειο (Guzmán and Vargas, 2010). Ευδοκίμει στα ξηρά κλίματα, τις θαμνώδεις πλαγιές και σε ασβεστολιθικά εδάφη (Guzmán and Vargas, 2009). Το ύψος του *C. parviflorus* φτάνει τα 100 εκατοστά. Τα φύλλα του έχουν μέγεθος 10-30 mm, είναι παχιά με ωοειδές σχήμα και με 3 λευκά νεύρα στο κάτω μέρος του που σχηματίζουν ένα ανάγλυφο δίκτυο.

Εικόνα 7 *Cistus parviflorus*, φωτογραφία: Ελευθέριος Καλπουτζάκης



Τα άνθη του είδους από 1 έως 6 σε αριθμό διαμέτρου 2-3 cm, πλάτους 3-3.5 cm είναι ροζ, οργανωμένα σε ταξιανθίες. Τα σέπαλα του φυτού είναι έντονα χνουδωτά με λευκό ή

σταχτύ χρώμα. Συνολικά είναι 5, 3 εξωτερικά και 2 εσωτερικά (Heywood & Ball, 1968). Η



Εικόνα 9 *Cistus creticus* subsp. *creticus*
φωτογραφία: Ελευθέριος Καλπουτζάκης



Εικόνα 8 *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*
φωτογραφία: Ελευθέριος Καλπουτζάκης

περίοδος ανθοφορίας του είναι από τον Απρίλιο έως και τον Ιούνιο.

Η συλλογή του φυτικού υλικού (υπέργεια τμήματα του είδους *C. parviflorus*) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στις 28 Μαΐου 1998 στο νομό Κορινθίας (πλησίον του οικισμού Γαλήνη) από τον Δρ. Ελευθέριο Καλπουτζάκη.

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

Το είδος *C. creticus* είναι ένας ροδοκόκκινος θάμνος με φύλλα ωοειδή ή ελλειπτικά, τραχιά, συχνά κυματιστά. Είναι ένας πυκνά διακλαδισμένος θάμνος, ψηλός, μέχρι 1 m, με φύλλα μήκους 2-3 cm που έχουν δικτυωτά νεύρα στην κάτω επιφάνειά τους, ο οποίος καλύπτεται και στις δύο πλευρές από αστεροειδείς και μακριές τρίχες. Τα άνθη του (διαμέτρου 4-6 cm) είναι ροζ, τριχωτά, 4-6 εκατοστά, οργανωμένα κατά 3-5 με τριχωτά σέπαλα, 2-3 φορές μικρότερα από τα πέταλα. Το *C. creticus* αποτελεί ένα είδος με μεγάλη ποικιλομορφία, με ή χωρίς αδενικές τρίχες στα νεαρά κλαδιά, στους μίσχους, στον κάλυκα και στην κάτω επιφάνεια των φύλλων (Καββαδάς, 1990).

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

Η περίοδος ανθοφορίας του είδους *C. creticus* είναι από τον Μάρτιο μέχρι και τον Ιούνιο. Το είδος είναι διαδεδομένο στην Κεντρική και Ανατολική Μεσόγειο, συμπεριλαμβανομένης της Κορσικής, της Σαρδηνίας (Falchi et al., 2009) και της Κρήτης (Demetzos et al., 2002b). Εντοπίζονται 3 υποείδη *C. creticus*. Εξ αυτών, το υποείδος *C. creticus* subsp. *corsicus*, περιορίζεται στα νησιά της Κορσικής και της Σαρδηνίας (Falchi et al., 2009). Περισσότεροι από είκοσι πέντε πληθυσμοί υποειδών *C. creticus* subsp. *creticus* (Εικόνα 9) ενδημούν στην ακτή της Κρήτης (Ελλάδα) (Demetzos et al., 2002b). Το υποείδος *C. creticus* subsp. *eriocephalus* (Εικόνα 8) βρίσκεται κυρίως στα νησιά της Κορσικής, στη Σαρδηνία (Falchi et al., 2009) και την Κρήτη (Chinou et al., 1994). Θεωρείται λοιπόν είδος που φύεται αποκλειστικά στην περιοχή της Μεσογείου.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, μελετήθηκε το φυτοχημικό προφίλ των ειδών *C. creticus* subsp. *creticus* και *C. creticus* subsp. *eriocephalus*. Το *C. creticus* subsp. *creticus* έχει i) πολύ δαντελωτό – κρασπεδωτό φύλλο, και ii) αδενώδεις τρίχες στην κάτω επιφάνεια των φύλλων, τα νεαρά κλαδιά, τους μίσχους των άνθων και τον κάλυκα. Ήδη από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι τα δύο υποείδη *C. creticus* subsp. *creticus* και *C. creticus* subsp. *eriocephalus* έχουν σημαντικές μορφολογικές διαφορές, καθώς τα φύλλα του πρώτου φέρουν μεγάλη πυκνότητα απλών ή πολυκυττάρων αδενωδών τριχών που καλύπτουν τα ανώτερα τμήματα των στελεχών του, γεγονός που το καθιστά έντονα κολλώδες και κατέπεκταση έναν αξιόλογο παραγωγό της ρητίνης λάδανο. (Paolini et al., 2009). Από την άλλη, το *C. creticus* subsp. *eriocephalus* φέρει πολλές μακριές προστατευτικές τρίχες στα σέπαλα του, οι οποίες καλύπτουν τις αστεροειδείς, όπως επίσης υπάρχουν πυκνές λευκές τρίχες που καλύπτουν τα στελέχη και τους ποδίσκους των ανθέων.

Η συλλογή του φυτικού υλικού (υπέργεια τμήματα του είδους *C. creticus* subsp. *creticus*) που χρησιμοποιήθηκε κατά τη μεταπτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στις 13

Ιουνίου 1998 στον όρμο Φόδελε της Κρήτης, ενώ συλλογή των υπεργείων τμημάτων του είδους *C. creticus* subsp. *eriocephalus* έλαβε χώρα στις 15 Μαΐου 1998 στην κεντρική Κρήτη, πλησίον του χωριού Ζαρός από τον Δρ. Ελευθέριο Καλπουτζάκη.

2.2.4 Λάδανο (ρητίνη)

Το *Cistus creticus* subsp. *creticus* και το *Cistus ladanifer* εκκρίνουν τη ρητίνη λάδανο (Εικόνα 10) (Maggi et al., 2016). Η ρητίνη συλλέγεται την στιγμή της υψηλότερης θερμοκρασίας της ημέρας με τη χρήση ειδικής τσουγκράνας με δερμάτινες άκρες, το λαδανηστήριο. Οι βοσκοί την συλλέγουν επίσης από τα γένια των κατσικιών καθώς προσκολλάται επάνω κατά την περιήγησή τους ανάμεσα στους θάμνους. Το λάδανο είναι ένα αρωματικό και πικρό κόμμι, χρώματος σκούρου καφέ. Χρησιμοποιείται στην παρασκευή αρωμάτων, παρασκευασμάτων με θεραπευτικές ιδιότητες ακόμη και με τη μορφή αφεψήματος.

Ιστορικά, αναφορές υπάρχουν από τον Διοσκουρίδη, τον Πλίνιο και τον Ηρόδοτο, οι οποίοι



αναφέρονται στον κίσθο από τον οποίο παράγεται το Λάδανο.

Εικόνα 10 Ρητίνη λάδανο, φωτογραφία: Ελευθέριος Καλπουτζάκης

Όσον αφορά την συλλογή του Λαδάνου περιγραφές υπάρχουν από τον Διοσκουρίδη, τον Tournefort, τον Bellonius και τον Μαρίτη. Σύμφωνα με τον Μαρίτη υπήρχε μεγάλη παραγωγή στην Κύπρο - 1763 - αλλά και την Κρήτη, ενώ οι εξαγωγές γινόντουσαν προς την Αλεξάνδρεια και στην συνέχεια στο Σουδάν. Η συλλογή γινόταν με όργανο ονομαζόμενο *ληονίστρα* (Εικόνα 11 Αριστερά). Στον Μεσαίωνα η συλλογή από την Κρητική Λαδανιά γινόταν με ένα είδος τσουγκράνας εφοδιασμένο με λωρίδες στις οποίες κολλούσε το Λάδανο και ακολουθούσε η συλλογή του για να κατεργασθεί (Εικόνα 11 Δεξιά). Η εργασία αυτή γινόταν τις μεσημβρινές ώρες γιατί τότε η ρητίνη βρισκόταν σε ημίρευστη μορφή και

ήταν δυνατή η συλλογή της. Σήμερα το Λάδανο συλλέγεται στην Ισπανία (*Cistus ladanifer* L.), την Κρήτη και την Κύπρο κυρίως από το είδος *Cistus creticus* L..



Εικόνα 11 Αριστερά: ληονίστρα, περιοχή Σίσες Κρήτης, φωτογραφία: <http://ladano.blogspot.com>; Δεξιά: Joseph Pitton de Tournefort, 1718 Γάλλος βοτανικός, Voyage du Levant

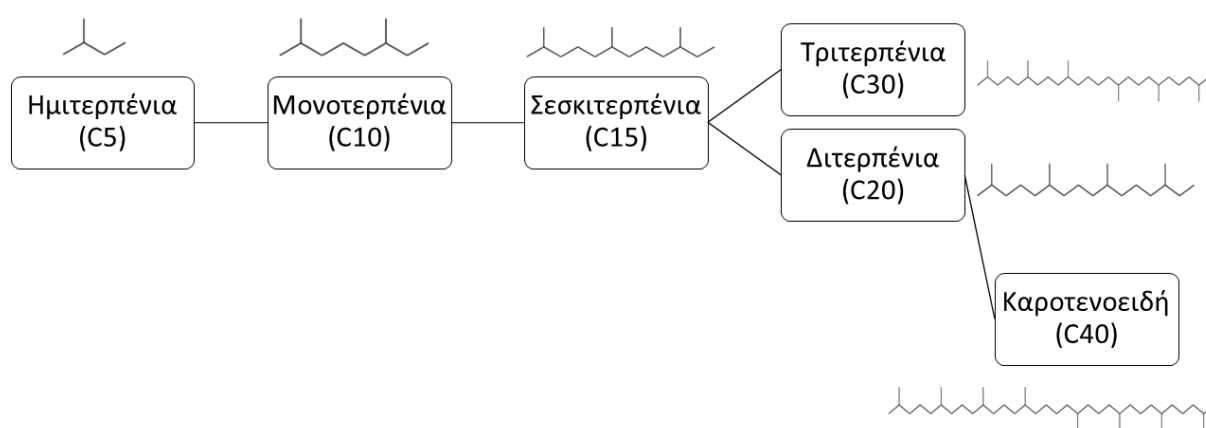
3. Δρογοχημεία – Δρογοφαρμακολογία

3.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες γένους *Cistus*

Μια μεγάλη ποικιλία δευτερογενών μεταβολιτών χαρακτηρίζει τα είδη *Cistus*. Συνολικά, έχει αναφερθεί ένα μεγάλο πλήθος χημικών ουσιών, εκ των οποίων η πλειονότητα είναι τερπένια (μονοτερπένια, σεσκιτερπένια και διτερπένια), ακολουθούν τα φαινυλοπροπανοειδή (φλαβονοειδή, φαινολικά παράγωγα και ταννίνες), οι υδρογονάνθρακες, τα λιπαρά οξέα, οι καρβονυλικές ενώσεις, οι φυτορμόνες και οι βιταμίνες. Ενώ το υπογένος *Cistus* είναι σχεδόν απαλλαγμένο από ελλαγιταννίνες και περιέχει κυρίως φλαβονοειδή, τα υπογένη *Leucocistus* και *Halimoides* είναι πλούσια σε ελλαγιταννίνες και περιέχουν μικρότερες ποσότητες φλαβονοειδών (Barrajón-Catalán et al., 2015).

3.1.1 Τερπενοειδή

Τα τερπένια είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που κυριαρχούν στη χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων πολλών φυτών. Πρόκειται για ενώσεις αποτελούμενες από ομάδες 5 ατόμων άνθρακα (C5 – ισοπρενική ομάδα), οι οποίες με ένα πλήθος συνδυασμών οδηγούν στα μονοτερπένια (10 ατόμων άνθρακα), στα σεσκιτερπένια (15 ατόμων άνθρακα), στα διτερπένια (20 ατόμων άνθρακα), στα τριτερπένια (30 ατόμων άνθρακα) και στα καροτενοειδή (40 ατόμων άνθρακα) (Εικόνα 12).



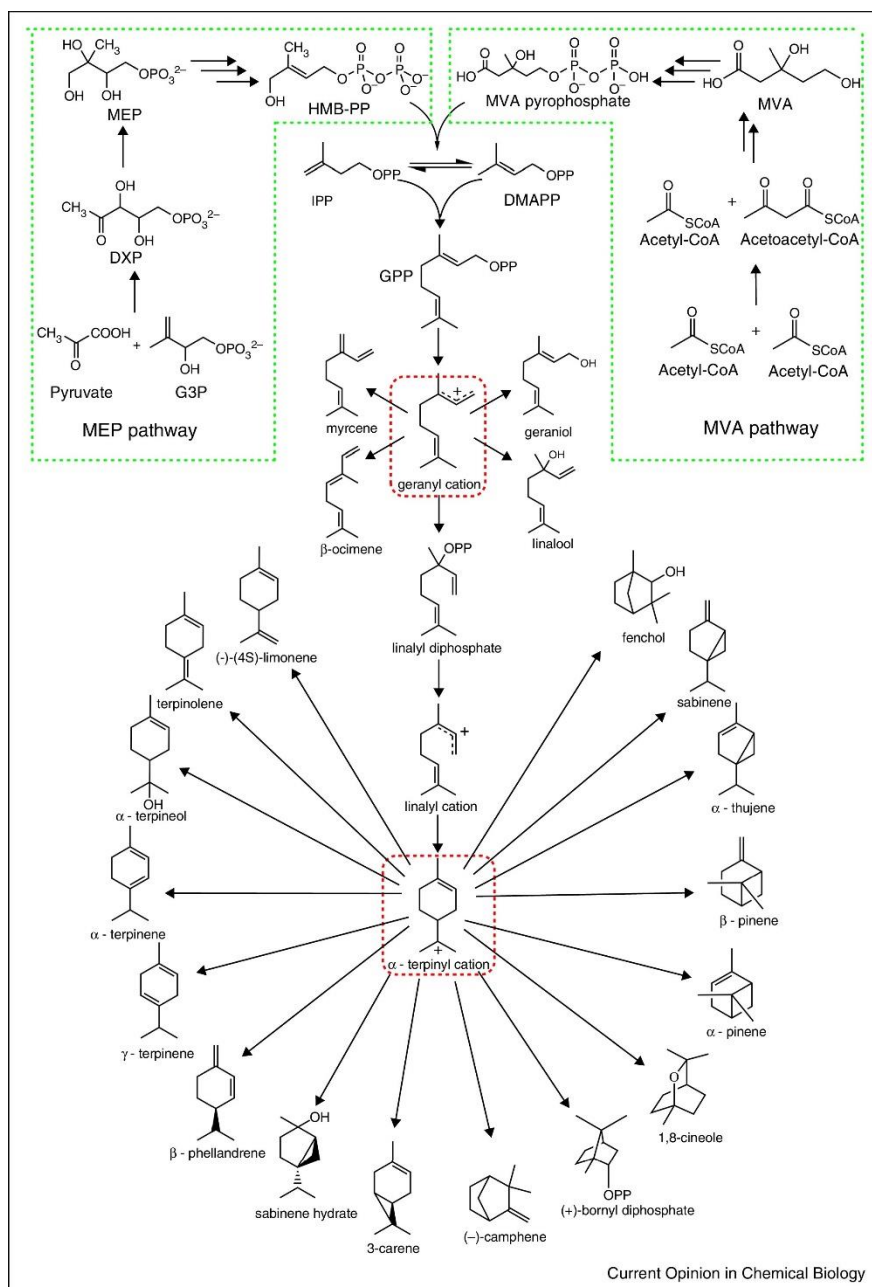
Εικόνα 12 Μονοπάτι σύνθεσης βασικών σκελετών τερπενίων. Φωτογραφία: Τροποποίηση από https://www.tcichemicals.com/eshop/de/de/category_index/10872/

Τα φύλλα ορισμένων ειδών *Cistus* καλύπτονται από αδένες που εκκρίνουν αιθέρια έλαια και ρητίνη. Η ρητίνη αυτή, στην επιφάνεια των φύλλων και των στελεχών, αποτελείται

κυρίως από τερπενοειδή, όπως και το αιθέριο έλαιο των φυτών αυτών. Πιο συγκεκριμένα, ένα πλήθος μονοτερπενίων, οξυγονωμένων μονοτερπενίων, σесκίτερπενίων και οξυγονωμένων σесκίτερπενίων χαρακτηρίζουν το λάδανο (D. Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002a; Robles and Garzino, 2000). Η περιεκτικότητα των μεταβολιτών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως οι ημερήσιες, εποχιακές και περιβαλλοντικές συνθήκες, η ξηρασία, η θερμοκρασία, η ηλικία των φυτών και οι βροχοπτώσεις. Επίσης, ανάλογα με τον τύπο των τριχωμάτων που περιέχουν, άλλα είδη *Cistus* μπορούν να είναι παράγουν μονοτερπένια και σесκίτερπένια, ενώ άλλα διτερπένια και κλεροδάνια.

3.1.1.1 Μονοτερπένια

Όπως αναφέρθηκε ήδη, τα μονοτερπένια αποτελούνται από το συνδυασμό 2 ισοπρενικών ομάδων (συνολικά 10 άτομα άνθρακα). Η βιοσύνθεση όλων των τερπενίων και κατ' επέκταση και των μονοτερπενίων, εξαρτάται από τις δύο πρόδρομες ομάδες ισοπρενίου, το πυροφωσφορικό ισοπεντενίλιο (IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP), τα οποία συντίθενται είτε μέσω του μονοπατιού της 4 – φωσφομεθυλερυθριτόλης (MEP), ή του μεβαλονικού οξέος (MvA). Ο γενικός πρόδρομος των μονοτερπενίων είναι το πυροφωσφορικό γερανύλιο (GPP), συνδυάζοντας δύο μονάδες C₅, και το οποίο στη συνέχεια υπόκεινται σε περαιτέρω αντιδράσεις με συνθετάσες / κυκλάσες μονοτερπενίου (mTS / C) για την παραγωγή μιας μεγάλης σειράς χημικών δομών (Εικόνα 13)(Zebec et al., 2016).



Εικόνα 13 Μια επισκόπηση των οδών παραγωγής μονοτερπενίου / μονοτερπενοειδούς (Zebec et al., 2016).

Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται τα μονοτερπένια που απαντώνται πιο συχνά στα είδη του γένους *Cistus* (Πίνακας 1). Ανάλογα με το είδος, το πινένιο, η βορνεόλη, η κάμφορα και η καρβακρόλη είναι οι πιο άφθονες και συνηθισμένες ενώσεις παρούσες στα αιθέρια έλαια των φυτών *Cistus* (Barrajoń-Catalán et al., 2015).

Πίνακας 1 Μονοτερπένια ειδών *Cistus*

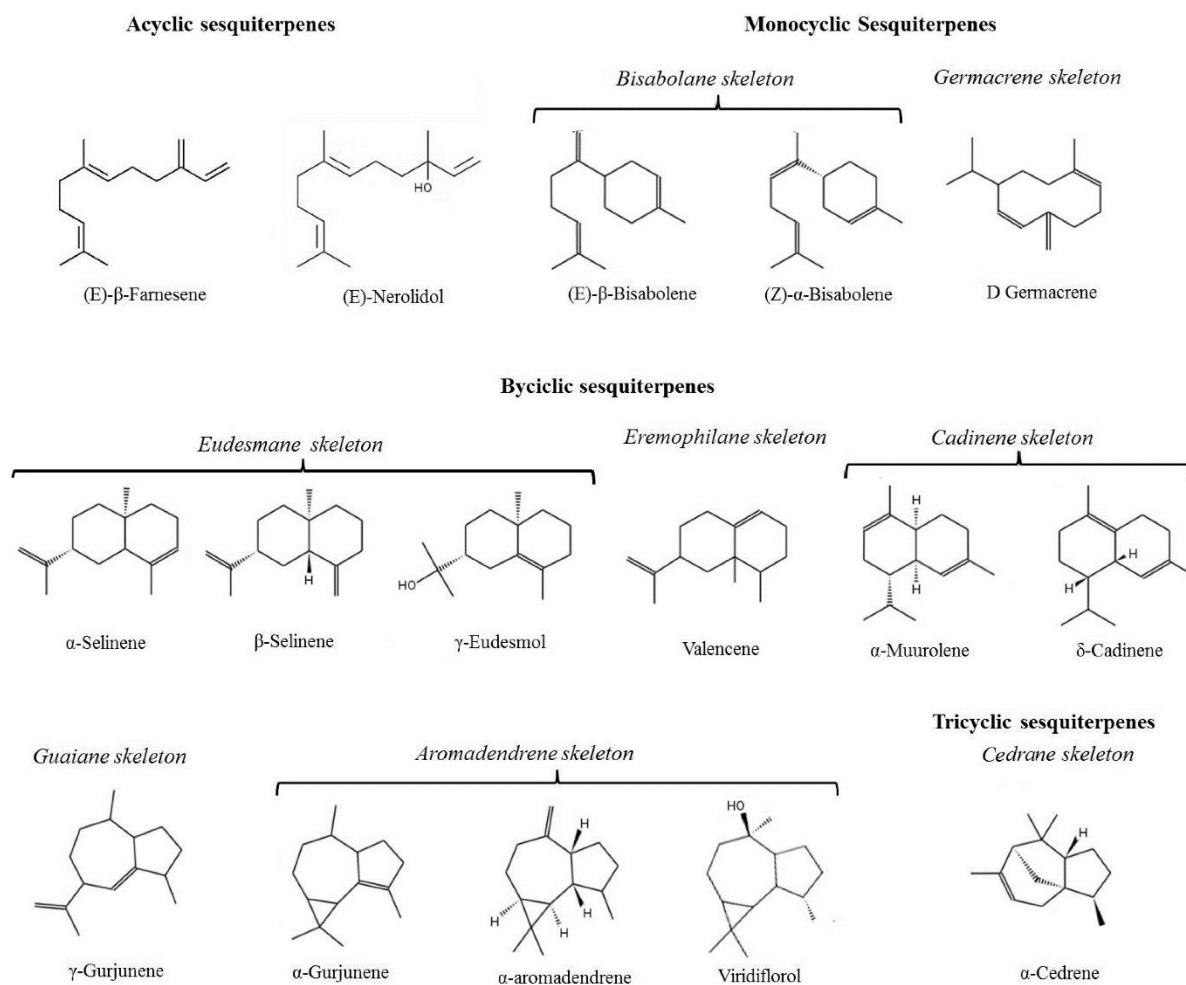
Μονοτερπένιο	Είδος <i>Cistus</i>	Αναφορά
α-pinene	<i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. ladanifer</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(Llusià et al., 2010; Paolini et al., 2009) (Rivoal et al., 2010) (Robles et al., 2003) (Loizzo et al., 2013) (Fanouriou et al., 2018) (Ormeño et al., 2007) (Teixeira et al., 2007)
β-pinene	<i>C. libanotis</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. ladanifer</i> , <i>C. albidus</i>	(Loizzo et al., 2013) (Fanouriou et al., 2018) (Rivoal et al., 2010) (Robles et al., 2003) (Ormeño et al., 2007)
camphene	<i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. ladanifer</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(Paolini et al., 2009; Rivoal et al., 2010) (Robles et al., 2003) (Loizzo et al., 2013) (Fanouriou et al., 2018)
limonene	<i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. ladanifer</i>	(Paolini et al., 2009; Rivoal et al., 2010) (Loizzo et al., 2013) (Fanouriou et al., 2018) (Robles et al., 2003)
linalool	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. ladanifer</i>	(Loizzo et al., 2013) (Ormeño et al., 2007) (Teixeira et al., 2007)
cis-linalool oxide	<i>C. albidus</i>	(Ormeño et al., 2007)
α-terpinene	<i>C. libanotis</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. ladanifer</i>	(Loizzo et al., 2013) (Rivoal et al., 2010) (Robles et al., 2003)
γ-terpinene	<i>C. creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. ladanifer</i>	(Demetzos et al., 2002a; Paolini et al., 2009) (Loizzo et al., 2013) (Robles et al., 2003)
p-cymene	<i>C. creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. ladanifer</i>	(Demetzos et al., 2002a; Paolini et al., 2009) (Loizzo et al., 2013) (Rivoal et al., 2010) (Robles et al., 2003)
camphor	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002b; Rivoal et al., 2010) (Loizzo et al., 2013)
terpinen-4-ol	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. ladanifer</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002b, 2002a) (Loizzo et al., 2013) (Demetzos et al., 1995) (Robles et al., 2003)
α-terpineol	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. ladanifer</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001; Rivoal et al., 2010) (Loizzo et al., 2013) (Teixeira et al., 2007)
thymol	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002b)
carvacrol	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. monspeliensis</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002b, 2002a) (Ben-Jemia et al., 2013b) (Loizzo et al., 2013)

trans-pinocarveol	<i>C. creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	(Demetzos et al., 2002a; Paolini et al., 2009)
neryl acetone	<i>C. parviflorus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)
neo-iso-menthol	<i>C. parviflorus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)
β-cyclocitral	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(Paolini et al., 2009)(Loizzo et al., 2013)(Maggi et al., 2016)
borneol	<i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. ladanifer</i> , <i>C. laurifolius</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	(Paolini et al., 2009; Rivoal et al., 2010)(Robles et al., 2003)(Ögütveren and Tetik, 2004)(Loizzo et al., 2013)(Demetzos et al., 1995)(Teixeira et al., 2007)
bornyl acetate	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. ladanifer</i>	(Loizzo et al., 2013)(Demetzos et al., 1995)(Rivoal et al., 2010)(Teixeira et al., 2007)
safranal	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	(Paolini et al., 2009)(Loizzo et al., 2013)
3-karene	<i>C. albidus</i>	(Rivoal et al., 2010)
α-thujene	<i>C. albidus</i>	(Rivoal et al., 2010)
myrcene	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. monspeliensis</i>	(Paolini et al., 2009)(Rivoal et al., 2010)
tricyclene	<i>C. libanotis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. ladanifer</i>	(Loizzo et al., 2013)(Robles et al., 2003)
sylvestrene	<i>C. libanotis</i>	(Loizzo et al., 2013)
α-phellandrene	<i>C. libanotis</i> , <i>C. monspeliensis</i>	(Loizzo et al., 2013)(Rivoal et al., 2010)
terpinolene	<i>C. libanotis</i>	(Loizzo et al., 2013)
1,8-Cineole	<i>C. libanotis</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. ladanifer</i>	(Loizzo et al., 2013)(Rivoal et al., 2010)(Robles et al., 2003)
trans-p-Menth-2-en-1-ol	<i>C. salviifolius</i>	(Loizzo et al., 2013)
chrysanthenone	<i>C. salviifolius</i>	(Loizzo et al., 2013)
pinocarvone	<i>C. libanotis</i>	(Loizzo et al., 2013)
myrtenol	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i>	(Loizzo et al., 2013)
α-terpenyl acetate	<i>C. libanotis</i>	(Loizzo et al., 2013)
trans-α-ambrinol	<i>C. parviflorus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)
cis-α-ambrinol	<i>C. parviflorus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)
geranyl acetone	<i>C. parviflorus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)
β-thujaplicinol	<i>C. parviflorus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)

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

3.1.1.2 Σεσκιτερπένια

Τα σεσκιτερπένια και τα οξυγονωμένα σεσκιτερπένια είναι ισοπρενοειδείς ενώσεις που απαντώνται σε υψηλά ποσοστά στη σύσταση του αιθέριου ελαίου των ειδών *Cistus*. Πρόκειται για φυσικά πτητικά προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών, τα οποία συμμετέχουν σε πολλές αλληλεπιδράσεις τους με άλλα φυτά, έντομα και παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα σεσκιτερπένια παρουσιάζουν εντυπωσιακή δομική ποικιλία και στερεοχημική πολυπλοκότητα (Εικόνα 14) και προέρχονται βιοσυνθετικά από το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP) μέσω της δράσης ενζύμων (συνθετάσες, κυκλάσες).



Εικόνα 14 Βασικοί σκελετοί σεσκιτερπενίων (Cincotta et al., 2015)

Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται τα πιο κοινά σεσκιτερπένια των φυτών *Cistus* (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 Σεσκιτερπένια των ειδών *Cistus*

Σεσκιτερπένιο	Είδος <i>Cistus</i>	Αναφορά
α-cadinol bicyclic	<i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. parviflorus</i>	(Paolini et al., 2009; Robles and Garzino, 2000)(Loizzo et al., 2013)(D. Angelopoulou et al., 2001)(Maccioni et al., 2007)(Robles and Garzino, 1998)
β-Cadinol	<i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	(Loizzo et al., 2013)(Paolini et al., 2009)
α-cubebene	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(Paolini et al., 2009)(Loizzo et al., 2013)(Demetzos et al., 1995)
cubenol	<i>C. parviflorus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)
α-copaene tricyclic	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(Paolini et al., 2009)(Loizzo et al., 2013)(Llusià et al., 2010)(Maccioni et al., 2007)(Demetzos et al., 1995)(Fanouriou et al., 2018)(Maggi et al., 2016)
α-elemene	<i>C. libanotis</i>	(Loizzo et al., 2013)
α-gurjunene	<i>C. libanotis</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. parviflorus</i>	(Loizzo et al., 2013)(D. Angelopoulou et al., 2001)
<i>trans</i> -α-Bergamotene	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. albidus</i>	(Loizzo et al., 2013)(Llusià et al., 2010)
(<i>E</i>)-β-Farnesene	<i>C. salviifolius</i>	(Loizzo et al., 2013)(Fanouriou et al., 2018)
α-Humulene	<i>C. libanotis</i> , <i>C. parviflorus</i> , <i>C. albidus</i>	(Loizzo et al., 2013)(D. Angelopoulou et al., 2001)(Maccioni et al., 2007)(Robles and Garzino, 1998)
Drima-7,9(11)-diene	<i>C. monspeliensis</i>	(Loizzo et al., 2013)
β-Chamigrene	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(Loizzo et al., 2013)
αr-Curcumene	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. albidus</i>	(Loizzo et al., 2013)(Llusià et al., 2010)(Maccioni et al., 2007)(Robles and Garzino, 1998)(Ormeño et al., 2007)
alloaromadendrene tricyclic	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. libanotis</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002b; Paolini et al., 2009)(Loizzo et al., 2013)(Llusià et al., 2010)(Maccioni et al., 2007)(Robles and Garzino, 1998)(Ormeño et al., 2007)
α-Amorphene	<i>C. libanotis</i>	(Loizzo et al., 2013)
β-selinene	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C.</i>	(Paolini et al., 2009)(Demetzos et al., 1995)

	<i>creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	
α -Muurolene	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. albidus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)(Loizzo et al., 2013)(Maccioni et al., 2007)
γ -Muurolene	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i>	(Loizzo et al., 2013)
Isoledene	<i>C. libanotis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	(Loizzo et al., 2013)
cadalene	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 1995)
γ -Cadinene	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. albidus</i>	(Loizzo et al., 2013)(Maccioni et al., 2007)
δ -Cadinene	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. albidus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001; Paolini et al., 2009)(Loizzo et al., 2013)(Maccioni et al., 2007)(Demetzos et al., 1995)(Fanouriou et al., 2018)(Maggi et al., 2016)(Robles and Garzino, 1998)
1S- <i>cis</i> -Calamenene	<i>C. libanotis</i>	(Loizzo et al., 2013)
Cadina-1,4-diene	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(Paolini et al., 2009)(Maggi et al., 2016)
α -cadinene	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002a)(Demetzos et al., 1995)
α -calacorene	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. parviflorus</i>	(Loizzo et al., 2013)(D. Angelopoulou et al., 2001)
α -cedrene	<i>C. albidus</i>	(Llusià et al., 2010)
β -caryophyllene	<i>C. monspeliensis</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	(Rivoal et al., 2010; Robles and Garzino, 2000)(Loizzo et al., 2013)(D. Angelopoulou et al., 2001)(Llusià et al., 2010)(Maccioni et al., 2007)(Robles and Garzino, 1998)
caryophyllene oxide	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. parviflorus</i> , <i>C. albidus</i>	(Loizzo et al., 2013)(D. Angelopoulou et al., 2001)(Maccioni et al., 2007)(Ormeño et al., 2007)
14-Hydroxy- β -caryophyllene	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. parviflorus</i>	(Loizzo et al., 2013)(D. Angelopoulou et al., 2001)
caryophyllenol II	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i>	(Loizzo et al., 2013)
caryophylla-3,8(13)-dien-5 β -ol	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	(Loizzo et al., 2013)
spathulenol	<i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. parviflorus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001; Paolini et al., 2009; Robles and Garzino, 2000)(Loizzo et al., 2013)(Maccioni et al., 2007)(Demetzos et al., 1995)(Fanouriou et al., 2018)

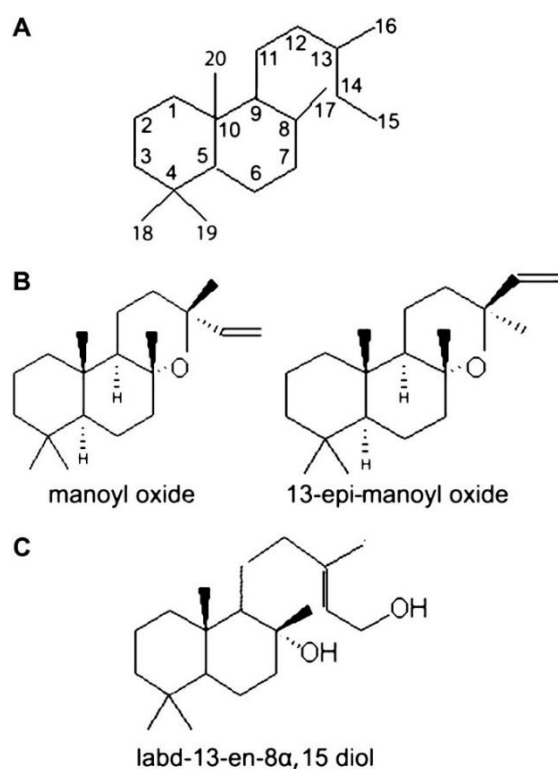
globulol	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. parviflorus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001; Paolini et al., 2009)(Loizzo et al., 2013)
viridiflorol	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. ladanifer</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 2002a; Paolini et al., 2009)(Robles et al., 2003)(Loizzo et al., 2013)(Demetzos et al., 1995)
ledol	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. ladanifer</i>	(Paolini et al., 2009)(Loizzo et al., 2013)(Demetzos et al., 1995)(Robles et al., 2003)
cubenol	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(Paolini et al., 2009)(Loizzo et al., 2013)
selin-11-en-4 α -ol	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. creticus</i>	(Demetzos et al., 2002a; Paolini et al., 2009)
β -eudesmol	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i> , <i>C. creticus</i> , <i>C. parviflorus</i>	(Demetzos et al., 2002a; Paolini et al., 2009)(D. Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 1995)
γ -eudesmol	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. albidus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)(Maccioni et al., 2007)
germacrene D	<i>C. albidus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i>	(Llusià et al., 2010)(Loizzo et al., 2013)(Maccioni et al., 2007)(Fanouriou et al., 2018)(Maggi et al., 2016)(Ormeño et al., 2007)
α -zingiberene	<i>C. albidus</i>	(Maccioni et al., 2007)(Robles and Garzino, 1998)(Ormeño et al., 2007)
β -bourbonene	<i>C. albidus</i>	(Maccioni et al., 2007)(Robles and Garzino, 1998)(Ormeño et al., 2007)
germacrene B	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i> , <i>C. albidus</i>	(Loizzo et al., 2013)(Llusià et al., 2010)
bicyclogermacrene	<i>C. salviifolius</i>	(Fanouriou et al., 2018)
β -burjunene	<i>C. monspeliensis</i> , <i>C. albidus</i>	(Loizzo et al., 2013)(Maccioni et al., 2007)
(Z)-Nerolidol	<i>C. salviifolius</i>	(Loizzo et al., 2013)
cis- α -Copaen-8-ol	<i>C. salviifolius</i>	(Loizzo et al., 2013)
(E)-Nerolidol	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(Loizzo et al., 2013)
guaiene	<i>C. parviflorus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)
guaiol	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. albidus</i>	(Loizzo et al., 2013)(Maccioni et al., 2007)
widdrol	<i>C. libanotis</i> , <i>C. monspeliensis</i>	(Loizzo et al., 2013)
humulene oxide	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. parviflorus</i>	(Loizzo et al., 2013)(D. Angelopoulou et al., 2001)
epi-cedrol	<i>C. parviflorus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)

caryophylladienol II	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(Loizzo et al., 2013)
t-Cadinol	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. albidus</i>	(Loizzo et al., 2013) (Maccioni et al., 2007)
1,10-di- <i>epi</i> -cubenol	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001) (Maccioni et al., 2007) (Maggi et al., 2016)
1- <i>epi</i> -cubenol	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001) (Maggi et al., 2016)
t-Muurolol	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. monspeliensis</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(Loizzo et al., 2013) (Maccioni et al., 2007) (Maggi et al., 2016) (Robles and Garzino, 1998)
torreyol	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. libanotis</i>	(Loizzo et al., 2013)
valerenol	<i>C. libanotis</i>	(Loizzo et al., 2013)
valerianol	<i>C. albidus</i>	(Maccioni et al., 2007)
vulgarol B	<i>C. salviifolius</i>	(Loizzo et al., 2013)
(<i>Z</i>)- α - <i>trans</i> -Bergamotol	<i>C. monspeliensis</i>	(Loizzo et al., 2013)
(<i>E</i>)-Nuciferol	<i>C. salviifolius</i>	(Loizzo et al., 2013)
(<i>E,Z</i>)-Farnesol	<i>C. salviifolius</i>	(Loizzo et al., 2013)
khusinol	<i>C. parviflorus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)
α -Cyperone	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(Loizzo et al., 2013)
α -Sinensal	<i>C. salviifolius</i>	(Loizzo et al., 2013)
(<i>E</i>)- α -Atlantone	<i>C. salviifolius</i>	(Loizzo et al., 2013)
nootkatone	<i>C. salviifolius</i>	(Loizzo et al., 2013)
elemol	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. albidus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001) (Maccioni et al., 2007) (Fanouriou et al., 2018) (Robles and Garzino, 1998)
elemol acetate	<i>C. salviifolius</i>	(Fanouriou et al., 2018)
longiborneol	<i>C. parviflorus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)

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

3.1.1.3 Λαβδανικού τύπου διτερπένια

Ένας πολύ μεγάλος αριθμός διτερπενίων που έχουν σκελετό λαβδανίου, εμφανίζονται στη φύση. Το ενδιαφέρον για τη μελέτη τους οφείλεται κυρίως στο ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν οι ενώσεις αυτές. Τα διτερπένια τύπου λαβδανίου περιλαμβάνουν ένα σύστημα δεκαλίνης και έναν δακτύλιο αποτελούμενο από 6 άνθρακες, ο οποίος μπορεί να είναι ανοικτός ή κλειστός με ένα άτομο οξυγόνου, όπως στην περίπτωση του manoyl oxide και των παραγώγων του (Εικόνα 15) (Demetzos and Dimas, 2001).



Εικόνα 15 Βασικός σκελετός τερπενίων τύπου λαβδανίου, manoyl oxide, 13-epi-manoyl oxide και labd-13-en-8α,15 diol (Falara et al., 2010).

Ειδικά για τα διτερπένια λαβδανικού τύπου των φυτών *Cistus* έχουν γίνει πολυάριθμες μελέτες για την απομόνωση και τη ταυτοποίησή τους καθώς εμφανίζουν διάφορες βιολογικές ιδιότητες όπως ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά των παθογόνων βακτηριδίων και μυκήτων και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Güvenç et al., 2005). Τα φύλλα και οι μίσχοι των ειδών *Cistus* που διαθέτουν αδενικά τριχώματα και επομένως εκκρίνουν ρητίνη, είναι πλούσια σε διτερπένια τύπου λαβδανίου κυρίως κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι τα διτερπένια τύπου λαβδανίου υπάρχουν σε αφθονία στα εκχυλίσματα των βλαστών, αλλά απουσιάζουν από τα εκχυλίσματα της ρίζας.

Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται τα πιο κοινώς απαντώμενα διτερπένια λαβδανικού τύπου στα φυτά του γένους *Cistus* (Πίνακας 3).

Πίνακας 3 Διτερπένια τύπου λαβδανίου των φυτών του είδους *Cistus*

Λαβδανικού τύπου διτερπένιο	Είδος <i>Cistus</i>	Αναφορά
manoyl oxide	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. parviflorus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	(Anastasaki et al., 1999; Papaefthimiou et al., 2014b)(Demetzos et al., 1995)(D. Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 2002b)(Paolini et al., 2009)
13- <i>epi</i> -manoyl oxide	<i>C. albidus</i> , <i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. parviflorus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	(Paolini et al., 2009)(Papaefthimiou et al., 2014b)(Anastasaki et al., 1999)(Falara et al., 2010)(Demetzos et al., 1995)(Demetzos et al., 2002b)
13- <i>epi</i> -manool	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 2002b)
manool	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	(Demetzos et al., 1995)(Demetzos et al., 2002b)(Paolini et al., 2009)
7 α -hydroxy manool	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(Dimitra Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 2002b)
3 β -hydroxy manool	<i>C. parviflorus</i>	
3 β -acetoxy-manoyl oxide	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 2002b)
labd-14-ene-8,13-diol	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	(Demetzos et al., 1990)
labd-13-en-8-ol	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(Demetzos et al., 1995)
labd-13-en-8 α -ol-15-yl acetate	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. parviflorus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(Falara et al., 2010)(Demetzos et al., 1995)(Anastasaki et al., 1999)(D. Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 2002b)
8,13- <i>epoxy</i> -labd-14-ene	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	(Demetzos et al., 1990)
8,13- <i>epoxy</i> -15,16-dinorlabd-12-ene	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	(Falara et al., 2010)
3 β -hydroxy-13- <i>epi</i> -manoyl oxide	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. parviflorus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(Falara et al., 2010)(Anastasaki et al., 1999)(D. Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 2002b)
2-keto-manoyl oxide	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 2002b)
2-keto-13- <i>epi</i> -manoyl oxide	<i>C. parviflorus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 2002b)
<i>ent</i> -13- <i>epi</i> -manoyl oxide	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(Anastasaki et al., 1999)(D. Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 2002b)(Fokialakis et al., 2006)
<i>ent</i> -manoyl oxide	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> , <i>C. parviflorus</i> , <i>C. salviifolius</i>	(Anastasaki et al., 1999)(D. Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 2002b)(Fokialakis et al., 2006)
<i>ent</i> -8- <i>epi</i> -manoyl oxide	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp.	(Anastasaki et al., 1999)(D. Angelopoulou et al.,

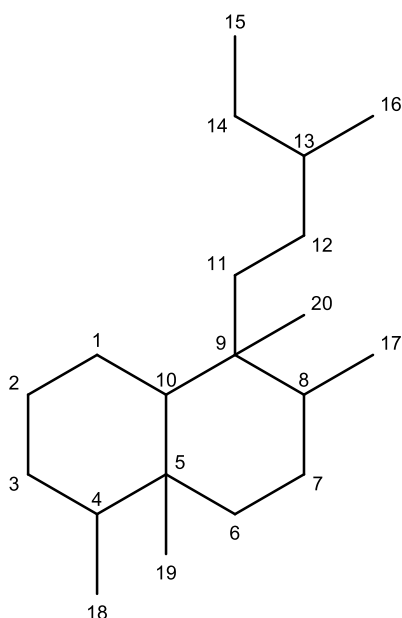
	<i>eriocephalus, C. parviflorus, C. salviifolius</i>	2001)(Demetzos et al., 2002b)
<i>ent-3β-acetoxy-13-epi-manoyl-oxide</i>	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(Anastasaki et al., 1999)(Fokialakis et al., 2006)
<i>3β-acetoxy-8,13-diepi-manoyl oxide</i>	<i>C. parviflorus</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)
<i>3β-acetoxy-13-epi-manoyl oxide</i>	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus, C. parviflorus, C. salviifolius</i>	(Anastasaki et al., 1999)(D. Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 2002b)
<i>labd-7,13-dien-15-ol</i>	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus, C. salviifolius, C. parviflorus</i>	(Falara et al., 2010)(Anastasaki et al., 1999)(Demetzos et al., 1990)(Demetzos et al., 2002b)(D. Angelopoulou et al., 2001)
<i>labd-7,14-dien-13-ol</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	(Paolini et al., 2009)
<i>labd-7,13-dien-15-yl acetate</i>	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	(Falara et al., 2010)(Anastasaki et al., 1999)(Demetzos et al., 1990)
<i>3β-acetyl-13-epi-manoyl oxide</i>	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	(Falara et al., 2010)
<i>labd-13-en-8α,15-diol</i>	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i> , <i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus, C. salviifolius</i>	(Falara et al., 2010)(Anastasaki et al., 1999)(Demetzos et al., 1990)(Demetzos et al., 2002b)
<i>6-acetoxy-7-oxo-8-labden-15-oic acid</i>	<i>C. ladanifer</i>	(Alías et al., 2012)
<i>7-oxo-8-labden-15-oic acid</i>	<i>C. ladanifer</i>	(Alías et al., 2012)
<i>13-Oxo-15,16-bis-nor-ent-labd-7(8)-ene</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	(Paolini et al., 2009)
<i>methyl labd-8(17)-en-15-oate</i>	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	(Demetzos et al., 1995)
<i>13-epi-sclareol</i>	<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus, C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	(Demetzos et al., 1990)(Paolini et al., 2009)
<i>15,16-dinorlabd-8(20)-en-13-one</i>	<i>C. parviflorus, C. salviifolius</i>	(D. Angelopoulou et al., 2001)(Demetzos et al., 2002b)
<i>Labda-7,12(E),14-triene</i>	<i>C. creticus</i> subsp. <i>corsicus</i>	(Paolini et al., 2009)
<i>8-Hydroxylabdan-15-oic acid</i>	<i>C. monspeliensis</i>	(Venditti et al., 2014)

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

3.1.1.4 Κλεροδάνια

Τα διτερπένια τύπου κλεροδανίου είναι μια ευρέως διαδεδομένη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών και έχουν βρεθεί σε πολλά είδη φυτών από διάφορες οικογένειες και σε οργανισμούς από άλλες ταξινομικές ομάδες. Αυτές οι ουσίες έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω των αξιοσημείωτων βιολογικών ιδιοτήτων τους.

Τα κλεροδάνια είναι δικυκλικά διτερπένια. Ο βασικός σκελετός τους αποτελείται από δύο βασικά τμήματα: ένα δακτύλιο δεκαλίνης (C-1 - C-10) και μια πλευρική αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα στον C-9 (C-11 - C-16, με τον C-16 ενωμένο με τον C-13, δηλ. ένα 3-μεθυλοπεντύλιο). Οι υπόλοιποι τέσσερις άνθρακες (C-17 - C-20) συνδέονται στους άνθρακες C-8, C-4, C-5 και C-9 αντίστοιχα στο δακτύλιο δεκαλίνης (Εικόνα 16).



Εικόνα 16 Βασικός σκελετός κλεροδανίων

Ο ρόλος των κλεροδανίων στα φυτά σχετίζεται με τη χημική άμυνα κατά των φυτοφάγων ζώων ή των παρασίτων. Επίσης, διτερπένια τύπου κλεροδανίου εμφανίζουν διάφορες φαρμακολογικές ιδιότητες ωφέλιμες για τον άνθρωπο, όπως είναι οι αντιελκωτικές, κυτταροτοξικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιπαρασιτικές και αντιβακτηριακές δράσεις, ενώ έχουν αναφερθεί ως προσδέτες στους υποδοχείς οπιοειδών (Li et al., 2016).

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4) συνοψίζονται τα διτερπένια τύπου κλεροδανίου που έχουν απομονωθεί από τα διάφορα είδη *Cistus*.

Πίνακας 4 Κληροδάνια φυτών είδους *Cistus*

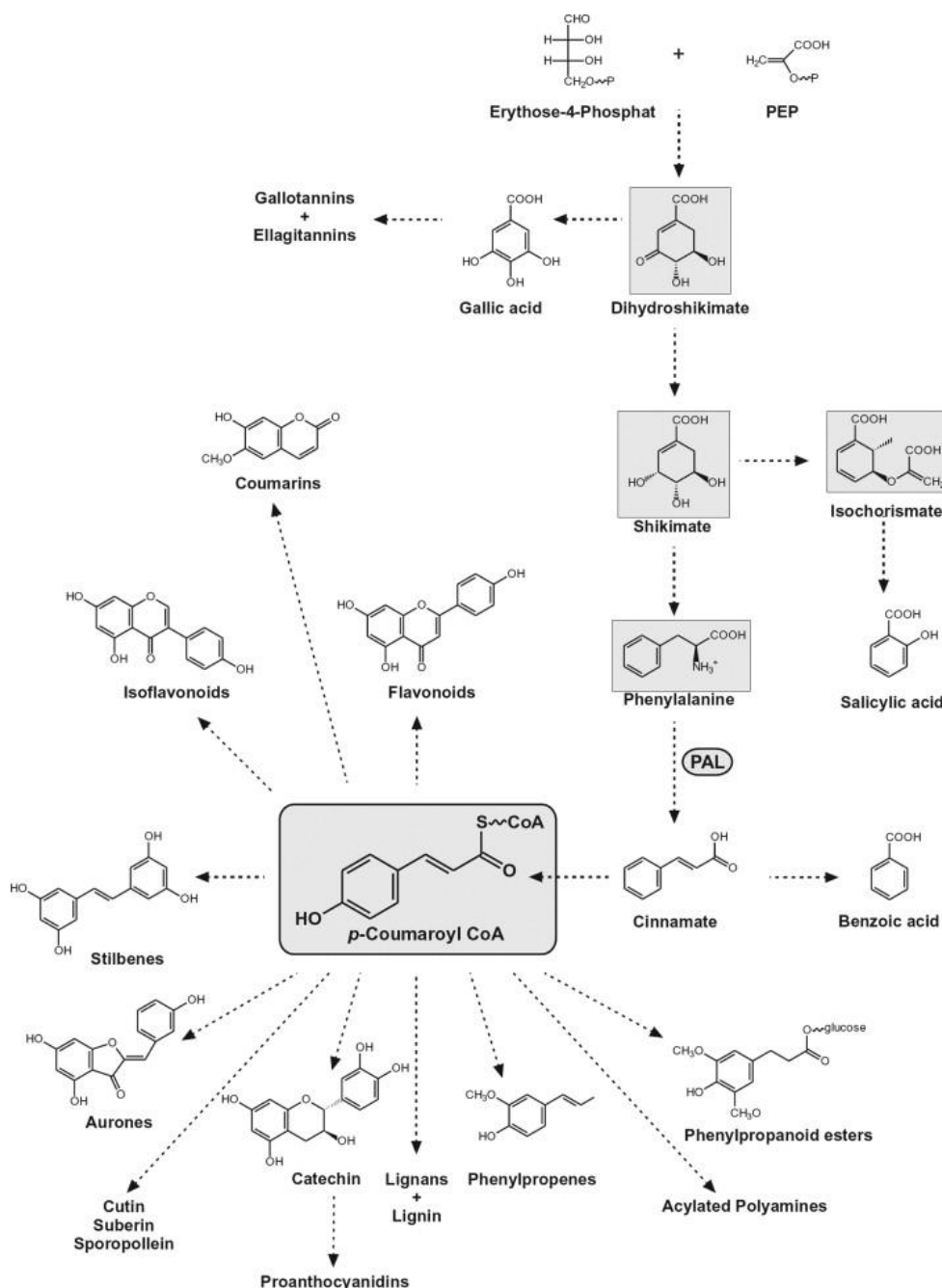
Κληροδάνιο	Είδος <i>Cistus</i>	Αναφορά
15,18-dihydroxy- <i>cis</i> -clerod-3-ene (cistadiol)	<i>C. monspeliensis</i>	(Fokialakis et al., 2006)(Kalpoutzakis et al., 2003)
15,18-di- acetox- <i>cis</i> -clerod-3-ene	<i>C. monspeliensis</i>	(Fokialakis et al., 2006)(Kalpoutzakis et al., 2003)
15-acetox- <i>cis</i> -clerod-3-en-18- ol	<i>C. monspeliensis</i>	(Fokialakis et al., 2006)(Kalpoutzakis et al., 2003)
18-hydroxy- <i>cis</i> -clerod-3-en-15-oic acid	<i>C. monspeliensis</i>	(Fokialakis et al., 2006)(Kalpoutzakis et al., 2003)
15-hydroxy- <i>cis</i> -clerodan-3-ene-18- al	<i>C. monspeliensis</i>	(Venditti et al., 2014)(Kalpoutzakis et al., 2003)
15-hy-droxy- <i>cis</i> -clerod-3-en-18-oic acid	<i>C. monspeliensis</i>	(Fokialakis et al., 2006)(Kalpoutzakis et al., 2003)(Venditti et al., 2014)
18-acetox- <i>cis</i> -clerod-3-en-15-oic acid	<i>C. monspeliensis</i>	(Fokialakis et al., 2006)(Venditti et al., 2014)(Kalpoutzakis et al., 2003)
18-Acetox-3-ene- <i>cis</i> -clerodan-15- ol	<i>C. monspeliensis</i>	(Kalpoutzakis et al., 2003)
15-acetox- <i>cis</i> -clerod-3-en-18-oic acid	<i>C. monspeliensis</i>	(Fokialakis et al., 2006)(Kalpoutzakis et al., 2003)
15-acetox- <i>cis</i> -clerod-3-en-18-al	<i>C. monspeliensis</i>	(Fokialakis et al., 2006)(Venditti et al., 2014)(Kalpoutzakis et al., 2003)
15-hydroxy- <i>cis</i> -clerod-3-en-18-al	<i>C. monspeliensis</i>	(Fokialakis et al., 2006)
<i>cis</i> -clerod-3-en-15-oic acid (<i>epi</i> -populifolic acid)	<i>C. monspeliensis</i>	(Fokialakis et al., 2006)(Kalpoutzakis et al., 2003)
methyl 2α-acetox-3- <i>neo</i> -cleroden-15-oate	<i>C. populifolius</i>	(G. Urones et al., 1994)
4β-epoxy- <i>neo</i> -clerodan-15-oate	<i>C. populifolius</i>	(G. Urones et al., 1994)
methyl 4α-hydroxy- <i>neo</i> -clerodan-15-oate	<i>C. populifolius</i>	(G. Urones et al., 1994)
methyl 3α,4β-dihydroxy- <i>neo</i> -clerodan-15-oate	<i>C. populifolius</i>	(G. Urones et al., 1994)
methyl 2α,3β-dihydroxy-4(18)- <i>neo</i> -cleroden-15-oate	<i>C. populifolius</i>	(G. Urones et al., 1994)
methyl 2α,3β,4β-trihydroxy- <i>neo</i> -clerodan-15-oate	<i>C. populifolius</i>	(G. Urones et al., 1994)
(+)-19-acetox- <i>cis</i> -clerodan-3-ene-15-oic acid	<i>C. monspeliensis</i>	(Demetzos et al., 2001)

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

3.1.2 Φαινυλοπροπανοειδή

Τα φαινυλοπροπανοειδή είναι μια πολυπληθής ομάδα οργανικών ενώσεων που συντίθενται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη. Το όνομά τους προέρχεται από την αρωματική φαινυλική ομάδα και την παρουσία τριών ανθράκων του κουμαρικού οξέος, που είναι το κεντρικό ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση των

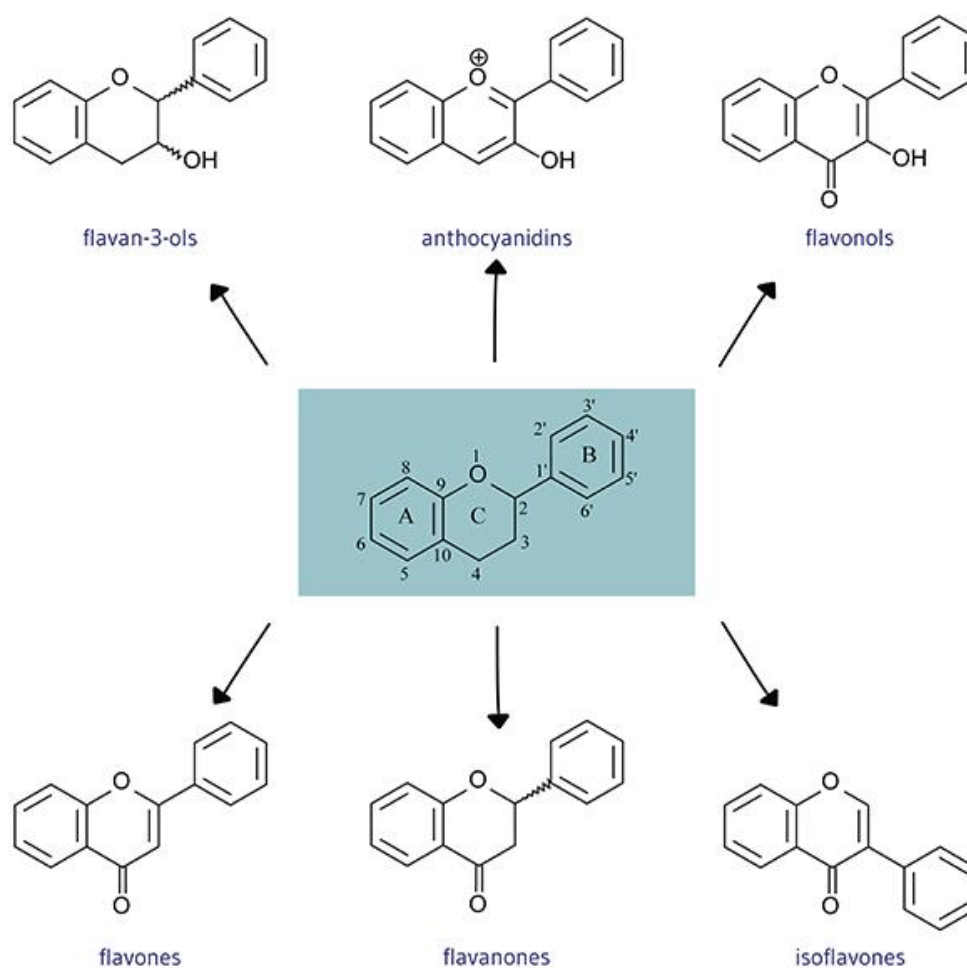
φαινυλοπροπανοειδών (Εικόνα 17). Η οδός του κινναμωμικού οξέος αποτελεί εισαγωγικό στάδιο στη βιοσύνθεση των ενώσεων αυτών, καθώς μέσω του κινναμωμικού οξέος παράγεται το ενδιάμεσο κουμαροϋλικό συνένζυμο Α (4-coumaroyl-CoA). Από αυτό, προκύπτει η βιοσύνθεση πολυάριθμων φυσικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των λιγνολών (προδρόμων της λιγνίνης και της λιγνοκυτταρίνης), των φλαβονοειδών, των ισοφλαβονοειδών, των κουμαρινών, των αουρονών, των στυλβενίων, της κατεχίνης και φυσικά των φαινυλοπροπανοειδών (Vogt, 2010).



Εικόνα 17 Διαφοροποίηση των φαινυλοπροπανοειδών με βάση το γενικό φαινυλοπροπανοειδικό μονοπάτι. Οι μεταβολίτες της οδού του σικιμικού οξέος και ο κεντρικός μεταβολίτης 4-coumaroyl-CoA, εμφανίζονται με γκρι χρώμα (Vogt, 2010).

3.1.2.1 Φλαβονοειδή

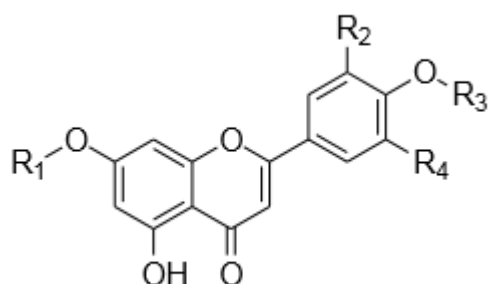
Τα φλαβονοειδή (από τη λατινική λέξη flavus που σημαίνει κίτρινο) είναι μια κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών και των μυκήτων. Χημικά, τα φλαβονοειδή διαθέτουν ένα σκελετό 15 ατόμων άνθρακα, ο οποίος αποτελείται από δύο δακτυλίους φαινυλίου (A και B) και τον ετεροκυκλικό δακτύλιο (C). Υπάρχουν έξι μεγάλες υποκατηγορίες φλαβονοειδών: οι ανθοκυανιδίνες, οι φλαβαν-3-όλες, οι φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβόνες και ισοφλαβόνες, με τις φλαβονόλες να είναι οι πιο διαδεδομένες γενικά (Εικόνα 18).



Εικόνα 18 Βασικές δομές υποκατηγοριών φλαβονοειδών Φωτογραφία από:
<https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>

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

○ **Φλαβόνες**



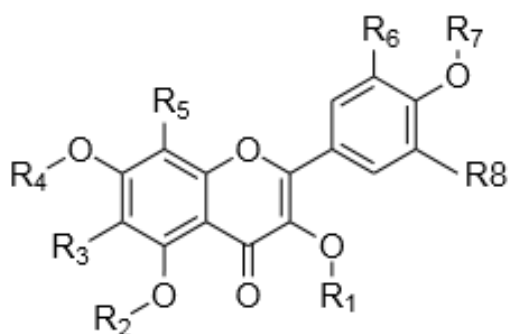
Εικόνα 19 Βασικός σκελετός φλαβονών του γένους *Cistus*

Πίνακας 5 Φλαβόνες φυτών είδους *Cistus*

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

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

○ **Φλαβονόλες**



Εικόνα 20 Βασικός σκελετός φλαβονολών του γένους *Cistus*

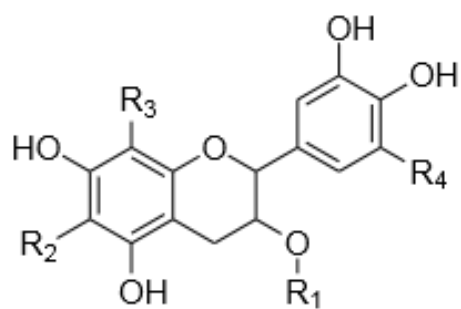
Πίνακας 6 Φλαβονόλες φυτών είδους *Cistus*

Φλαβονόλη	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	Φυτό	Αναφορά
quercetin	H	H	H	H	H	OH	H	H	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)
rutin	disaccharide rutinose	H	H	H	H	OH	H	H	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)
kaempferol	H	H	H	H	H	H	H	H	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)
myricetin	H	H	H	H	H	OH	H	OH	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)
isorhamnetin	H	H	H	H	H	OCH ₃	H	H	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)
isoquercetin	Glucoside	H	H	H	H	OH	H	H	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)
astragalin	Glucoside	H	H	H	H	H	H	H	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)
nicotiflorine	rutinoside	H	H	H	H	H	H	H	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)
isorhamnetin-3-O-glucoside	Glucoside	H	H	H	H	OCH ₃	H	H	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)
Isomericitrin	β-D-glucopyranoside	H	H	H	H	OH	H	OH	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)
6-methoxykaempferol 3-methyl ether	CH ₃	H	OCH ₃	H	H	H	H	H	<i>C. albanicus</i> , <i>C. parviflorus</i>	(Vogt et al., 1987)
jaceidin	CH ₃	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	H	<i>C. albanicus</i> , <i>C. parviflorus</i>	(Vogt et al., 1987)
axillarin	CH ₃	H	OCH ₃	H	H	OH	H	H	<i>C. albanicus</i>	(Vogt et al., 1987)
santin	CH ₃	H	OCH ₃	H	H	H	CH ₃	H	<i>C. albanicus</i> , <i>C. parviflorus</i>	(Vogt et al., 1987)
myricetin 3-O-rutinoside	rutinoside	H	H	H	H	OH	H	OH	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)
limocitrin 3,7,4'-trimethyl ether	CH ₃	H	H	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	<i>C. albanicus</i>	(Vogt et al., 1987)
5,7-dihydroxy-3,8,4'-trimethoxyflavone	CH ₃	H	H	H	OCH ₃	H	CH ₃	H	<i>C. albanicus</i> , <i>C. parviflorus</i>	(Vogt et al., 1987)
5,7,4'-trihydroxy-3,8,3'-trimethoxyflavone	CH ₃	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	<i>C. albanicus</i> , <i>C. parviflorus</i>	(Vogt et al., 1987)

myricetin 3,7,3',4'-tetramethyl ether	CH ₃	H	H	CH ₃	H	OCH ₃	CH ₃	OH	<i>C. monspeliensis</i>	(Venditti et al., 2014)
herbacetin 3,8-dimethyl ether	CH ₃	H	H	H	OCH ₃	H	H	H	<i>C. albanicus</i> , <i>C. parviflorus</i>	(Vogt et al., 1987)
flindulatin	CH ₃	H	H	CH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	H	<i>C. albanicus</i>	(Vogt et al., 1987)
5,7-Dihydroxy-3,3',4',8-tetramethoxyflavone	CH ₃	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	H	<i>C. parviflorus</i>	(Vogt et al., 1987)
4',7-dihydroxy-3,3',5-trimethoxyflavone	CH ₃	CH ₃	H	H	H	OCH ₃	H	H	<i>C. laurifolius</i>	(Vogt et al., 1988)
3,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-methoxy-4H-chromen-4-one	H	CH ₃	H	H	H	OCH ₃	H	H	<i>C. laurifolius</i>	(Vogt et al., 1988)
quercetin 3-O-sophoroside	Disaccharide glucose	H	H	H	H	OH	H	H	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)
isorhamnetin 3-O-β-D-xylosyl(1->6)-β-D-glucoside	β-D-xylosyl(1->6)-β-D-glucoside	H	H	H	H	OCH ₃	H	H	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)
quercetin 3-O-β-D-galactoside-7-O-α-L-rhamnoside	β-D-galactoside	H	H	α-L-rhamnoside	H	OH	H	H	<i>C. ladanifer</i>	(Tomás-Lorente et al., 1992)

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

- **Φλαβανόλες**



Εικόνα 21 Βασικός σκελετός φλαβανολών του γένους *Cistus*

Πίνακας 7 Φλαβανόλες φυτών είδους *Cistus*

Φλαβανόλη	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Φυτό	Αναφορά
(+)-catechin	H	H	H	H	<i>C. albidus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Danne et al., 1994)(Qa'dan et al., 2003)
(-)-epicatechin	H	H	H	H	<i>C. salviifolius</i>	(Danne et al., 1994)
(-)-epicatechin gallate	Gallic acid	H	H	H	<i>C. salviifolius</i>	(Danne et al., 1994)
procyanidin B1	H	H	catechin	H	<i>C. albidus</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Qa'dan et al., 2003)
procyanidin B3	H	H	catechin	H	<i>C. albidus</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Qa'dan et al., 2003)
procyanidin B7	H	catechin	H	H	<i>C. incanus</i> L. ssp.	(Danne et al., 1994)
dimeric prodelphinidin B3	H	H	gallocatechin	H	<i>C. albidus</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Qa'dan et al., 2003)
catechin-3-O- α -L-rhamnopyranoside	L-rhamnopyranose	H	H	H	<i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Petereit et al., 1991)
dimeric prodelphinidin B1	H	H	epigallocatechin	H	<i>C. albidus</i> , <i>C. incanus</i> ssp.	(Danne et al., 1994)(Qa'dan et al., 2003)
prodelphinidin C2	H	H	Gallocatechin-(4 α ->8)-gallocatechin-(4 α ->8)	H	<i>C. albidus</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Qa'dan et al., 2003)
gallocatechin-(4 α ->6)-catechin	H	gallocatechin	H	H	<i>C. albidus</i> L.	(Qa'dan et al., 2003)
epigallocatechin-(4 β ->8)-gallocatechin-(4 α ->8)-catechin	H	H	epigallocatechin-(4 β ->8)-gallocatechin	H	<i>C. albidus</i> L.	(Qa'dan et al., 2003)
epigallocatechin-(4 β ->6)-	H	epigallocatechin	H	H	<i>C. albidus</i> L.	(Qa'dan et al., 2003)

catechin						
(-)-epigallocatechin gallate	Gallic acid	H	H	OH	<i>C. salviifolius</i>	(Danne et al., 1994)
epigallocatechin	H	H	H	OH	<i>C. salviifolius</i>	(Danne et al., 1994)
(+)-gallocatechin	H	H	H	OH	<i>C. albidus</i> , <i>C. salviifolius</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Danne et al., 1994)(Qa'dan et al., 2003)
(+)-gallocatechin 3-O-gallate	Gallic acid	H	H	OH	<i>C. salviifolius</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Danne et al., 1994)
prodelphinidin B-2 3'-O-gallate	Gallic acid	H	gallocatechin	OH	<i>C. salviifolius</i>	(Danne et al., 1994)
prodelphinidin B2	H	H	epigallocatechin	OH	<i>C. salviifolius</i>	(Danne et al., 1994)
prodelphinidin B3	H	H	gallocatechin	OH	<i>C. albidus</i> , <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Qa'dan et al., 2003)
epigallocatechin 3-O-p-hydroxybenzoate	p-hydroxybenzoic acid	H	H	OH	<i>C. salviifolius</i>	(Danne et al., 1994)
prodelphinidin B1	H	H	epigallocatechin	OH	<i>C. incanus</i> L. ssp.	(Danne et al., 1994)
gallocatechin(4 α ->8)gallocatechin(4 α ->8)gallocatechin	H	H	gallocatechin(4 α ->8)gallocatechin(4 α ->8)	OH	<i>C. albidus</i> L.	(Danne et al., 1994)(Qa'dan et al., 2003)
gallocatechin-(4 α ,6)-gallocatechin	H	gallocatechin	OH	OH	<i>C. albidus</i> L., <i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Qa'dan et al., 2003)
prodelphinidin B-2,3'-O-gallate	H	H	epigallocatechin 3-O-gallate	OH	<i>C. salviifolius</i>	(Danne et al., 1994)
Catechin-(4 α ->8)-gallocatechin	H	H	catechin	OH	<i>C. incanus</i> subsp. <i>tauricus</i>	(Petereit et al., 1991)
epigallocatechin-3-O-gallate-(4 β ->8)-gallocatechin	H	H	epigallocatechin-3-O-gallate	OH	<i>C. incanus</i> L. ssp.	(Danne et al., 1994)

<i>epigallocatechin-(4β→6)-epigallocatechin-3-O-gallate</i>	Gallic acid	<i>epigallocatechin</i>	H	OH	<i>C. salviifolius</i>	(Danne et al., 1994)(Qa'dan et al., 2003)
<i>epigallocatechin-3-O-gallate-(4β→6)-gallocatechin</i>	H	<i>3-O-gallate-(4β→6)-gallocatechin</i>	H	OH	<i>C. incanus</i> L. ssp.	(Danne et al., 1994)
<i>epigallocatechin-(4β→6)-gallocatechin</i>	H	<i>epigallocatechin</i>	H	OH	<i>C. albidus</i> L.	(Qa'dan et al., 2003)
<i>epigallocatechin-(4β→8)-gallocatechin-(4α→8)-gallocatechin</i>	H	H	<i>epigallocatechin-(4β→8)-gallocatechin</i>	OH	<i>C. albidus</i> L.	(Qa'dan et al., 2003)
<i>epigallocatechin-3-O-p-hydroxybenzoate-(4β→8)-epigallocatechin</i>	H	H	<i>epigallocatechin-3-O-p-hydroxybenzoic acid</i>	OH	<i>C. salviifolius</i> L.	(Qa'dan et al., 2003)
<i>epigallocatechin-3-O-p-hydroxybenzoate-(4β→8)-epigallocatechin-3-O-gallate</i>	Gallic acid	H	<i>epigallocatechin-3-O-p-hydroxybenzoic acid</i>	OH	<i>C. salviifolius</i>	(Qa'dan et al., 2003)
<i>gallocatechin-(4α→6)-gallocatechin-(4α→8)-gallocatechin</i>	H	H	<i>gallocatechin-(4α→8)-gallocatechin</i>	OH	<i>C. incanus</i> L.	(Mansoor et al., 2015)
<i>epigallocatechin-3-O-gallate-(4β→8)-epigallocatechin-3-O-gallate-(4β→8)-gallocatechin</i>	H	H	<i>epigallocatechin-3-O-gallate-(4β→8)-epigallocatechin-3-O-gallate</i>	OH	<i>C. incanus</i> L.	(Mansoor et al., 2015)

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

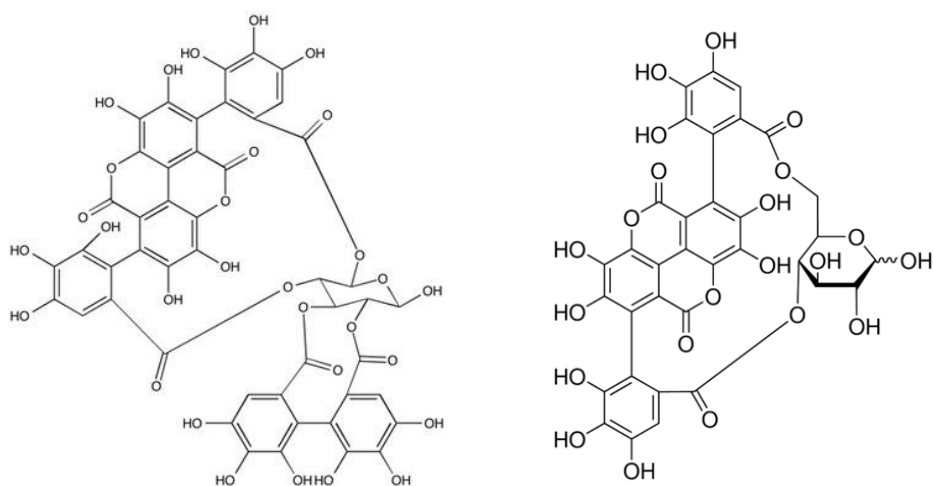
3.1.2.2 Ελαγιταννίνες

Οι ταννίνες είναι μια υποομάδα πολυφαινολών που έχουν την ικανότητα να ιζηματοποιούν τις πρωτεΐνες. Οι ταννίνες έχουν χρησιμοποιηθεί από την αρχαιότητα στα βυρσοδεψεία και έχουν σημαντικές καλλυντικές εφαρμογές. Παραδοσιακά, χρησιμοποιούνται επίσης για τις αντιδιαρροϊκές ιδιότητές τους, δρώντας μέσω της συρρίκνωσης των βλεννογόνων των εντέρων και της μείωσης των εκκρίσεων των βλεννογόνων. Η συγκέντρωση των ταννινών στα φυτά δεν εξαρτάται μόνο από το είδος αλλά και παράγοντες όπως η γονιμότητα του εδάφους και το pH, την ένταση του φωτός, την ηλικία των φυτών κ.ά. (Barrajón-Catalán et al., 2010).

Οι ελαγιταννίνες είναι η μεγαλύτερη ομάδα ταννινών και διαθέτουν αντιοξειδωτικές, αντινεοπλασιακές, αντι-αθηροσκληρωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακές, αντι-ηπατοτοξικές και αντι-υικές ιδιότητες (Bakkalbasi et al., 2009). Όπως και οι ταννίνες γενικότερα, έτσι και οι ελαγιταννίνες έχουν χρησιμοποιηθεί στη βυρσοδεψία και την κοσμετολογία (Barrajón-Catalán et al., 2011a).

Σύμφωνα με μία συστηματική μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Barrajón, et al. 2011, τα υδατικά εκχυλίσματα φυτικών ειδών *Cistus*, και πιο συγκεκριμένα αυτά που προέρχονται από τα είδη *C. ladanifer*, *C. salviifolius*, *C. populifolius* και *C. libanotis* είναι ιδιαίτερα πλούσια σε ελλαγιταννίνες (κυρίως πουνικαλλαγίνη και τα παράγωγά της και υδρολυόμενες ελλαγιταννίνες προερχόμενες από το γαλλικό οξύ), ενώ τα είδη *C. clusii*, *C. laurifolius* και *C. monspeliensis* περιέχουν σημαντικές ποσότητες φλαβονοειδών και πολύ λιγότερες ελλαγιταννίνες. Πιο συγκεκριμένα, το υπογένος *Leucocistus*, με μερικές εξαιρέσεις, περιέχει την υψηλότερη συγκέντρωση ελλαγιταννινών, ιδιαίτερα το *C. salviifolius* και *C. ladanifer*, και, σε χαμηλότερο βαθμό, το *C. populifolius*. Δύο είδη αυτού του υπογένους περιέχουν σημαντικά λιγότερες ελλαγιταννίνες, δηλαδή τα είδη *C. laurifolius* και *C. monspeliensis*.

Τα δύο είδη που ανήκουν στο υπογένος *Halimioides* επίσης περιέχουν ελλαγιταννίνες ενώ το *C. libanotis* παρουσιάζει πολύ υψηλότερη περιεκτικότητα από το *C. clusii*, σχεδόν συγκρίσιμη με εκείνη μερικών μελών του υπογένους *Leucocistus*. Τέλος, σύμφωνα με την ίδια μελέτη, δεν ανιχνεύονται ελλαγιταννίνες στο υπογένος *Cistus*, με εξαίρεση την υπολειμματική παρουσία γλυκογαλλίνης σε ένα από τα δείγματα του είδους *C. albidus* (Barrajón-Catalán et al., 2011a).



Εικόνα 22 Αριστερά: πουνικαλλαγίνη Δεξιά: πουλικαλλίνη

3.1.3 Άλλες κατηγορίες

○ Υδρογονάνθρακες

Μεταξύ των πτητικών οργανικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα φύλλα του *C. albidus* της νότιας Καταλονίας, ήταν το δοκοσάνιο, το εικοσιοκτάνιο και το εικοσιτετράνιο (Llusià et al., 2010). Διάφοροι υδρογονάνθρακες όπως το εικοσιεπτάνιο, το εικοσιενάνιο, το εικοσιπεντάνιο και το εικοσιτριάνιο παρήχθησαν επίσης από το *C. monspeliensis* στο νότιο τμήμα της Γαλλίας, στην Ελλάδα και στην Τυνησία (Dimitra Angelopoulou et al., 2001; Loizzo et al., 2013; Robles and Garzino, 2000), ενώ στο *C. parviflorus* εντοπίστηκαν το τετραδεκένιο, το εικοσιπεντάνιο, το δεκαπεντάνιο, το νεοφυταδιένιο, το επταδεκένιο, το δοκοσάνιο, η ελεϊνισάνη και το δωδεκάνιο (D. Angelopoulou et al., 2001). Τέλος, τα νεοφυταδιένια και το πεντακοσάνιο εντοπίστηκαν σε αρκετούς πληθυσμούς *C. salviifolius* της Ελλάδας και της Τυνησίας (Demetzos et al., 2002b; Loizzo et al., 2013).

○ Λιπαρά οξέα

Αρκετά λιπαρά οξέα ταυτοποιήθηκαν στα υπέργεια τμήματα και αιθέρια έλαια του *C. albidus* που συλλέχθηκαν στη βορειοανατολική Ισπανία, συμπεριλαμβανομένου του τετραδεκανοϊκού οξέος και του πενταδεκανοϊκού οξέος (Llusià et al., 2010). Η σύνθεση λιπαρών οξέων των σπόρων του *C. albidus* μελετήθηκε τόσο σε νεαρά όσο και σε ώριμα φυτά. Σε σπόρους των παλαιότερων φυτών βρέθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις λινολεϊκού οξέος και γενικά πολυακόρεστων καθώς και πολύ μακράς αλυσίδας κεκορεσμένων λιπαρών οξέων (Müller et al., 2014). Διάφορα λιπαρά οξέα και εστέρες ταυτοποιήθηκαν στα εναέρια τμήματα και το αιθέριο έλαιο του *C. monspeliensis*, του *C. creticus* subsp. *creticus* και του *C. salviifolius* (D. Angelopoulou et al., 2001; Demetzos et al., 1994; Loizzo et al., 2013; Robles and Garzino, 2000).

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

Τα Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά βιοσυνθέτουν και παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες στους οποίους αποδίδονται οι βιολογικές τους ιδιότητες (Williams et al., 1989). Ειδικά στη λεκάνη της Μεσογείου (Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία και Τουρκία) διάφορα παρασκευάσματα χρησιμοποιούνται παραδοσιακά προερχόμενα από είδη *Cistus* σε ασθενείς που παρουσιάζουν ένα πλήθος διαφορετικών παθολογικών καταστάσεων, όπως σε περιπτώσεις άγχους, καταρροής, διάρροιας, αλλά και σε διάφορους τύπους καρκίνου, καρδιοπάθειες, κ.ά.

Για το λόγο αυτό ένας σημαντικός αριθμός μελετών έχει πραγματοποιηθεί για την κατανόηση και μελέτη των ευεργετικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων τους. Ακολουθεί η περιγραφή των πλέον μελετημένων βιολογικών δράσεων των ειδών *Cistus* και γίνεται συσχέτιση με το χημικό περιεχόμενο των αντίστοιχων περιπτώσεων.

3.2.1 Αντιοξειδωτική δράση

Τα φυτά είναι σε θέση να παράγουν ένα μεγάλο αριθμό αντιοξειδωτικών ενώσεων για να διαχειριστούν το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τις ηλιακές ακτίνες και το οξυγόνο, καθιστώντας τα καλές πηγές για την απομόνωση ουσιών με αντιοξειδωτική δράση. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να έχουν τεράστια θεραπευτική σημασία σε παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με τις ελεύθερες ρίζες, όπως ο καρκίνος, η καρδιαγγειακή νόσος, η αθηροσκλήρωση και η γήρανση. Τα αντιοξειδωτικά έχουν καθιερωθεί ως ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για την εξάλειψη των δυσμενών επιδράσεων που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες, καθώς έχουν τη δυνατότητα να τις εξουδετερώνουν (Di Ferdinando et al., 2014; Martínez-Ferri et al., 2000).

Τα φυτά του γένους *Cistus* είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως έχει πολλάκις επιβεβαιωθεί από σχετικές μελέτες. Για παράδειγμα, η μελέτη σχετικά με τη διάσπαση του DNA έδειξε τις ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες των υδατικών εκχυλισμάτων των ειδών *Cistus incanus* και *Cistus monspeliensis*. Πιο συγκεκριμένα, τα προαναφερόμενα εκχυλίσματα μείωσαν σε σημαντικό βαθμό τις βλάβες στο DNA που προέρχονταν από την επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου και τις υπερυώδους ακτινοβολίας (Attaguile et al., 2000).

Σύμφωνα με σχετικές μελέτες, η γραμμική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας φαινολικών συστατικών και της ικανότητας εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών DPPH και ABTS, υποδηλώνουν ότι η περιεκτικότητα σε φαινόλες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των φυτικών ειδών (Ivanova et al., 2005; Piluzza and Bullitta, 2011; Soobrattee et al., 2005). Σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη, τα υδατικά και υδατομεθανολικά εκχυλίσματα των υπέργειων τμημάτων του *Cistus salviifolius* L. και του *Cistus monspeliensis* L. παρουσίασαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών DPPH και ABTS καθώς και της δοκιμασίας FRAP (αντιοξειδωτική ισχύς αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου) σε σύγκριση με τα συνθετικά αντιοξειδωτικά που αξιολογήθηκαν (Sayah et al., 2017). Σε μία άλλη μελέτη έγινε προσπάθεια διερεύνησης της πολυφαινολικής σύνθεσης ακατέργαστου αιθανολικού εκχυλίσματος φύλλων του *C. incanus*. Μεταξύ των εμπλουτισμένων σε φαινολικές ενώσεις κλασμάτων που αναλύθηκαν, βρέθηκε ότι το κλάσμα οξικού αιθυλεστέρα είναι το πιο αποτελεσματικό όσον αφορά τη δραστηριότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών (Gori et al., 2016). Σε άλλες μελέτες, τα κλάσματα του οξικού αιθυλεστέρα και της βουτανόλης ενός αιθανολικού εκχυλίσματος του είδους *Cistus laurifolius* L. βρέθηκαν να έχουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση (Akkol et al., 2012), καθώς και το υδατικό και το αιθανολικό εκχύλισμα του *Cistus salviifolius* (Rebaya et al., 2016a). Επιπλέον, σύμφωνα με μια ερευνητική εργασία (Riehle et al., 2013a) το αφέψημα του *C. incanus* περιέχει φαινολικές ενώσεις από διαφορετικές υποκατηγορίες. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκαν ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των φαινολογξέων, φλαβονοειδών καθώς και παραγώγων φλαβαν-3-όλης, και διαθέτουν έντονες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως επιβεβαιώθηκε από την μέθοδο LC-onlineTEAC (Liquid Chromatography hyphenated online with Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

3.2.2 Αντιβακτηριακή δράση

Από την αρχαιότητα, η εθνοβοτανική χρήση διαφόρων ειδών *Cistus* αποκαλύπτει ότι αυτά τα φυτά αποτελούν μια καλή θεραπεία για πολλές μικροβιακές διαταραχές και λοιμώξεις (Tomás-Menor et al., 2013b). Έτσι, αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει την αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων που προέρχονται από τα φυτά της οικογένειας Cistaceae, τόσο έναντι Gram θετικών όσο και κατά Gram αρνητικών βακτηριδίων (Barrajón-Catalán et al., 2011b; Bedoya et al., 2009; Tomás-Menor et al., 2013a).

Σύμφωνα με μελέτες, η χρήση του αφεψήματος *Cistus* με εκπλύσεις του στόματος συμβάλλει στην πρόληψη ασθενειών που εμφανίζονται στην στοματική κοιλότητα μειώνοντας την ποσότητα των βακτηριδίων (Riehle et al., 2013b). Η υψηλή ποσότητα διτερπενίων τύπου λαβδανίου, όπως επιβεβαιώθηκε, είναι υπεύθυνη για την ισχυρή αυτή αντιμικροβιακή δράση που επιδεικνύουν τα παραδοσιακά παρασκευάσματα (Rauwald et al., 2010).

Σε μία άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε, εξετάστηκε η *in vitro* αντιβακτηριακή δράση των εκχυλισμάτων *Cistus* ενάντια στο *Streptococcus mutans* (Wittprahl et al., 2015), ένα από τα κύρια βακτηριακά είδη που προκαλούν τερηδόνα, και διαπιστώθηκαν οι αντιβακτηριακές ιδιότητες του *C. creticus*.

Σε μία ακόμη έρευνα, το *Cistus creticus* L. έδειξε ισχυρή αντιμυκητιασική δράση, αναστέλλοντας την ανάπτυξη του *Aspergillus parasiticus* σε ποσοστό 45,91%. Επιπλέον, η υψηλότερη αποτελεσματικότητα έναντι του *A. carbonarius* αποδόθηκε στο εκχύλισμα *Cistus creticus* L., ανάμεσα στα εξεταζόμενα από φυτά εκχυλίσματα.

Επίσης έχει αποδειχθεί ότι το *C. salviifolius* έχει αντιβακτηριακή δράση κατά των *Mycobacterium aurum* A και *Mycobacterium smegmatis* MC2155 (Haouat et al., 2013).

Η δραστηριότητα του υδατικού εκχυλίσματος *Cistus salviifolius* κατά του *Staphylococcus aureus* αναφέρθηκε ότι είναι ιδιαίτερα ισχυρή (Tomás-Menor et al., 2013a), η οποία συσχετίστηκε με την παρουσία ελαγitanνινών και μερικών συγκεκριμένων φλαβονολών, οι οποίες εντοπίστηκαν ως επί το πλείστον στο *C. salviifolius*. Έτσι, τα εκχυλίσματα που είναι πλούσια σε ελλαγitanνίνες και φλαβονολικές ενώσεις αποτελούν ελπιδοφόρους αντιβακτηριακούς παράγοντες τόσο έναντι Gram θετικών όσο και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Οι ελλαγitanνίνες (Tomás-Menor et al., 2015), καθώς και η κερκετίνη και η μυρικετίνη αποτελούν φυσικά προϊόντα με συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις με αντιβιοτικά έναντι Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηριδίων.

3.2.3 Κυτταροτοξική / Κυτταροστατική δράση

Σε μία μελέτη του 2012, αναφέρθηκε η κυτταροτοξική δραστηριότητα των εκχυλισμάτων του *C. creticus* subsp. *creticus* έναντι ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων εξηγώντας, τουλάχιστον εν μέρει, μερικές χρήσεις του στη λαϊκή ιατρική. Τα εκχυλίσματα που ήταν πλούσια σε διτερπένια τύπου λαβδανίου, ήταν αποτελεσματικά έναντι καρκινικών κυττάρων του τραχήλου, του στήθους καθώς και μελανωμάτων (Skorić et al., 2012).

Σύμφωνα με μία άλλη μελέτη, το διτερπένιο λαβδανικού τύπου που απομονώθηκε από τη ρητίνη του *C. creticus* subsp. *creticus*, όπως η λαβδ-13-εν-8α-15-διόλη, ήταν δραστικό έναντι 13 από τις 14 μελετηθείσες κυτταρικές σειρές, ενώ η λαβδ-7,13-διέν-15-όλη έδειξε δραστικότητα μόνο σε κύτταρα ανθρώπινης προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας HL60 (Dimas et al., 1998). Οι κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές δράσεις των βιοδραστικών διτερπενίων τύπου λαβδανίου βελτιώθηκαν με την ενσωμάτωσή τους σε λιποσωμικά σκευάσματα, μία διαδικασία που καθιστά τη χρήση αυτών των ενώσεων κατάλληλη για δοκιμή σε *in vivo* πειράματα (Matsingou et al., 2006; Skorić et al., 2012). Η σκλαρεόλη, ένα άλλο διτερπένιο τύπου λαβδανίου, διαθέτει αντικαρκινική δράση κατά κυτταρικών σειρών ανθρώπινου καρκίνου του μαστού και ενισχύει τη δράση γνωστών αντικαρκινικών φαρμάκων (Matsingou et al., 2006). Ένας αριθμός διτερπενίων τύπου λαβδανίου που απομονώθηκαν από υπέργεια τμήματα του *C. creticus* στην Ελλάδα, συμπεριλαμβανομένης της σκλαρεόλης, δοκιμάστηκαν *in vitro* για την κυτταροτοξική δράση τους έναντι κυττάρων καρκίνου του ανθρώπινου ρινοφάρυγγα, λευχαιμίας ποντικού και ανθρωπίνων βρογχικών επιδερμοειδών καρκινωμάτων (Chinou et al., 1994). Μεταξύ των διτερπενίων που ελέγχθηκαν, η λαβδ-13-εν-8α-15-διόλη ήταν το μόνο συστατικό που δεν εμφάνισε σχεδόν καμία κυτταροτοξική δράση.

Τρία φλαβονοειδή, η μυρικετίνη, ένας μεθυλ-αιθέρας της μυρικετίνης και ένα 3',5-διακετυλο παράγωγο της μυρικετίνης, ελέγχθηκαν επίσης έναντι έντεκα λευχαιμικών κυτταρικών σειρών, όπου μόνο ο μεθυλ-αιθέρας που απομονώθηκε από το εκχύλισμα του *C. monspeliensis* παρουσίασε σημαντικές κυτταροστατικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες (Dimas et al., 2000)

Σε μία άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εκχυλισμάτων ειδών του γένους *Cistus* έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών του ανθρώπινου μαστού (MCF-7) και του κόλον (LOVO) μειώθηκε ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, καθώς και σε σειρές ανθεκτικές σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα όπως η δοξορουβικίνη, ενώ φάνηκε πως τα εκχυλίσματα δεν επηρέασαν την κυτταρική ανάπτυξη των φυσιολογικών κυτταρικών καλλιιεργειών. Αντίθετα, τα προαναφερθέντα εκχυλίσματα προκάλεσαν απόπτωση στις εξεταζόμενες καρκινικές κυτταρικές σειρές με σημαντικά υψηλότερη προαποπτωτική δράση να εμφανίζεται σε ευαίθητα παρά σε ανθεκτικά σε φάρμακα κύτταρα, και να συσχετίζεται με την παρουσία της μυρικετίνης (Moreira et al., 2017).

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

3.2.4 Σπασμωλυτική δράση

Η παρουσία συστατικών με χαλαρωτικές ιδιότητες των λείων μυών στα υδατικά εκχυλίσματα *Cistus* είναι εν μέρει συμβατή με τη χρήση αυτού του φυτού στη λαϊκή ιατρική για ορισμένες γαστρεντερικές διαταραχές. Τα εκχυλίσματα *Cistus* χρησιμοποιούνται παραδοσιακά στις μεσογειακές χώρες για τη θεραπεία της διάρροιας, των πεπτικών ελκών και των αντισπασμωδικών παραγόντων. Πειραματικά, οι μυοχαλαρωτικές επιδράσεις των υδατικών εκχυλίσμάτων *C. incanus* και *C. monspeliensis* αποδείχθηκαν σε ίνες διαμήκους λείου μυός του ειλεού και της αορτής αρουραίων (Attaguile et al., 2004). Είναι αρκετά πιθανό ότι τα μυοχαλαρωτικά αποτελέσματα των *Cistus incanus* και *Cistus monspeliensis* σχετίζονται με την παρουσία πολυφαινολικών ενώσεων, δεδομένου ότι είναι γνωστό πως τα φλαβονοειδή περιορίζουν την εντερική κινητικότητα *in vitro* (Attaguile et al., 2004) και ασκούν δράση σε αγγεία διαφορετικών ιστών ή/και διαφορετικών θηλαστικών. Οι ερευνητές απέδωσαν την αναστολή της εντερικής κινητικότητας από πολυφαινολικές ενώσεις στις υψηλές συγκεντρώσεις φλαβονοειδών που περιέχονται στα φυτά *Cistus*. Επιπλέον, τα υδατικά εκχυλίσματα των ειδών *C. populifolius* και *C. ladanifer* αξιολογήθηκαν *in vitro* σε ζωικά μοντέλα και επέδειξαν σημαντικές, δόσοεξαρτώμενες σπασμολυτικές (de Rojas et al., 1995) και αναλγητικές επιδράσεις (De Andrés et al., 1999).

Επίσης, αναφέρθηκε ότι η παρατηρούμενη φαρμακολογική δραστηριότητα των υδατικών εκχυλίσμάτων *Cistus* μπορεί να οφείλεται όχι αποκλειστικά σε μια ένωση αλλά στη συνεργιστική δράση των διαφόρων συστατικών του φυτού, όπως οι φλαβονόλες, κερκετίνη, καμπφερόλη, 3-μεθυλαιθέρας της καμπφερόλης, εσκίνη, μυρικετίνη, αλλά και οι προανθοκυανιδίνες.

Επίσης τα εκχυλίσματα των *Cistus monspeliensis* και *Cistus incanus* έχουν αποδειχθεί ότι έχουν χαλαρωτικές επιδράσεις στον απομονωμένο εντερικό και αγγειακό λείο μυ. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν μια ορθολογική βάση για την κατανόηση των ευεργετικών αποτελεσμάτων των εκχυλισμάτων *Cistus* ως σπασμολυτικών παραγόντων στην παραδοσιακή θεραπευτική και συγκεκριμένα σε περιπτώσεις διάρροιας και πεπτικών διαταραχών. Οι αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων *Cistus* υποδεικνύουν επίσης την πιθανή χρήση τους σε καταστάσεις όπως η υπέρταση.

3.2.5 Δράση έναντι δερματικών παθήσεων

Σε μια μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων σε 95 παιδιά, εξετάστηκαν οι επιδράσεις του αφεψήματος φύλλων *Cistus* στην ατοπική δερματίτιδα. Όλα τα παιδιά που συμμετείχαν στη μελέτη είχαν την ασθένεια για περισσότερο από τα τρία τέταρτα της ζωής τους. Το ρόφημα παρασκευάστηκε από φύλλα τα οποία έβραζαν για πέντε λεπτά και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση. Όλες οι περιοχές του προσβεβλημένου δέρματος πλένονταν δύο φορές την ημέρα με το εκχύλισμα των φύλλων ενώ ακολούθως το εκχύλισμα αφηνόταν να ξεραθεί πάνω στο δέρμα. Επιπλέον, ένα ποτήρι ροφήματος από *Cistus* καταναλωνόταν καθημερινά. Μετά από περίπου δύο εβδομάδες, το 80% των παιδιών επέδειξε αξιοσημείωτη βελτίωση ενώ πλήρης ύφεση έγινε στο 64% των παιδιών (Reuter et al., 2010).

3.2.6 Αντιική δράση

Σε δύο μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το 2007, περιεγράφηκε η αντιική δράση ενός εκχυλίσματος του φυτού *C. incanus* (CYSTUS052) κατά των μολύνσεων από ιό γρίπης Α (Droebner et al., 2007; Ehrhardt et al., 2007). Επίσης μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς που υπέφεραν από οδοντική λοίμωξη στο στόμα και στο λαιμό, ανέδειξε την αποτελεσματικότητα του εκχυλίσματος *Cistus* (Ulrich Kalus, 2009). Σε μια άλλη τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο διπλή τυφλή κλινική δοκιμή, αποδείχθηκε ότι το *Cistus* ήταν πιο αποτελεσματικό στη μείωση της μέσης διάρκειας και σοβαρότητας των συμπτωμάτων σε ασθενείς με λοίμωξη της ανώτερης αναπνευστικής οδού σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (Kalus et al., 2009).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η αντιική δράση του εκχυλίσματος CYSTUS052 διαπιστώθηκε μόνο όταν το εκχύλισμα CYSTUS052 χορηγήθηκε πριν από τη μόλυνση με ιό.

Αντιθέτως, όταν το εκχύλισμα CYSTUS052 χορηγήθηκε παράλληλα ή μετά από λοίμωξη από ιό, δεν ανιχνεύθηκε κανένα αντιικό αποτέλεσμα.

Σε μία άλλη έρευνα παρουσιάστηκε η ισχυρή αντιική δράση του εκχυλίσματος του είδους *Cistus incanus* έναντι του ιού HIV και επισημάνθηκε ότι το εκχύλισμα στοχεύει σε συστατικά της ιικής κάψας, εμποδίζοντας την πρόσδεση των σωματιδίων του ιού στα κύτταρα (Rebensburg et al., 2016). Μια σειρά πειραμάτων που σχεδιάστηκαν για να διερευνήσουν το μηχανισμό της αντιικής δράσης του εκχυλίσματος αποκάλυψαν ότι το εκχύλισμα εμποδίζει τα σωματίδια του ιού να αλληλεπιδράσουν με τα κύτταρα ξενιστές. Η θεραπεία με εκχύλισμα του είδους *Cistus incanus* παρεμπόδισε την εισχώρηση του ιικού RNA σε κύτταρα, αποδεικνύοντας ότι το εκχύλισμα δρα στο επίπεδο της εισόδου. Αυτή η μελέτη επίσης απέδειξε ότι τα συστατικά του εκχυλίσματος *Cistus* στοχεύουν τις πρωτεΐνες της ιικής κάψας και παρουσιάζουν επιλεκτικότητα σε αυτές έναντι των κυτταρικών συστατικών. Ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει την παρεμπόδιση της προσκόλλησης του πρωτεύοντος ιού στα κύτταρα με επιλεκτική στόχευση στις γλυκοπρωτεΐνες του ιικού περιβλήματος. Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η θεραπεία με *Cistus* αποτρέπει την πρωταρχική προσκόλληση σωματιδίων ιού σε κύτταρα, έναν μηχανισμό δράσης που προσδίδει μέγιστη προστασία των κυττάρων-ξενιστών από την προσβολή από ιούς. Το εκχύλισμα *Cistus incanus* συνδυάζει ευρεία αντιική δραστηριότητα με χαμηλό κίνδυνο αντοχής σε ιούς. Αντίθετα, πολλά άλλα φυσικά προϊόντα αντιικής δραστηριότητας επιδρούν και σε συστατικά του κυττάρου ξενιστή.

3.2.7 Βιολογικές δράσεις ρητίνης λαδάνου

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την αξιολόγηση των φαρμακολογικών ιδιοτήτων της ρητίνης που εκκρίνεται από τα φύλλα ειδών *Cistus*. Αξιοσημείωτη είναι η αντιμικροβιακή και κυτταροτοξική δράση του αιθερίου ελαίου ορισμένων ειδών *Cistus* (Chinou et al., 1994; Demetzos et al., 1995, 1990), ενώ τα διτερπένια τύπου λαβδανίου εκτός της αντιμικροβιακής, έχουν επιδείξει και εξαιρετική γαστροπροστατευτική δράση (Caruso et al., 1995). Σύγχρονες μελέτες έδειξαν ότι τα λαβδανικά διτερπένια, όπως η σκλαρεόλη, που αποτελούν τα βασικά συστατικά της ρητίνης και του αιθερίου ελαίου παρουσιάζουν αντιπηκτική, αντιοξειδωτική (Attaguile et al., 2000; Barrajon-Catalan et al., 2010; Gabriele et al., n.d.), αντισηπτική, αντι-ελκωτική (Yeşilada et al., 1997), αντιική (Chon, 2012; Droebner et al., 2007; Ehrhardt et al., 2007; Rebensburg et al., 2016), βακτηριοκτόνο

(Chinou et al., 1994; Demetzos and Dimas, 2001; Kalpoutzakis et al., 1998; Tomás-Menor et al., 2013a), μυκητοκτόνο (Karim et al., 2016), γαστροπροστατευτική (Caruso et al., 1995), αιμοστατική, μυοχαλαρωτική (Attaguile et al., 2004), καθαρτική, καταπραϋντική, σπασμολυτική (Attaguile et al., 2004) και αντιλεϊσμανιακή (Fokialakis et al., 2006) δράση . Πιο πρόσφατες εκτεταμένες μελέτες που διεξήχθησαν σε ένα σημαντικό αριθμό διτερπενίων τύπου λαβδανίου, ημισυνθετικά ή φυσικώς απαντώμενα, ανέδειξαν τη σημαντική κυτταροτοξική και κυτταροστατική δραστικότητα έναντι ανθρώπινων λευχαιμικών και άλλων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Chinou et al., 1994; Matsingou et al., 2006; Skorić et al., 2012; Vitali et al., 2011). Επίσης, αποδείχθηκε ότι τα απομονωμένα διτερπένια τύπου λαβδανίου από τα είδη *Cistus* παρεμβαίνουν στις βιοχημικές οδούς απόπτωσης, καθώς και στην έκφραση αρκετών πρωτοογκογονιδίων (Dimas et al., 2001).

3.2.8 Άλλες δράσεις

Η δράση των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων που παρελήφθησαν από επτά φυτά της Τουρκίας, τα οποία χρησιμοποιούνται στη λαϊκή ιατρική για τη θεραπεία γαστρικών παθήσεων περιλαμβανομένων των πεπτικών ελκών, μελετήθηκαν ως προς τη δράση τους έναντι του *Helicobacter pylori*. Μεταξύ άλλων αποδείχθηκαν οι ανασταλτικές ιδιότητες του *C. laurifolius*, γεγονός που καθιστά το φυτό αυτό χρήσιμο στη θεραπεία των πεπτικών ελκών (Yeşilada et al., 1999).

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

Το *Cistus salviifolius* είναι ένα φυτό με παραδοσιακή ιατρική χρήση που είχε ήδη παρουσιάσει σημαντική αντιυπεργλυκαιμική δράση σε προκαταρκτικό έλεγχο. Όπως αποδείχθηκε τα συστατικά του *C. salviifolius* επάγουν τους ενεργοποιούμενους από επαγωγείς των υπεροξυσωμάτων υποδοχείς PPARγ και διεγείρουν την πρόσληψη γλυκόζης από τα λιποκύτταρα (Kühn et al., 2011b). Παράλληλα, η σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της α-αμυλάσης έδειξε ότι μπορεί να είναι αποτελεσματικοί θεραπευτικοί παράγοντες για τον έλεγχο της υπεργλυκαιμίας.

Σε μία άλλη μελέτη του είδους *C. laurifolius*, το εκχύλισμα του φυτού ανέστειλε την απελευθέρωση ισταμίνης από περιτοναϊκά μαστοκύτταρα, καθώς και την απελευθέρωση της β-γλυκουρονιδάσης. Επίσης, παρεμπόδισε το σχηματισμό ανιόντος υπεροξειδίου από

ουδετερόφιλα κύτταρα αρουραίου και παρουσίασε αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης, ενώ ανέστειλλε και την ανάπτυξη κοκκιώματος σε ποντίκια. Από τα ευρήματα αυτά, συνάγεται το συμπέρασμα ότι οι μεταβολίτες του *C. laurifolius* μπορούν να συνεισφέρουν στην αποτελεσματικότητα έναντι φλεγμονωδών διαταραχών (Sadhu et al., 2006).

Ακόμα, απομονωμένες ουσίες από το *Cistus monspeliensis* και τη ρητίνη του *Cistus creticus* subsp. *creticus* αξιολογήθηκαν έναντι των προμαστιγοτών του *Leishmania donovani*, τα οποία αποτελούν τον αιτιολογικό παράγοντα για τη σπλαχνική λεισμανίαση. Μεταξύ των ουσιών που μελετήθηκαν, η 18-ακετοξυ-*cis*-κλεροδ-3-εν-15-όλη επέδειξε την πιο ισχυρή και επιλεκτική αντιλεϊσμανιακή δραστηριότητα (Fokialakis et al., 2006).

Τέλος, σε μια πρόσφατη μελέτη, τόσο οι προανθοκυανιδίνες όσο και το υδατικό εκχύλισμα του *C. salviifolius* έδειξαν ανασταλτική επίδραση στις κυκλοξυγενάσες COX-1, COX-2, επιβεβαιώνοντας την αντιφλεγμονώδη παραδοσιακή του χρήση (QaDan et al., 2011).

Υλικά και μέθοδοι

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο περιγράφονται συνοπτικά τα υλικά, οι μέθοδοι και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την υλοποίηση της παρούσας εργασίας.

4. Μέθοδοι εκχύλισης

4.1 Επιταχυνόμενη εκχύλιση (*Accelerated Solvent Extraction-ASE 300*)

Η επιταχυνόμενη εκχύλιση ή εκχύλιση υπό πίεση, γνωστή με τα αρχικά PSE (Pressurized Solvent Extraction) ή ASE (Accelerated Solvent Extraction) είναι μια τεχνική στερεής - υγρής εκχύλισης κατά την οποία χρησιμοποιείται ένας διαλύτης, υπό πίεση και σε υψηλή θερμοκρασία για την παραλαβή των συστατικών από μια στερεή ή ημι-στερεή πρώτη ύλη. Σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές στερεής - υγρής εκχύλισης που χρησιμοποιούνται, η τεχνική ASE επιτρέπει τη σημαντική μείωση της ποσότητας διαλύτη που απαιτείται, την ελάττωση των χρόνων της εκχύλισης καθώς και την αυτοματοποίηση της διαδικασίας, εξασφαλίζοντας έτσι τη λήψη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων (Richter et al., 1996).

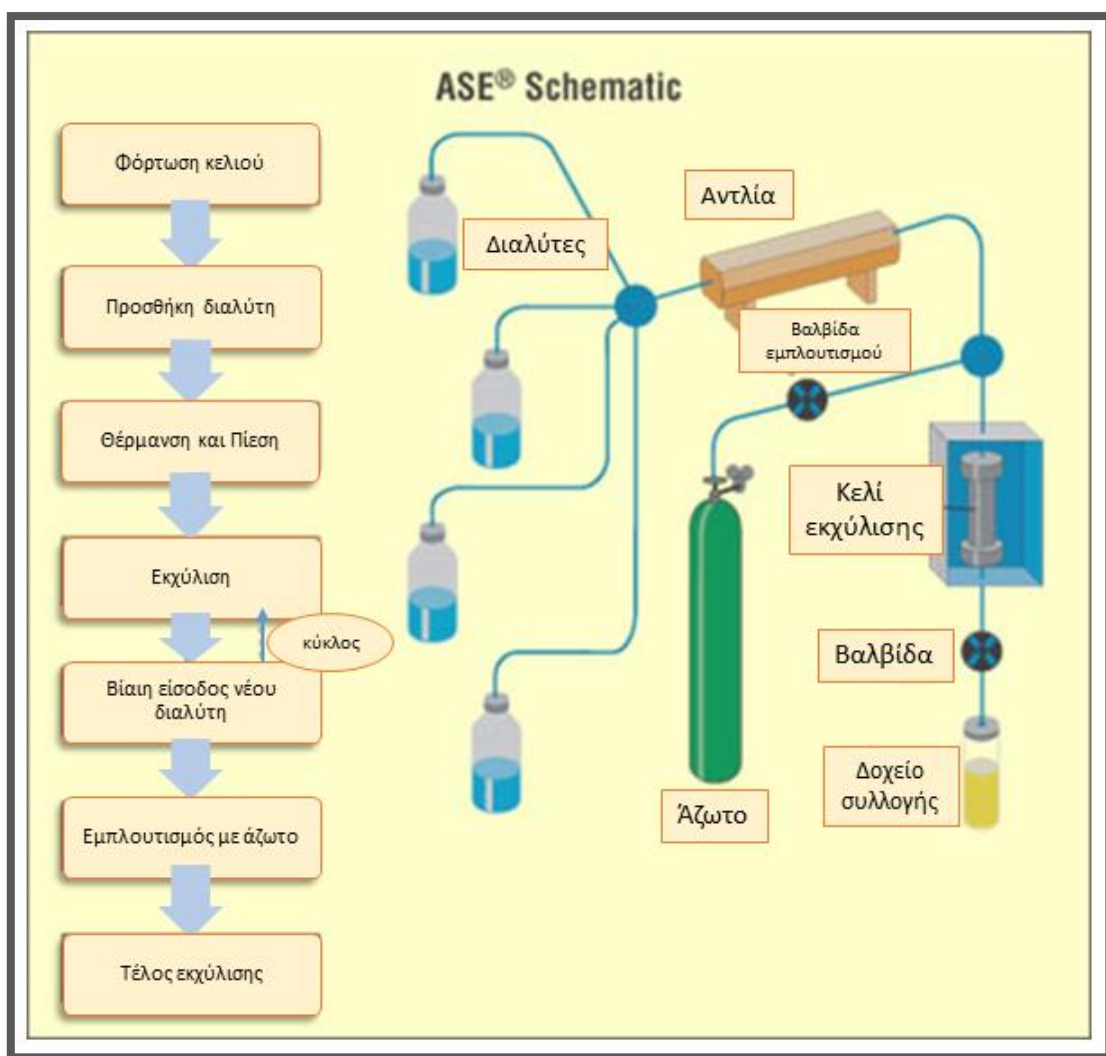
Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE 300 της εταιρίας Dionex Corporation (France). Με σκοπό την παραλαβή των εκχυλισμάτων από φυτικά είδη μία ποσότητα

δείγματος μεταφέρθηκε σε δοχείο εκχύλισης (κελί) το οποίο γεμίζει με υγρό εκχύλισης και

πραγματοποιείται στατική εκχύλιση υπό συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (50 °C - 200 °C) και πίεσης (500 - 3000 psi) για σύντομες χρονικές περιόδους (5-10 λεπτά). Αδρανές αέριο (συνήθως άζωτο) χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση του εκχυλίσματος από το δοχείο εκχύλισης και τη συλλογή του σε ειδικό δοχείο το οποίο είναι γνωστό ως δοχείο συλλογής (Εικόνα 23).



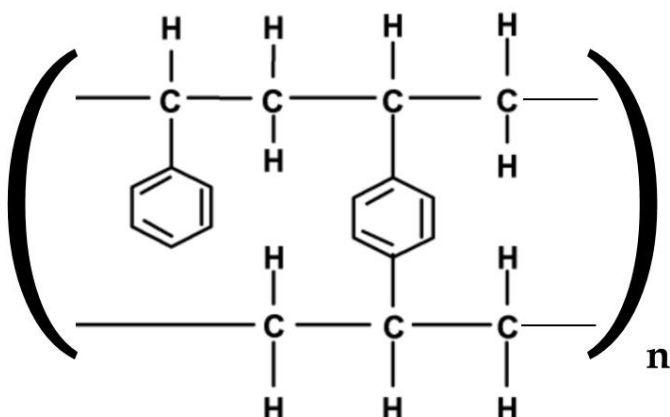
Εικόνα 23 Συσκευή επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE



Εικόνα 24 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE. Προσαρμογή από Baldursdóttir et al., 2011 (Baldursdóttir, 2011)

Υπάρχουν δύο βασικοί λόγοι για τους οποίους η χρήση υγρών διαλυτών σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις δίνουν ενισχυμένη απόδοση σε σύγκριση με τις κλασικές συνθήκες εκχυλίσες σε θερμοκρασία δωματίου και ατμοσφαιρική πίεση: i) η αυξημένη διαλυτική ικανότητα των διαλυτών και ii) η διευκόλυνση διείσδυσης του διαλύτη μέσα στο εκχυλιζόμενο υλικό. Αν ασκηθεί επαρκής πίεση στον διαλύτη κατά τη διάρκεια των εκχυλίσεων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν θερμοκρασίες πάνω από το σημείο βρασμού. Η αυξημένη πίεση ωθεί τον διαλύτη σε περιοχές του δείγματος που κανονικά δεν θα έρχονταν σε επαφή με το διαλυτικό μέσο χρησιμοποιώντας ατμοσφαιρικές συνθήκες (Richter et al., 1996).

4.2 Ρητίνες Προσρόφησης



Εικόνα 25 Δομή πολυμερούς XAD-4

Οι ρητίνες είναι πολυμερή υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται ως στατική φάση (με κινητή φάση το διαλύτη που είναι διαλυμένο το προς ανάλυση δείγμα) και παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο συγγένειας με μόρια με διπλούς

δεσμούς ή με δισδιάστατα αρωματικά συστήματα. Αυτή η

ιδιότητα τους, τα καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμα μέσα για την κατακράτηση πολλών διαφορετικών τύπων φυσικών προϊόντων όπως των πολυφαινόλων. Τα προσροφητικά πολυμερή έχουν μεγάλες πορώδεις δομές, κυρίως στυρενικού ή ακρυλικού τύπου, των οποίων οι εσωτερικές επιφάνειες μπορούν και προσροφούν μόρια και στη συνέχεια να προκαλείται η εκροή τους, ανάλογα με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται. Στις περισσότερες των περιπτώσεων οι επιθυμητές ουσίες βρίσκονται διαλυμένες στο νερό ή μπορεί να διαλύονται σε μείγματα νερού-αλκοόλης. Οι συνήθεις τεχνικές χρήσης των ρητινών προσροφήσεως είναι η τεχνική λουτρού και η τεχνική στήλης. Κατά την τεχνική λουτρού, η ρητίνη τοποθετείται μαζί με το διάλυμα του δείγματος υπό συνεχή ανάδευση για ορισμένο χρονικό διάστημα. Κατά την τεχνική της στήλης, το διάλυμα κινείται κατά μήκος της στήλης που περιέχει τον ειδικό τύπο και την κατάλληλη ποσότητα της προσροφητικής ρητίνης. Και στις δύο περιπτώσεις, τα επιθυμητά μόρια (π.χ. πολυφαινόλες) επιλεκτικά προσροφώνται στην επιφάνεια της ρητίνης. Στη συνέχεια η ρητίνη ξεπλένεται με ένα λιγότερο πολικό διαλύτη (π.χ. αιθανόλη), οπότε τα προσροφημένα μόρια εισέρχονται στην κινητή φάση και έτσι ανακτώνται στο κλάσμα που εκρέει από τη ρητίνη. Τέλος, η ρητίνη απομακρύνεται με διήθηση, απόχυση ή φυγοκέντριση και αναγεννάται για επαναχρησιμοποίηση.

Ένα σύνολο παραγόντων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την επιλογή των κατάλληλων προσροφητικών μέσων: ο ρυθμός και η ικανότητα προσρόφησης της ρητίνης, η εκλεκτικότητα για το επιθυμητό προϊόν και το κόστος του προσροφητικού υλικού και της λειτουργίας αναγέννησής του. Η κινητική της προσρόφησης επηρεάζει άμεσα τον

απαιτούμενο χρόνο επαφής μεταξύ του διαλύματος που περιέχει τα προϊόντα στόχους και του προσροφητή. Τρεις παράμετροι επηρεάζουν την ικανότητα δέσμευσης μιας ρητίνης για ένα συγκεκριμένο υλικό: η ηλεκτρική διπολική ροπή, το μέγεθος του πόρου και η επιφάνεια προσρόφησης. Η ικανότητα προσρόφησης, η εκλεκτικότητα και η πολυπλοκότητα της λειτουργίας αναγέννησης εξαρτώνται από τον τύπο του στερεού προσροφητικού που χρησιμοποιείται. Το μέγεθος των κόκκων της ρητίνης πρέπει να είναι αρκετά μικρό, ώστε η επιφάνεια επαφής να είναι μεγάλη, αλλά όχι πάρα πολύ μικρό, ώστε η ταχύτητα ροής στην περίπτωση χρησιμοποίησης στήλης να είναι ικανοποιητική. Οι διακλαδώσεις στο συμπολυμερές μόριο της ρητίνης συνήθως συνίστανται από διβινυλοβενζόλιο ή φορμαλδεΐδη. Ο αριθμός διακλαδώσεων μιας ρητίνης (degree of cross-linkage), ο οποίος εκφράζεται ως εκατοστιαία περιεκτικότητα σε διβινυλοβενζόλιο και είναι συνήθως 8-10, επηρεάζει δραστικά την συμπεριφορά της. Αύξησή του συνεπάγεται αύξηση της συνεκτικότητας της ρητίνης και συνεπώς μείωση της διογκώσεώς της κατά την επαφή με νερό, μείωση του πορώδους και της διαλυτότητας, μείωση της ταχύτητας ροής διαμέσου της στήλης, αύξηση της ανταλλακτικής χωρητικότητας και μείωση της ταχύτητας προσροφήσεως. Ουσιώδες χαρακτηριστικό γνώρισμα των ρητινών είναι και η δυνατότητα αναγέννησής τους και συνεπώς η επαναχρησιμοποίησή τους (Raganati et al., 2018).

Οι μη πολικές ρητίνες XAD χρησιμοποιούνται γενικά για την προσρόφηση οργανικών ουσιών από υδατικά συστήματα και πολικούς διαλύτες. Οι περισσότερες ρητίνες XAD είναι μη πολικές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα εύρος τιμών pH 0-14, με μέγιστη θερμοκρασία χρήσης τους 250 °C.

Συνήθως προτείνεται:

1. για σχετικά χαμηλό μοριακό βάρος (MW), XAD-4
2. για μικρά έως μεσαία MW, XAD-16.
3. για σχετικά μεγάλες οργανικές ενώσεις MW, X1180.

Το Amberlite XAD 4 είναι ένα πολυμερές προσροφητικό, το οποίο διατίθεται εμπορικά με τη μορφή λευκών αδιάλυτων σφαιριδίων. Είναι ένα μη ιονικό, σταυροειδώς συνδεδεμένο πολυμερές, το οποίο οφείλει τις ιδιότητες προσρόφησης του στη μακρόπορη δομή του, στη μεγάλη προσροφητική του επιφάνεια και στην αρωματική φύση της επιφάνειάς του. Αυτή η δομή (Εικόνα 25) δίνει στο προσροφητικό πολυμερές Amberlite XAD 4 εξαιρετική φυσική, χημική και θερμική σταθερότητα. Το πολυμερές Amberlite XAD 4 μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων, σε στήλες ή λουτρά, για την

προσρόφηση ακόμα και υδρόφοβων μορίων από πολικούς διαλύτες ή πτητικών οργανικών ενώσεων από ρεύματα ατμών. Η χαρακτηριστική κατανομή μεγέθους πόρων καθιστά το Amberlite XAD 4 μια εξαιρετική επιλογή για την προσρόφηση οργανικών ουσιών σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους (Sulaymon and Ebrahim, 2010).

Εφαρμογές ρητίνης XAD-4:

- ✓ Απομάκρυνση οργανικών ρύπων από υδατικά απόβλητα, υπόγεια ύδατα και ρεύματα ατμών.
- ✓ Ανάκτηση / ανακύκλωση φαινολικών και αρωματικών ενώσεων.
- ✓ Απομάκρυνση χλωριωμένων διαλυτών, ζιζανιοκτόνων και παρασιτοκτόνων από υδατικά ρεύματα.

Πειραματική διαδικασία:

1. Δέσμευση των περιεχομένων πολυφαινολών από την εξειδικευμένη προσροφητική ρητίνη
2. Ανάκτηση των πολυφαινολών από την ρητίνη με χρήση οργανικού διαλύτη
3. Παραλαβή του μίγματος πολυφαινολών μέσω απομάκρυνσης του οργανικού διαλύτη

Πίνακας 8 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ρητίνης Amberlite XAD-4

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

5. Χρωματογραφικές τεχνικές

Με σκοπό τον έλεγχο του χημικού φορτίου των φυτικών εκχυλισμάτων καθώς και για την απομόνωση των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών του, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες χρωματογραφικές τεχνικές:

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

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography - TLC), αποτελεί μία χρωματογραφική μέθοδο που χρησιμοποιείται τόσο για τον εντοπισμό, όσο και για την ταυτοποίηση, το διαχωρισμό και τον έλεγχο συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων (Jork et al., 1990).

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας στηρίζεται στην αρχή προσρόφησης (adsorption), κατά την οποία μία ουσία μεταφέρεται και συσσωρεύεται από ένα ρευστό στην επιφάνεια ενός στερεού. Κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο, γίνεται χρήση μιας μεταλλικής, γυάλινης ή πλαστικής πλάκας επικαλυμμένης με προσροφητικά υλικά, όπως το διοξείδιο του πυριτίου, το οξείδιο του αλουμινίου και την κυτταρίνη (στατική φάση).

Πιο συγκεκριμένα για τη παρούσα εργασία έγινε χρήση πλακών silica gel 60 F-254 Merck:

- Γέλης οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20 cm, πάχους στιβάδας 0 - 1 mm (αναλυτική TLC κανονικής φάσεως)
- Γέλης οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως (RP-18 F254S) με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20 cm, πάχος στιβάδας 0.25 mm (αναλυτική TLC αντιστρόφου φάσεως)

Μερικά μικρόλιτρα διαλυμάτων των προς ανάλυση δειγμάτων τοποθετούνται προσεκτικά στην επιφάνεια της πλάκας ("spotting") και στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται σε έναν θάλαμο ο οποίος περιέχει το διαλύτη (ή το μείγμα διαλυτών) ανάπτυξης (κινητή φάση). Με το πέρασμα του χρόνου η κινητή φάση ανέρχεται σταδιακά λόγω τριχοειδικών φαινομένων και κινείται πάνω στην πλάκα παρασύροντας τα συστατικά του δείγματος. Οι μεμονωμένες ουσίες τείνουν να κατανέμονται σε διαφορετικές ζώνες της πλάκας, με τις πιο ισχυρά προσροφούμενες να διατηρούνται στη βάση και εκείνες με μικρότερη συγγένεια με το προσροφητικό μέσο σε υψηλότερα επίπεδα (Mann and Saunders, 1960).

Όταν το μέτωπο του διαλύτη έχει προχωρήσει επαρκώς κατά μήκος της πλάκας και τα συστατικά του δείγματος έχουν διαχωριστεί, ακολουθεί η παρατήρηση της πλάκας στο ορατό, με τη χρήση υπεριώδους φωτός (στα 254 nm και 366 nm) και μετά την εμφάνιση μετηχρήση ειδικών αντιδραστηρίων (πχ. αντιδραστήριο εμφάνισης θειικής βανιλίνης, αντιδραστήριο Dragendorff, νινυδρίνης κ.ά.). Το μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης, παρασκευάζεται με την ανάμειξη ίσων όγκων διαλύματος 5% βανιλίνη σε μεθανόλη και

5% πυκνού θειικού οξέος (π. H₂SO₄) σε μεθανόλη λίγο πριν τον ψεκασμό και το χρωματογράφημα θερμαίνεται για 5 min στους 105 °C. (Jork et al., 1990).

Καθώς κάθε κηλίδα που αναπτύσσεται πάνω στην πλάκα αντιστοιχεί σε διαφορετική ένωση (διαφορετικός βαθμός προσρόφησης ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της κάθε ουσίας), δίνεται η δυνατότητα ταυτοποίησης των ενώσεων λόγω της μοναδικότητας τους, μέσω του συντελεστή κατακράτησης (retention factor). Ο συντελεστής κατακράτησης υπολογίζεται από τον τύπο:

$$Rf = \frac{\alpha}{\beta}$$

Όπου *Rf*: συντελεστής κατακράτησης (retention factor)

α = η απόσταση του κέντρου της κηλίδας από το σημείο εκκίνησής της πάνω στην πλάκα και

β = η απόσταση του σημείου εκκίνησης από το μέτωπο του διαλύτη (Dallas, 1965).

5.2 Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Preparative Thin Layer Chromatography – Prep_TLC)

Η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας διαφέρει από την αναλυτική μέθοδο TLC ως προς το πάχος της απορροφητικής στιβάδας, το οποίο είναι τυπικά περίπου 0.1 – 0.25 mm για αναλυτικούς σκοπούς και 0.5 – 2.0 mm για παρασκευαστική TLC.

Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση των παρακάτω πλακών:

- Γέλης οξειδίου του πυριτίου με δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες 20 x 20 cm. Πάχος στιβάδας 0.25 mm (παρασκευαστική TLC)
- Γέλης οξειδίου του πυριτίου αντιστρόφου φάσεως (RP-18) με δείκτη φθορισμού σε γυάλινες πλάκες 10 x 20 cm. Πάχος στιβάδας 0.25 mm (παρασκευαστική TLC).

Η παρασκευαστική αυτή χρωματογραφία αποτελεί μια χρήσιμη τεχνική για την επεξεργασία μικρών ποσοτήτων δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, μικρή ποσότητα δείγματος (μέχρι 100 mg, αναλόγως το πάχος των διαθέσιμων πλακών) εναποτίθεται σε μία οριζόντια λεπτή γραμμή στη βάση της πλάκας και η πλάκα βυθίζεται στο κατάλληλο σύστημα ανάπτυξης όπως αναφέρθηκε ήδη. Το επιθυμητό προς απομόνωση συστατικό οπτικοποιείται -ιδανικά- με υπεριώδη ακτινοβολία και επισημαίνεται με ένα μολύβι. Μια

λεπίδα ξυραφιού χρησιμοποιείται για την απόξεση της στοιβάδας του πυριτίου, το οποίο φέρει προσροφημένο το προϊόν, από την πλάκα. Το διοξείδιο του πυριτίου τοποθετείται σε μια κωνική κενού με πορώδες χωνί και εκπλένεται με έναν σχετικά άπολο διαλύτη (όπως το διχλωρομεθάνιο ή μίγματα αυτού με μεθανόλη) στην περίπτωση χρωματογραφίας κανονικής φάσης, ενώ με έναν πολικό διαλύτη (όπως η μεθανόλη) στην περίπτωση χρήσης πλάκας αντιστρόφου φάσεως. Το καθαρό προϊόν μπορεί στη συνέχεια να παραληφθεί από το διήθημα μετά από απομάκρυνση του διαλύτη με απόσταξη υπό κενό.

5.3 Χρωματογραφία Λεπτής στιβάδας Υψηλής απόδοσης (High Performance Preparative Thin Layer Chromatography – HPTLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC) είναι η πιο προηγμένη μορφή της TLC και περιλαμβάνει τη χρήση χρωματογραφικών πλακών μέγιστης απόδοσης διαχωρισμού και την χρήση σύγχρονων οργάνων για όλα τα στάδια της διαδικασίας απεικόνισης των χρωματογραφημάτων.

Ο αυτοματισμός είναι χρήσιμος για την αποφυγή λαθών που οφείλονται στον ανθρώπινο παράγοντα, καθώς λίγα μόνο μL ελεγμένης συγκέντρωσης του δείγματος εναποτίθενται μέσω μιας σύριγγας στην χρωματογραφική πλάκα. Παράλληλα, η αυτοματοποίηση των διαφόρων βημάτων δίνει τη δυνατότητα βελτιστοποίησης της επιτευχθείσας ανάλυσης, καθώς και την επίτευξη ποσοτικών μετρήσεων με εξαιρετική ακρίβεια.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνουν τόσο την ταχύτερη ανάλυση (3 - 20 λεπτά για βέλτιστο διαχωρισμό), όσο και την πολλαπλάσια ευαισθησία ανίχνευσης σε σύγκριση με την κλασική TLC. Τέλος, τα αποτελέσματα είναι 100% επαναλήψιμα.

Η μέθοδος HPTLC προσφέρει ανώτερη απόδοση διαχωρισμού για την ποιοτική και ποσοτική αξιολόγηση εξαιρετικά πολύπλοκων δειγμάτων σε:

- Φαρμακευτικούς ελέγχους ποιότητας αναλύοντας την καθαρότητα πολλών φαρμακευτικών σκευασμάτων.
- Ανάλυση φυτικών εκχυλισμάτων καθώς αποτελεί μια ταχεία, συγκριτικά απλή, επαναλήψιμη και εξαιρετικά ευέλικτη μέθοδο.

Μία από τις πιο συχνές χρήσεις της HPTLC είναι η απεικόνιση του δακτυλικού αποτυπώματος (fingerprint). Ένα δακτυλικό αποτύπωμα αποτελεί την ατομική

χρωματογραφική διαδρομή που αντιπροσωπεύει ένα μίγμα οργανικών ουσιών. Με τη μελέτη των δακτυλικών αυτών αποτυπωμάτων, είναι δυνατόν να γίνει η σωστή ταυτοποίηση του φυτικού υλικού. Η ανάλυση δακτυλικών αποτυπωμάτων με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC) έχει γίνει το πιο ισχυρό εργαλείο για τον ποιοτικό έλεγχο των φυτοθεραπευτικών σκευασμάτων λόγω της απλότητας και της αξιοπιστίας της. Μπορεί να χρησιμεύσει τόσο ως εργαλείο για τον εντοπισμό, όσο και για την εξακρίβωση της γνησιότητας και τον ποιοτικό έλεγχο των βοτανικών φαρμάκων. Επιπλέον, το βελτιστοποιημένο χρωματογραφικό αποτύπωμα δεν αποτελεί μόνο ένα εναλλακτικό αναλυτικό εργαλείο για τον έλεγχο ποιότητας, αλλά και μια προσέγγιση της ποικιλίας των χημικών συστατικών των φαρμάκων φυτικής προέλευσης και τη διατήρηση αυτής της βάσης δεδομένων (data base) για περαιτέρω φυτοχημικές μελέτες. Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα μελέτη περιλαμβάνει τις ακόλουθες συσκευές:

- CAMAG Linomat 5 για την εφαρμογή του δείγματος.
- CAMAG chamber για την ανάπτυξη της χρωματογραφικής πλάκας
- CAMAG TLC Visualizer για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμης εικόνας στα 254 nm, 366 nm και το ορατό.
- CAMAG VisionCat και WinCat λογισμικά για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.

5.4 Χρωματογραφία στήλης με χρήση *Silica Gel* ως πληρωτικό υλικό

Το πυριτικό πήγμα ή γέλη πυριτίου (silica gel) είναι μια άμορφη και πορώδης μορφή διοξειδίου του πυριτίου, που χαρακτηρίζεται από ένα ακανόνιστο τριδιάστατο εναλλασσόμενο πλέγμα που αποτελείται από πυρίτιο και άτομα οξυγόνου με κενά και πόρους κλίμακας νανομέτρου.

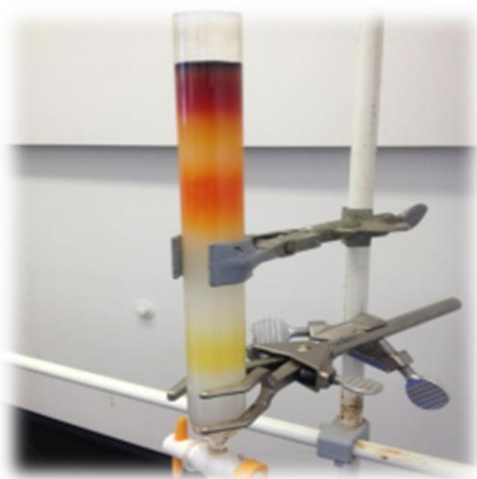
Στη χημεία, η σίλικα χρησιμοποιείται ως στατική φάση στη χρωματογραφία στήλης, και αποτελείται συνήθως από σωματίδια μεγέθους 40 - 63 μm . Διαφορετικά μεγέθη σωματιδίων χρησιμοποιούνται για διαφορετικά είδη χρωματογραφίας στήλης καθώς το μέγεθος σωματιδίων σχετίζεται με την επιφάνεια. Κατά τη χρωματογραφία κανονικής φάσης με τη χρήση της γέλης πυριτίου, τα μη πολικά συστατικά τείνουν να εκκλούνται πριν από τα πολικά. Αντίθετα, όταν υδρόφοβες ομάδες (όπως ομάδες C_{18}) συνδέονται με τις υδροξυλομάδες της γέλης πυριτίου, τα πολικά συστατικά εκκλούνται πρώτα και η μέθοδος

αναφέρεται ως χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (J. B. Peri and A. L. Hensley, 1968). Για την υλοποίηση της παρούσας μελέτης έγινε χρήση Silica gel 40-60 μm , 60A (Acros Organics, USA).

5.5 Χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού (Sephadex LH-20)

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

Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (molecular exclusion chromatography), είναι μία χρωματογραφική μέθοδος κατά την οποία τα μόρια του δείγματος διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους, με τα μεγάλα μόρια να εξέρχονται πρώτα. Η χρωματογραφία αυτή είναι μια χρωματογραφία στήλης με στερεή στατική φάση και υγρή κινητή φάση (υδατικό ή οργανικό διαλύτη). Ο διαχωρισμός των ενώσεων γίνεται κυρίως σε στήλες που έχουν σαν υλικό πλήρωσης ένα άκαμπτο πορώδες υλικό (γέλη, gel) το οποίο αποτελείται από μικρά



σφαιρίδια. Οι διάφορες ποικιλίες των γελών διαχωρίζουν τα μόρια ως προς το μοριακό τους μέγεθος, με τη διαδικασία του κοσκινίσματος (sieving) ή της διήθησης (filtration).

Οι γέλες έχουν πολύ ανοιχτά τρισδιάστατα επίπεδα πλέγματα που σχηματίζονται με διασταυρούμενους συνδυασμούς από μεγάλες αλυσίδες. Τα υλικά αυτά έχουν την ικανότητα να προσροφούν κυρίως πολικούς διαλύτες, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο διάκενα.

Ανάλογα με την έκταση των **Εικόνα 26** Προσομοίωση στήλης διασταυρούμενων δεσμών της γέλης Sephadex LH-20 υπάρχει ένα οριακό μέγεθος για το μόριο που μπορεί να εισχωρήσει στο δίκτυό της. Όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος του μορίου, τόσο πιο γρήγορα εξέρχεται από την στήλη, καθώς δεν παγιδεύεται στη γέλη και επομένως δεν επιβραδύνεται η κάθοδός του μέσα στη στήλη. Επιλέγοντας το κατάλληλο είδος γέλης δίνεται η δυνατότητα διαχωρισμού μορίων με εύρος βάρους από λίγα μέχρι και χιλιάδες Daltons (Healthcare, 2010).

Το πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20, αποτελεί ένα χρωματογραφικό μέσο που στηρίζεται στην αρχή μεθόδου του μοριακού αποκλεισμού. Είναι ένα κοκκώδες υλικό που αποτελείται

από δεξτράνιο σταυρωτά συνδεδεμένο, το οποίο έχει υδροξυπροπυλιωθεί αποκτώντας έτσι τόσο υδρόφιλο όσο και λιπόφιλο χαρακτήρα. Το Sephadex LH-20 είναι ένα μέσο κατάλληλα σχεδιασμένο για το διαχωρισμό φυσικών προϊόντων με βάση το μοριακό τους βάρος και με την επιλογή των κατάλληλων διαλυτών αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για το διαχωρισμό δευτερογενών μεταβολιτών από φυτικά εκχυλίσματα.

Το Sephadex LH-20 χαρακτηρίζεται από:

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

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έγινε χρήση του χρωματογραφικού υλικού Sephadex LH-20 (γέλη υδροξυπροπυλιωμένης δεξτράνης (Pharmacia Fine Chemicals)) με μέγεθος κόκκων 25-100 μ .

5.6 Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρωση (FCPC)

Η χρωματογραφία κατ' αντιρροή (CCC ή Countercurrent Chromatography), είναι μια υγρή – υγρή χρωματογραφική μέθοδος διαχωρισμού, η οποία βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο μη αναμειγμένων υγρών φάσεων (διφασικά συστήματα διαλυτών). Υπάρχουν δύο τύποι εμπορικά διαθέσιμων συσκευών CCC, οι υδροδυναμικές και οι υδροστατικές. Το υδροδυναμικό CCC χρησιμοποιεί ένα πεδίο μεταβλητής βαρύτητας που παράγεται από έναν μηχανισμό περιστροφής δύο αξόνων και από μία περιστροφική



Εικόνα 27 CPC της KROMATON

διάταξη χωρίς σφράγιση για την στήλη. Λόγω της κίνησης των πηνίων της συσκευής, το φυγόκεντρο πεδίο αλλάζει σε ένταση και κατεύθυνση. Έτσι εναλλάξ ζώνες διαχωρισμού και ανάμιξης των δύο υγρών φάσεων εμφανίζονται στη στήλη. Αντίθετα, τα υδροστατικά μηχανήματα CCC χρησιμοποιούν ένα σταθερό πεδίο βαρύτητας που παράγεται από έναν μηχανισμό περιστροφής ενός άξονα και δύο περιστροφικές συνδέσεις στεγανοποίησης για

την είσοδο και την έξοδο της κινητής φάσης. Η κινητή φάση κινείται από κελί σε κελί και ρέει μέσω της στατικής φάσης κατά τη φυγόκεντρη κατεύθυνση. Η μεταφορά των συστατικών πραγματοποιείται σε κάθε κελί κατά τη χρονική περίοδο που οι δύο φάσεις βρίσκονται σε επαφή. Οι υδροστατικές συσκευές CCC είναι γνωστές ως συσκευές CPC (Centrifugal Partition Chromatography) (Bourdat-Deschamps et al., 2004).

Και στις δύο περιπτώσεις, οι διαλυμένες ουσίες διαχωρίζονται μέσα στη στήλη σύμφωνα με τον συντελεστή κατανομής τους (K_d), ο οποίος εκφράζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσής τους στην στατική φάση προς την συγκέντρωσή τους στην κινητή φάση:

$$K_d = \frac{C_a}{C_b}$$

Όπου:

K_d = συντελεστής κατανομής ουσίας

C_a = συγκέντρωση της ουσίας στη στατική φάση

C_b = συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση.

Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου αναφέρονται παρακάτω (Friesen et al., 2015):

- ✓ Τα αυτοματοποιημένα, σχετικά φιλικά προς το χρήστη όργανα έχουν σχεδιαστεί ειδικά για παρασκευαστική χρωματογραφία κατ' αντιστροφή με χαρακτηριστικά όπως χαμηλές πιέσεις, υψηλές ταχύτητες ροής και ευρύ φάσμα διαλυτών.
- ✓ Υπάρχουν διαθέσιμα όργανα αναλυτικής κλίμακας για την ανάπτυξη μεθόδων και μικρών διαχωρισμών.
- ✓ Η υγρή στατική φάση είναι πολύ λιγότερο δαπανηρή από τις περισσότερες στερεές στατικές φάσεις μειώνοντας έτσι το κόστος της ανάλυσης.
- ✓ Είναι εφικτή η απομόνωση τόσο μιας μόνο επιθυμητής ουσίας όσο και πολλών, οι οποίες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα πολικότητας. Οι ουσίες αυτές μπορούν να διαχωριστούν υπό την προϋπόθεση ότι αναπτύσσεται μια κατάλληλη μέθοδος. Για το σκοπό αυτό, οι μέθοδοι κανονικής και αντίστροφης φάσης διατίθενται απλά με εναλλαγή μεταξύ κινητών και στατικών φάσεων, πράγμα το οποίο δεν είναι εφικτό με στερεά μέσα.
- ✓ Η κατάλληλη επιλογή του συστήματος διαλυτών επιτρέπει την ταχύτερη και αποτελεσματικότερη ανάπτυξη των συνθηκών. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα ευρύ φάσμα οικονομικών και φιλικών προς το περιβάλλον διαλυτών.

✓ Η απλή μαθηματική μοντελοποίηση, με βάση τις τιμές K_d , που αντιπροσωπεύουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αναλυόμενων ουσιών, μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη του χρόνου κατακράτησης και στην ταυτοποίηση του αναλύτη προσδίδοντας στην τεχνική μεγάλη επαναληψιμότητα.

✓ Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται δημιουργούν ένα ήπιο χημικό περιβάλλον που ελαχιστοποιεί τον χημικό μετασχηματισμό των αναλυτών και προσφέρει ένα υψηλό επίπεδο καθαρισμού δευτερογενών μεταβολιτών και χημικών ουσιών μέχρι και 99 %.

✓ Η πλήρης ανάκτηση δειγμάτων είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την απομόνωση συστατικών που βρίσκονται σε μικρή ποσότητα και αποτελεί μία μέθοδο ιδανική για κλιμάκωση: μία απλή τεχνική διαχωρισμού / καθαρισμού ενώσεων προσαρμοσμένη σε δείγματα που κυμαίνονται από mg έως πολλά κιλά.

Σε μία χρωματογραφία τέτοιου είδους μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι έκλουσης για το διαχωρισμό από πολύπλοκα μίγματα:

➤ Ισοκρατική έκλουση (*isocratic elution mode*), η οποία χρησιμοποιεί σταθερή σύσταση διφασικού συστήματος καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας διαχωρισμού.

➤ Σταδιακή έκλουση (*stepwise elution*), στην σταδιακά αυξάνεται το ποσοστό του ενός διαλύτη με την πάροδο του χρόνου.

➤ Βαθμιδωτή έκλουση (*gradient elution*), χρησιμοποιεί μια σειρά διφασικών συστημάτων στη σειρά μεταβάλλοντας την πολικότητα της κινητής φάσης.

➤ Έκλουση-εξώθηση (*extrusion-elution*), στην οποία τη διαδικασία της κλασικής έκλουσης διαδέχεται η απομάκρυνση των ενώσεων που κατανέμονται σε μεγάλο βαθμό στη στατική φάση από τη στήλη με διοχέτευση της τελευταίας μετά από διακοπή της περιστροφής της στήλης.

Επιλογή κατάλληλου διφασικού συστήματος

Με σκοπό την επεξεργασία ενός πολύπλοκου φυτικού εκχυλίσματος, το διφασικό σύστημα διαλυτών πρέπει επίσης να επιλέγεται με βάση την ικανότητά του να διαλύει πλήρως το δείγμα, να κατανέμει ισομερώς τα συστατικά μεταξύ των μη αναμίξιμων φάσεων και να διατηρεί υψηλή υδροδυναμική σταθερότητα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κλασμάτωσης. Για το λόγο αυτό, προηγείται έλεγχος του προς επιλογή συστήματος, κατά τον οποίο προσομοιάζεται η διαδικασία που λαμβάνει χώρα στη στήλη FCPC σε

δοκιμαστικό σωλήνα, τόσο ως προς το σχηματισμό και το διαχωρισμό των φάσεων, όσο και ως προς τη διάλυση του δείγματος μέσα σε αυτές.



Εικόνα 28 Σχηματική απεικόνιση προετοιμασίας δείγματος με στόχο την επιλογή του κατάλληλου συστήματος διαλυτών.

Η προετοιμασία γίνεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν μικρή ποσότητα δείγματος (~ 10 mg) και στη συνέχεια προστίθενται οι διαλύτες σε κατάλληλες αναλογίες έτσι ώστε ο τελικός όγκος (περίπου 4 mL) να μην υπερβαίνει το 1/3 της συνολικής χωρητικότητας του δοκιμαστικού σωλήνα (Εικόνα 28). Στη συνέχεια τα δείγματα ανακινούνται έντονα σε Vortex και καταγράφεται ο χρόνος που απαιτείται για την ισορροπία των φάσεων, ο οποίος ιδανικά δεν πρέπει να ξεπερνά τα 30 δευτερόλεπτα. Για την αξιολόγηση του συστήματος ως προς την κατανομή των συστατικών του δείγματος στις δύο φάσεις, πραγματοποιείται στη συνέχεια χρωματογραφικός έλεγχος με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές, οι οποίες σχετίζονται με την επιλογή διφασικών συστημάτων. Εκτός από τα κλασικά διφασικά συστήματα, κάποιες μέθοδοι διαχωρισμού χρησιμοποιούν σύστημα τριών φάσεων διαλυτών, τα οποία χαρακτηρίζονται από περιορισμένο αριθμό συνδυασμών διαλυτών που οδηγούν σε σταθερές και ισορροπημένες μη αναμίξιμες φάσεις. Το σύστημα CPC έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον διαχωρισμό βιοδραστικών ενώσεων από χερσαία φυτά. Για

την υλοποίηση της συγκεκριμένης φυτοχημικής μελέτης χρησιμοποιήθηκε το CPC της εταιρείας KROMATON (Εικόνα 27).

6. Φασματοσκοπικές τεχνικές

6.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

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

Για την ταυτοποίηση και τον έλεγχο της καθαρότητας των μεταβολιτών που απομονώθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν συσκευές Varian 600 MHz, Avance III 600 MHz (Bruker), Bruker DRX 400 και Bruker 200 MHz.

Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) είναι εκφρασμένες σε ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως *s* (απλή), *brs* (ευρεία απλή), *d* (διπλή), *t* (τριπλή), *q* (τετραπλή), *dd* (διπλή-διπλή) και *m* (πολλαπλή), ενώ ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη των φασμάτων ήταν η δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD).

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες τεχνικές: φάσματα μίας διάστασης, ^1H -NMR

και φάσματα δύο διαστάσεων: COSY (Correlation Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) και HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

7. Αξιολόγηση χημικού φορτίου και δραστικότητας των εκχυλισμάτων

7.1 Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης

Οι ελεύθερες ρίζες και άλλες ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) παράγονται συνεχώς στο ανθρώπινο σώμα. Έχουν ενοχοποιηθεί για διάφορες παθολογικές καταστάσεις που περιλαμβάνουν καρδιαγγειακές παθήσεις, καρκίνο, νευρολογικές διαταραχές, διαβήτη, ισχαιμία και άλλες ασθένειες καθώς και τη γήρανση. Παρά την αποτελεσματικότητα των συνθετικών αντιοξειδωτικών, η χρήση τους συνδέεται με σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες για τον οργανισμό. Ως εκ τούτου, η χρήση εκχυλισμάτων φαρμακευτικών φυτών αποτελεί μια εναλλακτική λύση, καθώς έχουν ήδη καταδειχθεί οι σημαντικές τους αντιοξειδωτικές ιδιότητες και οι μειωμένες ανεπιθύμητες δράσεις τους. Με σκοπό τη διερεύνηση της αντιοξειδωτικής δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων των 5 ειδών *Cistus*, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ικανότητάς τους να εξουδετερώνουν την ελεύθερη ρίζα DPPH και την κατιονική ρίζα ABTS.

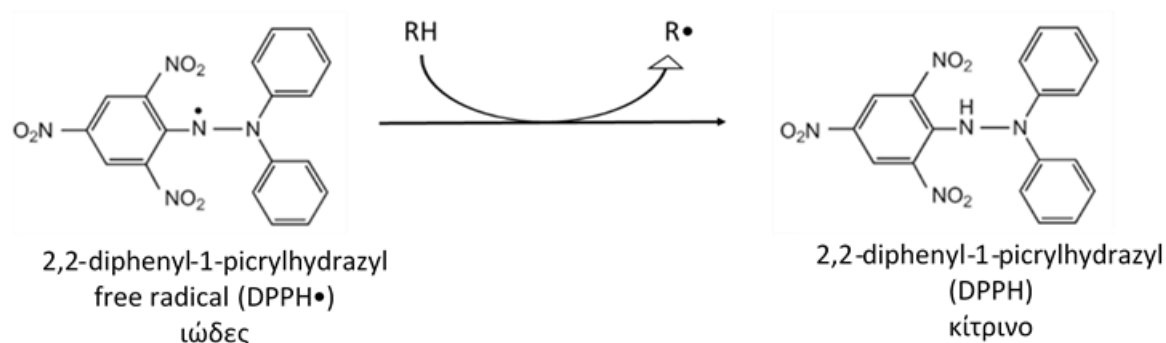
7.1.1 Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH

Η χρήση του DPPH αποτελεί έναν εύκολο και γρήγορο τρόπο αξιολόγησης αντιοξειδωτικών παραγόντων με φασματοφωτομετρία, καθιστώντας το ένα χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση διαφόρων προϊόντων. Χρησιμοποιείται ως επί τω πλείστον στη χημεία φυσικών προϊόντων για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων, κλασμάτων και απομονωμένων ουσιών.

Αρχή της μεθόδου

Το DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) είναι μια σταθερή ρίζα όπου το αλκοολικό του διάλυμα έχει χρώμα ιώδες με μέγιστη απορρόφηση στα 520 nm. Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή της ελεύθερης ρίζας DPPH• από αντιοξειδωτικούς παράγοντες, λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων από τα προς έλεγχο δείγματα στη ρίζα, προκαλώντας τον μεταχρωματισμό του ιώδους διαλύματος σε κίτρινο (Εικόνα 29). Η μείωση της απορρόφησης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μετριέται στα 517 nm, ενώ όσο

χαμηλότερη είναι η απορρόφηση του μίγματος τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος (Brand-Williams et al., 1995).



Εικόνα 29 Μηχανισμός της αντίδρασης αναγωγής του DPPH. RH: αντιοξειδωτικός παράγοντας.

Πειραματική πορεία

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων των ειδών *Cistus* αξιολογήθηκε με βάση το πρωτόκολλο των Lee, et al. 1998, προσαρμοσμένο σε πλάκες 96 θέσεων. Παρασκευάστηκε διάλυμα DPPH συγκέντρωσης $12,4 \times 10^{-3}$ w/v σε απόλυτη αιθανόλη το οποίο παρέμεινε σε σκοτεινό μέρος. Σε πλάκες 96 θέσεων τοποθετήθηκαν 10 μ L από το κάθε δείγμα διαλυμένο σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και 190 μ L διαλύματος DPPH. Ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 517 nm με τη χρήση συσκευής φωτομέτρησης Infinite M200 Pro TECAN (Tecan Group, Männedorf, Switzerland). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τυφλά για κάθε δείγμα, τα οποία δεν περιείχαν διάλυμα DPPH. Ως πρότυπος αντιοξειδωτικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε το γαλλικό οξύ (gallic acid) σε συγκέντρωση 100 μ g/mL.

Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{ικανότητα εξουδετέρωσης ρίζας DPPH (\%)} = [(A-B)-(C-D)] / (A-B) \times 100$$

A : Control (χωρίς δείγμα), B : Blank (χωρίς δείγμα και DPPH), C : δείγμα, D : τυφλό του δείγματος (χωρίς DPPH).

Τα δείγματα διαλύθηκαν σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και ελέγχθηκαν στις συγκεντρώσεις 200 μ g/mL και 100 μ g/mL (τελική συγκέντρωση), ενώ υπολογίστηκαν και οι τιμές IC₅₀ (η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για 50% αναστολή της

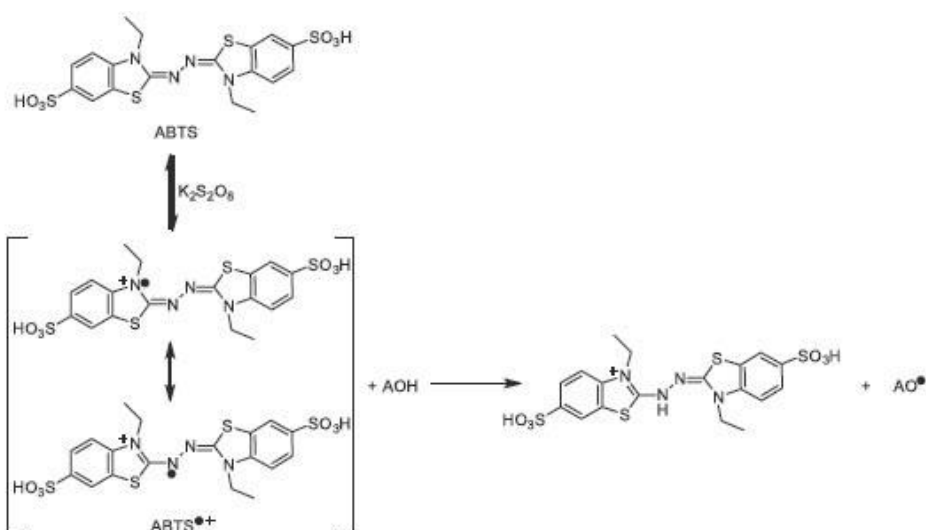
ελεύθερης ρίζας DPPH) για τα δείγματα που εμφάνισαν αξιόλογη ικανότητα εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας.

7.1.2 Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο ABTS

Η χρήση της κατιοντικής ρίζας ABTS [2,2'-αζινο-δισ-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)] αποτελεί μια ακόμη μέθοδο για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας διαλυμάτων, καθαρών ουσιών, φυτικών εκχυλισμάτων ακόμη και τροφίμων.

Αρχή μεθόδου

Μέσω της αντίδρασης ABTS και υπερθεϊκού καλίου ($K_2S_2O_8$) παράγεται η κατιοντική ρίζα του ABTS ($ABTS^{\bullet+}$) η οποία σε υδατικό διάλυμα χαρακτηρίζεται από σκούρο μπλε χρώμα με μέγιστο απορρόφησης σε διάφορα μήκη κύματος όπως 415 nm, 645 nm, 734 nm και 815 nm. Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή της ελεύθερης ρίζας $ABTS^{\bullet+}$ από αντιοξειδωτικούς παράγοντες, λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων ανάμεσα στη ρίζα και στα προς έλεγχο δείγματα, προκαλώντας τον αποχρωματισμό του σκούρου μπλε διαλύματος σε πιο ανοιχτές αποχρώσεις (Εικόνα 30). Η μείωση της απορρόφησης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μετρείται στα 734 nm, ενώ όσο χαμηλότερη είναι η απορρόφηση του μίγματος τόσο υψηλότερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος (Brand-Williams et al., 1995).



Εικόνα 30 Οξείδωση του ABTS από το υπερθεϊκό κάλλιο ($K_2S_2O_8$) για την παραλαβή της κατιοντικής ρίζας ($ABTS^{\bullet+}$) και η αντίδραση αναγωγής της. AOH: αντιοξειδωτικός παράγοντας.

Πειραματική πορεία

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων των ειδών *Cistus* αξιολογήθηκε με βάση το πρωτόκολλο των Wan *et al.*, 2011. Το ριζικό κατιόν ABTS (2,2'-αζινο-δις-(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) παρασκευάστηκε την προηγούμενη μέρα του πειράματος ως εξής: 10 mL ABTS συγκέντρωσης 7mM (36.02 mg σε 10 mL of H₂O) αναμίχθηκαν με 164 μL υπερθειικού καλλίου (K₂S₂O₈) 140 mM (37.84 mg σε 1 mL of H₂O) και αποθηκεύτηκε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Πριν τη χρήση, αυτό το διάλυμα αραιώθηκε με νερό (1:20) έως τη λήψη απορρόφησης 0.70 ± 0.02 στα 734 nm σε θερμοκρασία δωματίου (100 μL διαλύματος ABTS και 50 μL DMSO). Σε πλάκες 96 θέσεων τοποθετήθηκαν 100 μL του τελικού διαλύματος ABTS και 50 μL από κάθε δείγμα διαλυμένα σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 734 nm με τη χρήση συσκευής φωτομέτρησης Infinite M200 Pro TECAN (Tecan Group, Männedorf, Switzerland). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τυφλά για κάθε δείγμα, τα οποία δεν περιείχαν διάλυμα ABTS, ενώ ως πρότυπος αντιοξειδωτικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε το (6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλοχρωμαιο-2-καρβοξυλικό οξύ) (trolox) σε συγκέντρωση 8 μg/mL (50% ικανότητα εξουδετέρωσης).

Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{ικανότητα εξουδετέρωσης ρίζας ABTS (\%)} = [(A-B)-(C-D)] / (A-B) \times 100$$

A: Control (χωρίς δείγμα), B: Blank (χωρίς δείγμα και ABTS), C: δείγμα, D: τυφλό του δείγματος (χωρίς ABTS). Τα εκχυλίσματα αρχικά ελέγχθηκαν στις συγκεντρώσεις από 200 μg/mL έως 5.21 μg/mL (τελική συγκέντρωση) ενώ υπολογίστηκαν και οι τιμές IC₅₀ τους (η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για 50% αναστολή της ελεύθερης ρίζας ABTS).

7.1.3 Προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φαινόλες και φλαβονοειδή

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μια σημαντική κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών και παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην άμυνά τους έναντι των ελεύθερων ριζών. Τα διάφορα μέρη των φυτών (ρίζες, φύλλα, μίσχοι, άνθη και φρούτα) είναι συνήθως πλούσια

σε φαινολικές ενώσεις, όπως τα φλαβονοειδή, οι ταννίνες, τα στιλβένια, οι κουμαρίνες, οι λιγνάνες κ.ά.. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών οφείλονται στην ικανότητα οξειδοαναγωγής τους, η οποία τους επιτρέπει να δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, δότες υδρογόνου, κ.ά. Οι πολυφαινόλες αποτελούν σήμερα ένα θέμα έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος λόγω των ευεργετικών τους επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου. Εμφανίζονται σε μια ποικιλία φρούτων, λαχανικών, ξηρών καρπών, σπόρων, λουλουδιών, φλοιού, ποτών, ακόμη και ορισμένων παρασκευασμένων τροφίμων που έχουν ως βάση τους τα φυσικά προϊόντα. Το ενδιαφέρον για την έρευνα των πολυφαινολών από διάφορες φυσικές πηγές έχει αυξηθεί επειδή οι πολυφαινόλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιοξειδωτικά στη βιομηχανία τροφίμων και ωφελούν την ανθρώπινη υγεία με διάφορους τρόπους. Έχουν αναφερθεί ότι παρουσιάζουν αντικαρκινική, αντιθρομβωτική, αντιφλεγμονώδη, ανοσορυθμιστική, αντιμικροβιακή, αγγειοδιασταλτική και αναλγητική δράση. Οι ευεργετικές επιδράσεις των πολυφαινολών στην ανθρώπινη υγεία θα μπορούσαν να οφείλονται στις ιδιότητες δέσμευσης των ελεύθερων ριζών, εμποδίζοντας την επιβλαβή δράση αυτών στα κύτταρα.

7.1.3.1 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content - TPC)

Στα φαινολικά παράγωγα περιλαμβάνονται οι απλές φαινόλες, τα φαινολικά οξέα (παράγωγα βενζοϊκού και κινναμωμικού οξέος), οι κουμαρίνες, τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια, οι υδρολύσιμες και συμπυκνωμένες ταννίνες τα λιγνάνια κ.ά. Αυτές οι ενώσεις συγκαταλέγονται μεταξύ των πλέον διαδεδομένων δευτερογενών μεταβολιτών στο φυτικό βασίλειο, και δρουν κυρίως ως φυτοαλεξίνες, ως προσελκυστικά για επικονιαστές, ως χρωστικές διαφόρων τμημάτων των φυτών, ως αντιοξειδωτικά και ως προστατευτικά μέσα έναντι της υπερϊώδους ακτινοβολίας.

Αν και ο ποσοτικός προσδιορισμός των πολυφαινολών σε μίγματα είναι πολύπλοκος λόγω της δομικής πολυπλοκότητας και ποικιλομορφίας τους, αρκετές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό τους στα φυτικά εκχυλίσματα. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούν ειδικά αντιδραστήρια οξειδοαναγωγής για να σχηματίσουν ένα σύμπλεγμα το οποίο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με φασματοφωτομετρία ορατού φωτός.

Ανάμεσα σε αυτές τις μεθόδους, διαδεδομένη είναι η χρήση του αντιδραστηρίου Folin & Ciocalteu, η οποία περιγράφεται σε πολλές φαρμακοποιίες. Το αντιδραστήριο έχει

χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση του ολικού φαινολικού φορτίου σε φυσικά προϊόντα, ενώ το ίδιο δεν περιέχει φαινόλες.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην οξείδωση των φαινολών με ταυτόχρονη αναγωγή του διαλύματος φωσφορομολυβδενικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος (αντιδραστήριο Folin & Ciocalteu) προς το σχηματισμό φωσφορομολυβδενικού/φωσφοροβολφραμικού-φαινολικού συμπλόκου. Το τελευταίο χρωματίζεται μπλε σε αλκαλικό περιβάλλον, παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 765 nm, ενώ η ένταση της απορρόφησης είναι ανάλογη της συνολικής ποσότητας των φαινολικών ενώσεων. Τα φαινολικά συστατικά αντιδρούν με το αντιδραστήριο μόνο σε αλκαλικές συνθήκες και για το λόγο αυτό πραγματοποιείται ρύθμιση του pH στην τιμή 10 με διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Balentine et al., 1997). Γενικά, ως πρότυπη ένωση αναφοράς χρησιμοποιείται το γαλλικό οξύ και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg/mL) (Blainski et al., 2013; Magalhães et al., 2010).

Πειραματική πορεία

Για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού φορτίου σε πλάκες 96 θέσεων τοποθετήθηκαν 25 μL από κάθε δείγμα διαλυμένα σε DMSO (τελικής συγκέντρωσης 400 $\mu\text{g/mL}$), 125 μL διαλύματος Folin-Ciocalteu (10% σε απεσταγμένο νερό) και 100 μL διαλύματος Na_2CO_3 7,5% w/v σε απεσταγμένο νερό. Μετά από ανάμειξη τα δείγματα επώαστηκαν για 30 λεπτά στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στα 765 nm με τη χρήση συσκευής φωτομέτρησης Infinite M200 Pro TECAN (Tecan Group, Männedorf, Switzerland). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τυφλά για κάθε δείγμα, τα οποία δεν περιείχαν το αντιδραστήριο Folin & Ciocalteu. Ακολούθως κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος GA με πρότυπα διαλύματα σε DMSO συγκεντρώσεων από 100 $\mu\text{g/mL}$ έως 2.5 $\mu\text{g/mL}$, με την οποία υπολογίστηκαν τα ισοδύναμα γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalent, GAE) για κάθε δείγμα. Τα δείγματα τα οποία σημείωσαν απορρόφηση εκτός του ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης αναφοράς, ελέγχθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

7.1.3.2 Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (Total Flavonoid Content - TFC)

Τα φλαβονοειδή είναι ενώσεις με χαρακτηριστικό σκελετό 15 ατόμων άνθρακα (C₁₅) και σε αυτά περιλαμβάνονται οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβανόνες, οι ισοφλαβόνες και οι ανθοκυανιδίνες. Αυτά τα συστατικά παίζουν σημαντικό ρόλο για τα φυτά, από την προστασία τους από τα παράσιτα και τις ασθένειες μέχρι το χρωματισμό των άνθρων για την προσέλκυση εντόμων. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά και έχουν προκαλέσει το επιστημονικό ενδιαφέρον εξαιτίας των πιθανών ευεργετικών τους επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία και στην αντιμετώπιση ήπιων παθήσεων (Sayah et al., 2017). Η θέση των υδροξυλομάδων και άλλων χαρακτηριστικών υποκαταστατών στη δομή τους φαίνεται να είναι σημαντική για την εκδήλωση της αντιοξειδωτικής δράσης (Piluzza and Bullitta, 2011). Η πιο κοινά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου φυτικών εκχυλισμάτων και κλασμάτων σε φλαβονοειδή, περιλαμβάνει τη χρήση χλωριούχου αργιλίου.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή που στηρίζεται σε αντιδράσεις συμπλοκοποίησης μεταξύ μετάλλων και φλαβονοειδών. Συγκεκριμένα, σχηματίζεται σύμπλοκο μεταξύ του ιόντος αλουμινίου, Al (III) και των ομάδων καρβονυλίου και υδροξυλίου των φλαβονών και φλαβονόλων, που παράγει κίτρινο χρώμα.

Πειραματική πορεία

Για τον προσδιορισμό του συνολικού φορτίου φλαβονοειδών αρχικά σε πλάκες 96 θέσεων τοποθετήθηκαν 50 μ L από κάθε δείγμα διαλυμένα σε DMSO (τελικής συγκέντρωσης 400 μ g/mL), και έπειτα ακολούθησε η προσθήκη των αντιδραστηρίων με την εξής σειρά: 20 μ L διαλύματος AlCl₃ (1.8 % w/v AlCl₃·6 H₂O), 160 μ L EtOH και τέλος 20 μ L C₂H₃NaO₂ (820.3 mg σε 100 mL H₂O). Οι πλάκες επώασθηκαν για 40 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και μετά μετρήθηκε η απορρόφησή τους στα 415 nm με τη χρήση συσκευής φωτομέτρησης Infinite M200 Pro TECAN (Tecan Group, Männedorf, Switzerland). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τυφλά για κάθε δείγμα, τα οποία δεν περιείχαν τα διαλύματα AlCl₃ και ανθρακικού νατρίου. Ακολούθως κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς με

διαλύματα κερκετίνης (QU) σε DMSO συγκεντρώσεων από 200 µg/mL έως 1.25 µg/mL, με την οποία υπολογίστηκαν τα ισοδύναμα κερκετίνης (Quercetin Equivalent, QUE) για κάθε δείγμα. Τα δείγματα τα οποία σημείωσαν απορρόφηση εκτός του ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης αναφοράς, ελέγχθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Bag et al., 2015).

7.2 Αξιολόγηση αντιμικροβιακής δράσης

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ένα συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για την έρευνα και την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων από διάφορες πηγές και την αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής. Μετά την επανάσταση στην «χρυσή εποχή», όταν ανακαλύφθηκαν σχεδόν όλες οι ομάδες σημαντικών αντιβιοτικών (τετρακυκλίνες, κεφαλοσπορίνες, αμινογλυκοσίδες και μακρολίδες) και τη λύση που δόθηκε σε σημαντικά προβλήματα της χημειοθεραπείας στη δεκαετία του 1960, σήμερα φαίνεται ότι η αποτελεσματικότητά τους μειώνεται λόγω της αύξησης της μικροβιακής αντοχής. Για το λόγο αυτό, η ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών αποτελεί επιτακτική ανάγκη. Τα φυσικά προϊόντα εξακολουθούν να αποτελούν ακόμη και σήμερα μία από τις σημαντικότερες πηγές νέων ελπιδοφόρων ενώσεων οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη αποτελεσματικών φαρμάκων.

Μια ποικιλία εργαστηριακών μεθόδων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της *in vitro* αντιμικροβιακής δραστηριότητας ενός εκχυλίσματος ή μιας καθαρής ένωσης. Οι πιο γνωστές και βασικές μέθοδοι είναι οι μέθοδοι διάχυσης δίσκου και ζυμού ή αραιώσης με άγαρ. Άλλες μέθοδοι χρησιμοποιούνται ειδικά για αντιμυκητιασικές δοκιμές, όπως η τεχνική δηλητηριασμένης τροφής. Ακόμα, προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω το αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα ενός παράγοντα, συνιστάται η δοκιμή χρόνου θανάτωσης και οι κυτοφθορομετρικές μέθοδοι ροής, οι οποίες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη φύση του ανασταλτικού αποτελέσματος, δηλαδή αν η δράση είναι βακτηριοκτόνος ή βακτηριοστατική, αν εξαρτάται από το χρόνο ή από τη συγκέντρωση που επιδρά στον μικροοργανισμό.

Αρκετοί βιοπροσδιορισμοί είναι γνωστοί σήμερα και χρησιμοποιούνται ευρέως. Συνοπτικά οι *in vitro* μέθοδοι αναφέρονται παρακάτω:

Μέθοδοι διάχυσης

- Μέθοδος δίσκου άγαρ –διαχύσεως
- Αντιμικροβιακή βαθμιδωτή μέθοδος (Etest)

- Μέθοδος διάχυσης με άγαρ
- Μέθοδος διάχυσης βύσματος άγαρ
- Μέθοδος διασταύρωσης
- Μέθοδος δηλητηριασμένης τροφής

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) - βιοαυτογραφία

- Διάχυση με άγαρ
- Άμεση βιοαυτογραφία
- Βιοπροσδιορισμός επικάλυψης με άγαρ

Μέθοδοι αραίωσης

- Μέθοδος αραίωσης ζωμού
- Μέθοδος αραίωσης με άγαρ
- Δοκιμή χρόνου θανάτου (καμπύλη χρόνου θανάτου)
- Δοκιμή βιοφωταύγειας ATP
- Κυτταροφθορομετρική μέθοδος ροής

Στην παρούσα εργασία η αξιολόγηση της *in vitro* αντιμικροβιακής δραστηριότητας των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αραίωσης με άγαρ.

Αρχή μεθόδου

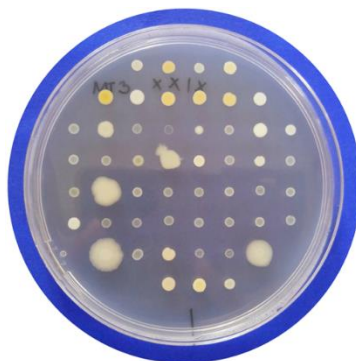
Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την ενσωμάτωση μεταβαλλόμενων επιθυμητών συγκεντρώσεων του αντιμικροβιακού παράγοντα σε άγαρ, ακολουθούμενο από τον εμβολιασμό ενός καθορισμένου μικροβιακού στελέχους πάνω στην επιφάνεια του θρεπτικού μέσου. Αυτή η τεχνική είναι κατάλληλη για δοκιμές τόσο αντιβακτηριακής όσο και αντιμυκητιασικής ευαισθησίας. Η αραίωση με άγαρ συνιστάται συχνά ως τυποποιημένη μέθοδος για ευαίσθητους μικροοργανισμούς όπως τα αναερόβια βακτήρια και τα είδη *Helicobacter* (Balouiri et al., 2016).

Πειραματική πορεία

Καλλιέργειες βακτηρίων

Χρησιμοποιήθηκαν (α) 49 βακτηριακά στελέχη, τα οποία αντιπροσωπεύουν 16 θετικά κατά Gram αερόβια είδη, ενώ κάθε στέλεχος επωάστηκε για 18 ώρες στους 37 °C σε ζωμό σόγιας τρυπτικής 48 (BioMerieux), και (β) 43 βακτηριακά στελέχη που αντιπροσωπεύουν έξι

Θετικά κατά Gram αερόλυτα αναερόβια είδη που επωάσθηκαν σε ζωμό TGYH σε αναερόβιες συνθήκες, ενώ ως μέσο ανάπτυξής τους για τα τρυβλία Petri χρησιμοποιήθηκε το Wilkins-Chalgren. Το εναιώρημα στελεχών *S. pneumoniae* παρασκευάστηκε απ' ευθείας από καλλιέργεια άγαρ, χωρίς χρήση ζωμού, εξαιτίας του κινδύνου αυτολύσεως.



Εικόνα 31 Τρυβλίο Petri για τον έλεγχο της αντιβακτηριακής δράσης των εκχυλισμάτων ειδών *Cistus*

Αντιβακτηριακή αξιολόγηση

Για κάθε δείγμα παρασκευάστηκε ένα τρυβλίο Petri με 1.75 mL αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού, 250 μ L διαλύματος από το κάθε δείγμα (αρχικής συγκέντρωσης 8 mg / mL σε DMSO) και 18 mL τήγματος άγαρ Mueller Hinton (BioMerieux) στους 50 ° C έως τελικού όγκου 20 mL (τελική συγκέντρωση 100 mg / L), τα οποία αναμειχθηκαν με το χέρι για ομογενοποίηση. Μετά την στερεοποίησή τους σε θερμοκρασία δωματίου, τα τρυβλία ξηράνθηκαν σε φούρνο στους 45 °C για 10 λεπτά. Οι τυφλοί έλεγχοι μικροβιακών καλλιεργειών παρασκευάστηκαν με 250 μ L DMSO ή μόνο με νερό υπό τις ίδιες συνθήκες, ενώ το DMSO αποδείχτηκε ως μη τοξικό υπό αυτές τις συνθήκες. Οι καλλιέργειες αραιώθηκαν σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό για να ληφθεί ένα εναιώρημα 10^7 UFC / mL και 1 μ L από κάθε εναιώρημα εφαρμόστηκε σε μέσο δοκιμής χρησιμοποιώντας έναν εμβολιαστή Steers. Το ενοφθάλμισμα ήταν περίπου 10^4 UFC / κηλίδα. Μετά την ξήρανση, τα τρυβλία επωάστηκαν ανάποδα για 18-24 ώρες στους 35 ° C. Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν μετά από 24 ώρες επώσης για τον *Streptococcus* και μετά από 48 ώρες για το *Propionibacterium*. Η δραστηριότητα αξιολογήθηκε οπτικά και η ofloxacin χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Οι κηλίδες χωρίς ανάπτυξη βακτηριδίων θεωρήθηκαν θετικά αποτελέσματα. Η ίδια δοκιμή επαναλήφθηκε ένα μήνα αργότερα για να επιβεβαιώσει τα αποτελέσματα.

Πειραματική Πορεία

8. Προετοιμασία και έλεγχος εκχυλισμάτων

8.1 Επιταχυνόμενη εκχύλιση (ASE)

Στα 5 διαθέσιμα είδη του γένους *Cistus* (*Cistus salviifolius*, *C. creticus* subsp. *creticus*, *C. parviflorus*, *C. monspeliensis*, *C. creticus* subsp. *eriocephalus*) πραγματοποιήθηκε επιταχυνόμενη εκχύλιση (ASE) με 4 διαλύτες διαδοχικά αυξανόμενης πολικότητας: κυκλοεξάνιο (c-hex), οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc), μεθανόλη (MeOH) και νερό (H₂O).

Σε κάθε κελί του ASE τοποθετήθηκαν περίπου 22.5 g από το κάθε είδος *Cistus* (cell size: 100ml). Οι συνθήκες καθώς και η διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας δίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 9 Μέθοδος επιταχυνόμενης εκχύλισης

Διαλύτης	Θερμοκρασία (°C)	Preheating (min)	Heating (min)	Static (min) / 2 φορές	Γέμισμα Κελιού (mL)	Έκπλυση (mL) / 2 φορές
c-hex	60	3	5	5	80	150
EtOAc	60	3	5	5	65	130
MeOH	60	3	5	10	60	130
H ₂ O	60	3	5	10	60	140

Τα 20 δείγματα που παρελήφθησαν συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού και προσδιορίστηκαν τα βάρη και οι αποδόσεις των εκχυλίσεων, όπως φαίνεται παρακάτω πίνακα:

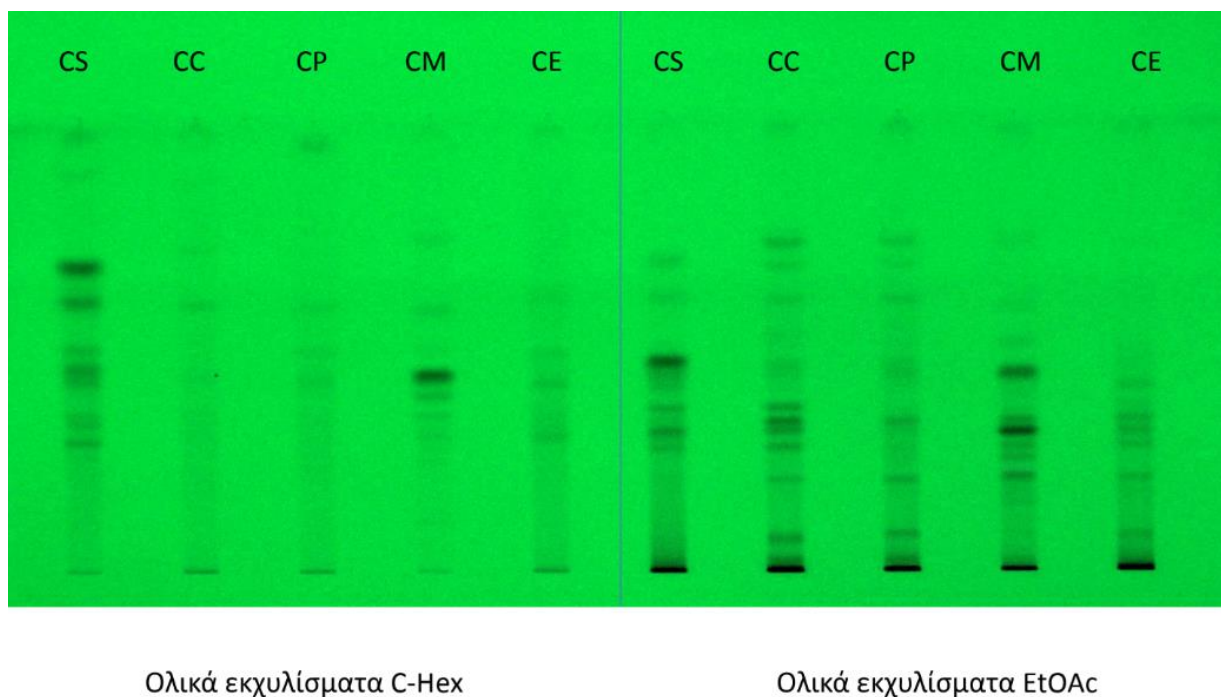
Πίνακας 10 Απόδοση εκχύλισης των φυτικών εκχυλισμάτων ειδών *Cistus* με την τεχνική ASE.

Είδος <i>Cistus</i>	<i>C. salviifolius</i> (Cs)	<i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i> (Ccc)	<i>C. parviflorus</i> (Cp)	<i>C. monspeliensis</i> (Cm)	<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i> (Cce)
Διαλύτης	Βάρος (g) (Απόδοση %)	Βάρος (g) (Απόδοση %)	Βάρος (g) (Απόδοση %)	Βάρος (g) (Απόδοση %)	Βάρος (g) (Απόδοση %)
c-hex	0.1920 (0.85)	0.4091 (1.82)	0.2437 (1.08)	1.5646 (6.95)	0.4286 (1.90)
EtOAc	0.5765 (2.56)	0.2161 (0.96)	0.1169 (0.52)	0.3333 (1.48)	0.3107 (1.38)
MeOH	2.2914 (10.18)	3.3955 (15.09)	2.1574 (9.59)	3.1771 (14.12)	2.7177 (12.08)
H ₂ O	1.7909 (7.96)	1.4178 (6.30)	1.1604 (5.16)	1.5214 (6.76)	0.8132 (3.61)
Σύνολο	4.8508	5.4385	3.6784	6.5964	4.2702

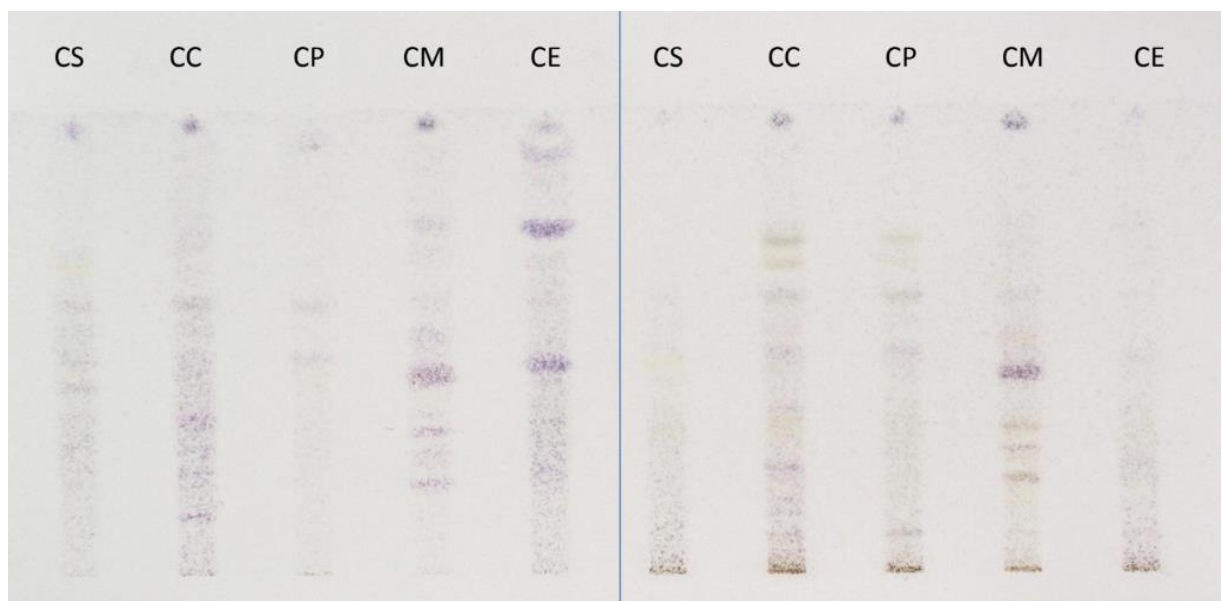
8.2 Χαρακτηρισμός φυτοχημικού προφίλ των ολικών εκχυλισμάτων με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)

Τα ολικά εκχυλίσματα των 5 ειδών *Cistus* υποβλήθηκαν σε έλεγχο του φυτοχημικού τους προφίλ με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC). Από όλα τα δείγματα παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/mL και στην πλάκα τοποθετήθηκαν 25 μ L ανά κηλίδα (spot).

Τα χρωματογραφήματα των ολικών εκχυλισμάτων που παρελήφθησαν με διαλύτη το c-hex και τον EtOAc αναπτύχθηκαν σε TLC κανονικής φάσης με σύστημα Tol:EtOAc:FA σε αναλογία 80:20:2 (Εικόνα 32, Εικόνα 33), ενώ τα μεθανολικά και τα υδατικά εκχυλίσματα αναπτύχθηκαν σε TLC κανονικής φάσης με σύστημα EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1 (Εικόνα 34, Εικόνα 35) και σε TLC αντίστροφης φάσης με σύστημα H₂O:AcN σε αναλογία 60:40 (Εικόνα 36, Εικόνα 37).



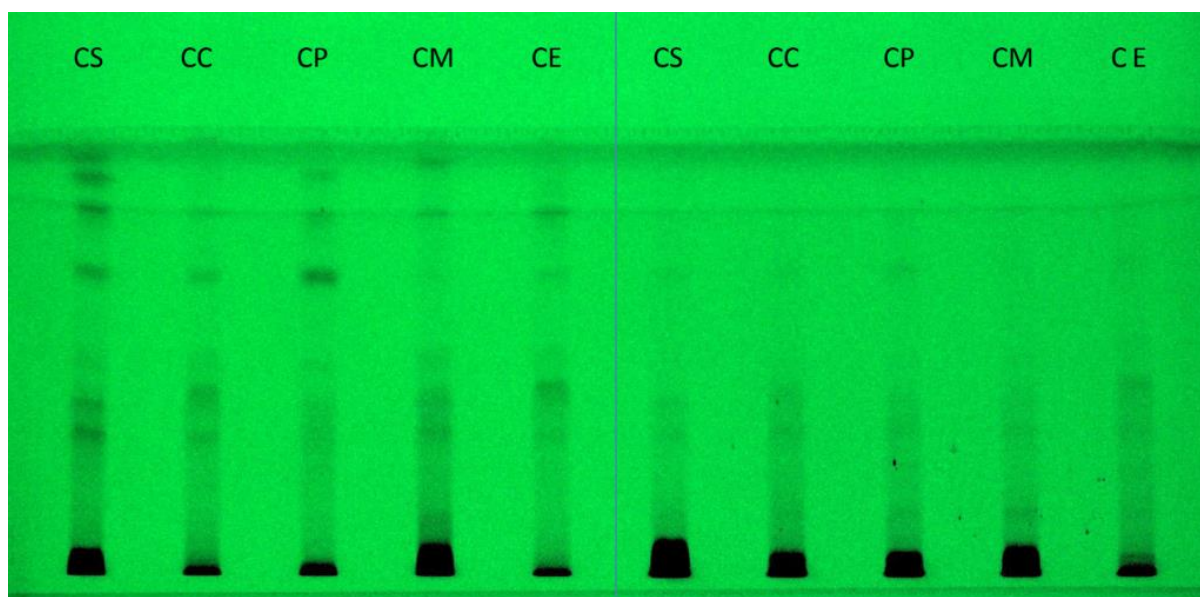
Εικόνα 32 Αριστερά: HPTLC των εκχυλισμάτων κυκλοεξανίου των 5 ειδών *Cistus*. Δεξιά: HPTLC των εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα των 5 ειδών *Cistus*. Σύστημα ανάπτυξης: Tol:EtOAc:FA σε αναλογία 80:20:2 (NP) και παρατήρηση στα 254 nm.



Ολικά εκχυλίσματα C-Hex

Ολικά εκχυλίσματα EtOAc

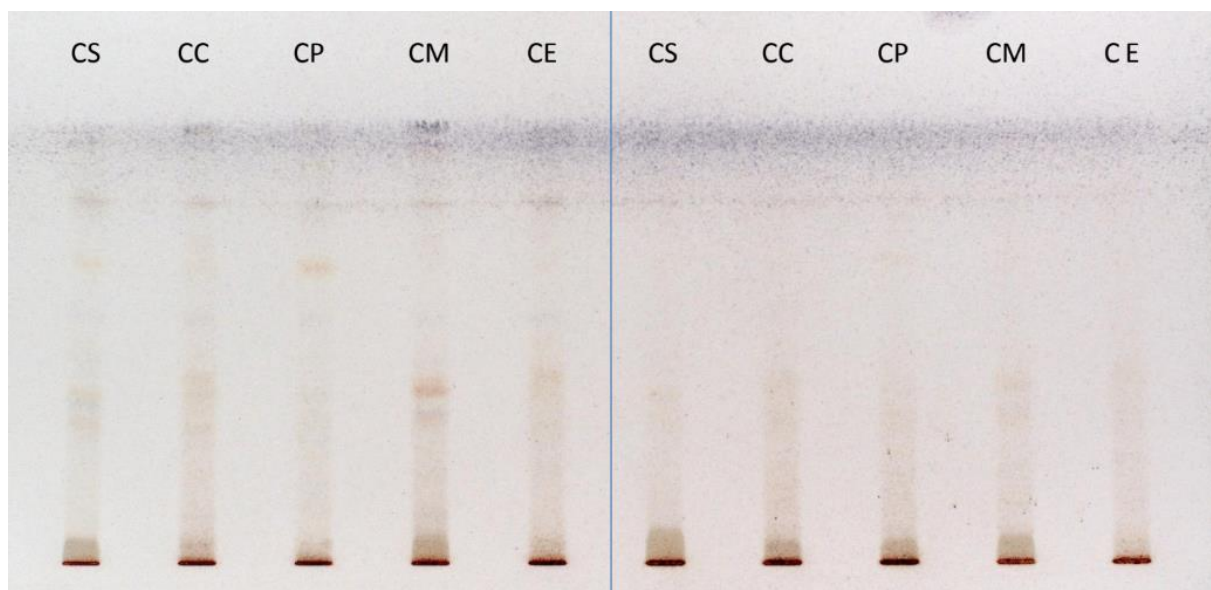
Εικόνα 33 Αριστερά: HPTLC των εκχυλισμάτων κυκλοεξανίου των 5 ειδών *Cistus*. Δεξιά: HPTLC των εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα των 5 ειδών *Cistus*. Σύστημα ανάπτυξης: Tol:EtOAc:FA σε αναλογία 80:20:2 (NP) και εμφάνιση στο ορατό με τη χρήση αντιδραστηρίου θειικής βανιλίνης.



Ολικά εκχυλίσματα MeOH

Ολικά εκχυλίσματα H₂O

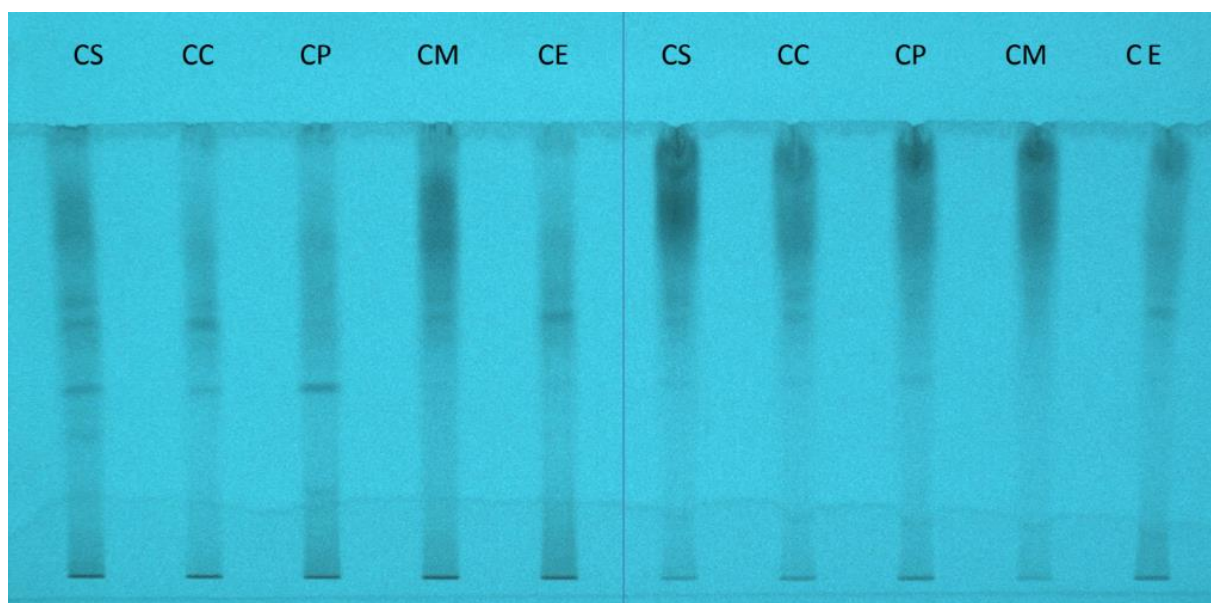
Εικόνα 34 Αριστερά: HPTLC των εκχυλισμάτων μεθανόλης των 5 ειδών *Cistus*. Δεξιά: HPTLC των εκχυλισμάτων νερού των 5 ειδών *Cistus*. Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1 (NP) και παρατήρηση στα 254 nm.



Ολικά εκχυλίσματα MeOH

Ολικά εκχυλίσματα H₂O

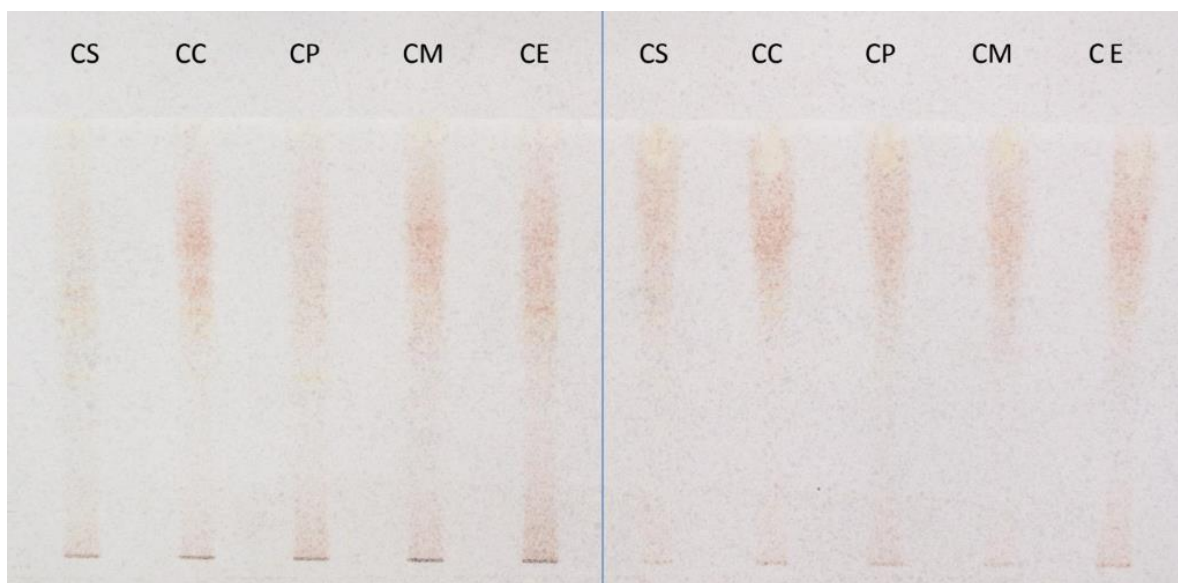
Εικόνα 35 Αριστερά: HPTLC των εκχυλισμάτων μεθανόλης των 5 ειδών *Cistus* Δεξιά: HPTLC των εκχυλισμάτων νερού των 5 ειδών *Cistus* Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1 (NP) και εμφάνιση στο ορατό με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης.



Ολικά εκχυλίσματα MeOH

Ολικά εκχυλίσματα H₂O

Εικόνα 36 Αριστερά: HPTLC των εκχυλισμάτων μεθανόλης των 5 ειδών *Cistus* Δεξιά: HPTLC των εκχυλισμάτων νερού των 5 ειδών *Cistus* Σύστημα ανάπτυξης: H₂O:AcN σε αναλογία 60:40 (RP) και παρατήρηση στα 254 nm.



Ολικά εκχυλίσματα MeOH

Ολικά εκχυλίσματα H₂O

Εικόνα 37 Αριστερά: HPTLC των εκχυλισμάτων μεθανόλης των 5 ειδών *Cistus* Δεξιά: HPTLC των εκχυλισμάτων νερού των 5 ειδών *Cistus* Σύστημα ανάπτυξης: H₂O:AcN σε αναλογία 60:40 (RP) και εμφάνιση στο ορατό με τη χρήση του αντιδραστήριου της θειικήςβανιλίνης.

Παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα του κυκλοεξανίου και του οξικού αιθυλεστέρα των ειδών *C. salviifolius* και *C. monspeliensis* έδειξαν ένα πλούσιο φυτοχημικό προφίλ στα 254 nm, ενώ στον ψεκασμό με θειική βανιλίνη παρουσιάσθηκε πληθώρα μεταβολιτών στα εκχυλίσματα κυκλοεξανίου των ειδών *C. monspeliensis* και *C. creticus* subsp. *eriocephalus*, όπως επίσης και στα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα των ειδών *C. creticus* subsp. *creticus* και *C. monspeliensis*. Με βάση την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία και λαμβάνοντας υπόψη τον χρωματισμό των κηλίδων με μωβ-μπλε χρώμα ύστερα από τον ψεκασμό με το αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης, συμπεράναμε παρουσία τερπενικών παραγώγων στα άπολα εκχυλίσματα. Στα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα των 5 ειδών που αναπτύχθηκαν σε πλάκες κανονικής φάσης παρατηρήσαμε ότι δεν υπήρχε ικανοποιητικός διαχωρισμός μεταξύ των κηλίδων που αναπτύχθηκαν ενώ αρκετές ουσίες παρέμειναν στη γραμμή εκκίνησης του χρωματογραφήματος. Ωστόσο, στην περίπτωση των μεθανολικών εκχυλισμάτων μερικοί μεταβολίτες μέσης πολικότητας, αναπτύχθηκαν και εμφανίστηκαν ύστερα από τον ψεκασμό με χρώμα κίτρινο. Όσον αφορά την παρατήρηση των χρωματογραφημάτων αντιστρόφου φάσεως των υδατικών εκχυλισμάτων παρατηρήσαμε την ύπαρξη σακχάρων κοντά στο μέτωπο του διαλύτη καθώς και την εμφάνιση ταννινών (ερυθρή χρώση με το αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης).

9. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης και του φαινολικού φορτίου των ολικών εκχυλισμάτων των ειδών *Cistus*

Τα ολικά εκχυλίσματα από τα 5 είδη του γένους *Cistus* υποβλήθηκαν σε έλεγχο της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας, ενώ προσδιορίστηκε το ολικό τους περιεχόμενο σε φαινόλες και φλαβονοειδή.

9.1 Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης

9.1.1 Έλεγχος ικανότητας εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας DPPH

Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ολικών εκχυλισμάτων των 5 ειδών *Cistus* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο DPPH όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.1.1 και το πείραμα διεξήχθη εις τριπλούν. Όλα τα εκχυλίσματα αρχικά ελέγχθηκαν στις συγκεντρώσεις 200 $\mu\text{g/mL}$ και 100 $\mu\text{g/mL}$, ενώ στον πίνακα που ακολουθεί η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων εκφράζεται σε τιμές IC_{50} , οι οποίες αντιπροσωπεύουν τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την αναστολή του 50% της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Πίνακας 11 Αντιοξειδωτική δράση έναντι της ελεύθερης ρίζας DPPH των ολικών εκχυλισμάτων των ειδών *Cistus* εκφρασμένη σε IC_{50} . Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος τριών πειραμάτων $\pm \text{STDEV}$.

Είδος <i>Cistus</i>	Εκχύλισμα	DPPH IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Cistus salviifolius</i>	c-hex	>200
	EtOAc	>200
	MeOH	8.9 ± 0.1
	H ₂ O	20.5 ± 0.6
<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	c-hex	>200
	EtOAc	80.9 ± 3.2
	MeOH	35.6 ± 1.7
	H ₂ O	29.6 ± 1.2
<i>Cistus parviflorus</i>	c-hex	>200
	EtOAc	>100
	MeOH	40.6 ± 2.9
	H ₂ O	31.0 ± 0.5
<i>Cistus monspeliensis</i>	c-hex	>200
	EtOAc	>100
	MeOH	19.6 ± 0.3
	H ₂ O	26.8 ± 0.9
<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	c-hex	>200
	EtOAc	>200

	MeOH	33.7 ± 0.8
	H ₂ O	26.9 ± 0.6

Όπως αποτυπώνεται και στον πίνακα 11 τα μεθανολικά (MeOH) και υδατικά (H₂O) εκχυλίσματα και των 5 μελετούμενων ειδών εμφάνισαν τις χαμηλότερες τιμές IC₅₀ και επομένως υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα εκχυλίσματα του κυλοεξανίου (c-hex) και του οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc). Συγκεκριμένα τα μεθανολικά εκχυλίσματα των *Cistus monspeliensis* και *Cistus salviifolius* σημειώνουν την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα με τιμές IC₅₀ 19.6 ± 0.3 και 8.9 ± 0.1, αντίστοιχα.

9.1.2 Έλεγχος ικανότητας εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας ABTS

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε με τη μέθοδο ABTS όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.1.2 και το πείραμα διεξήχθη εις τριπλούν. Όλα τα εκχυλίσματα αρχικά ελέγχθηκαν σε συγκεντρώσεις από 200 µg/mL έως και 5.21 µg/mL (τελική συγκέντρωση) ενώ στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται οι τιμές IC₅₀, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την εξουδετέρωση του 50% της ελεύθερης ρίζας.

Πίνακας 12 Αντιοξειδωτική δράση έναντι της ελεύθερης ρίζας ABTS των ολικών εκχυλισμάτων των ειδών *Cistus* εκφρασμένη σε IC₅₀. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος τριών πειραμάτων ± STDEV.

Είδος <i>Cistus</i>	Εκχύλισμα	ABTS IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Cistus salviifolius</i>	c-hex	>200
	EtOAc	>100
	MeOH	10.0 ± 0.2
	H ₂ O	8.4 ± 0.1
<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	c-hex	>200
	EtOAc	27.4 ± 1.4
	MeOH	16.8 ± 2.4
	H ₂ O	10.8 ± 0.1
<i>Cistus parviflorus</i>	c-hex	>200
	EtOAc	58.6 ± 2.3
	MeOH	17.4 ± 0.4
	H ₂ O	11.0 ± 0.1
<i>Cistus monspeliensis</i>	c-hex	>200
	EtOAc	35.4 ± 1.8
	MeOH	6.5 ± 0.2
	H ₂ O	14.4 ± 1.7
<i>Cistus creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	c-hex	>200
	EtOAc	>100
	MeOH	11.7 ± 0.7
	H ₂ O	10.0 ± 0.1

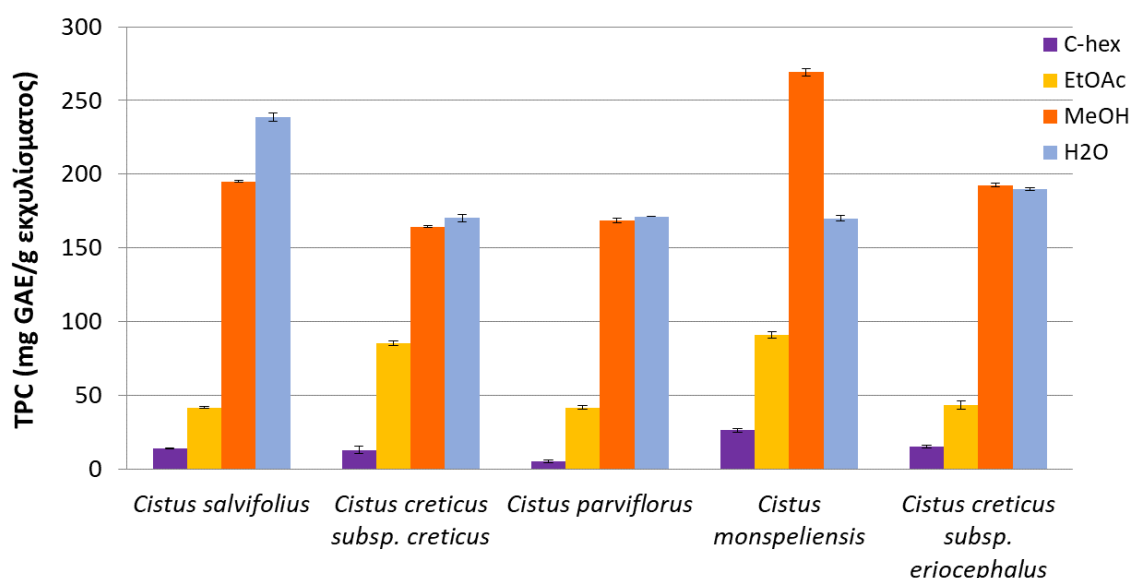
Όπως και στην περίπτωση της αναστολής του DPPH, έτσι και με τη μέθοδο ABTS αποδείχτηκε ότι τα μεθανολικά (MeOH) και υδατικά (H₂O) εκχυλίσματα και των 5 μελετούμενων ειδών παρουσιάζουν τις χαμηλότερες τιμές IC₅₀ (< 18 µg/mL) υποδηλώνοντας υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, συγκρινόμενα με τα εκχυλίσματα του κυκλοεξανίου (c-hex) και του οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc). Ωστόσο φαίνεται ότι τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα των *Cistus monspeliensis* και *Cistus parviflorus* επέδειξαν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση στη δοκιμασία εξουδετέρωσης της ελεύθερης ρίζας (ABTS•⁺) σε σχέση με τη δοκιμασία DPPH, ενώ ως ισχυρότεροι αντιοξειδωτικοί παράγοντες χαρακτηρίστηκαν το μεθανολικό εκχύλισμα του *Cistus monspeliensis* με τιμή IC₅₀ ίση με 6.5 ± 0.2 και το υδατικό εκχύλισμα του *Cistus salviifolius* με IC₅₀ ίση με 8.4 ± 0.1.

9.2 Προσδιορισμός ολικού περιεχομένου σε φαινόλες και φλαβονοειδή

Οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, πολλές από τις οποίες έχουν αποδοθεί στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και κατά συνέπεια στην αντιοξειδωτική τους δράση. Για το λόγο αυτό, προχωρήσαμε στην αξιολόγηση του φαινολικού και φλαβονοειδικού φορτίου και των είκοσι εκχυλισμάτων που προήλθαν από τα 5 είδη *Cistus*.

9.2.1 Προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου (Total Phenolic Content-TPC)

Η περιεκτικότητα σε φαινόλες των ολικών εκχυλισμάτων των 5 φυτικών ειδών του γένους *Cistus* προσδιορίστηκε μέσω φασματοφωτομετρικής ανάλυσης χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.1.3.1. Όλα τα εκχυλίσματα αρχικά αξιολογήθηκαν σε συγκεντρώσεις από 400 µg/mL έως 50 µg/mL (τελική συγκέντρωση), ενώ τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εκχυλίσματος (mg GAE / g εκχυλίσματος) μέσω της καμπύλης αναφοράς των προτύπων διαλυμάτων γαλλικού οξέος. Κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στην εικόνα 38 με τη μορφή ραβδογράμματος:



Εικόνα 38 Ολικό φαινολικόφορτίο των εκχυλισμάτων των ειδών *Cistus* εκφρασμένη σε ισοδύναμα mg γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων $\pm$ STDEV.

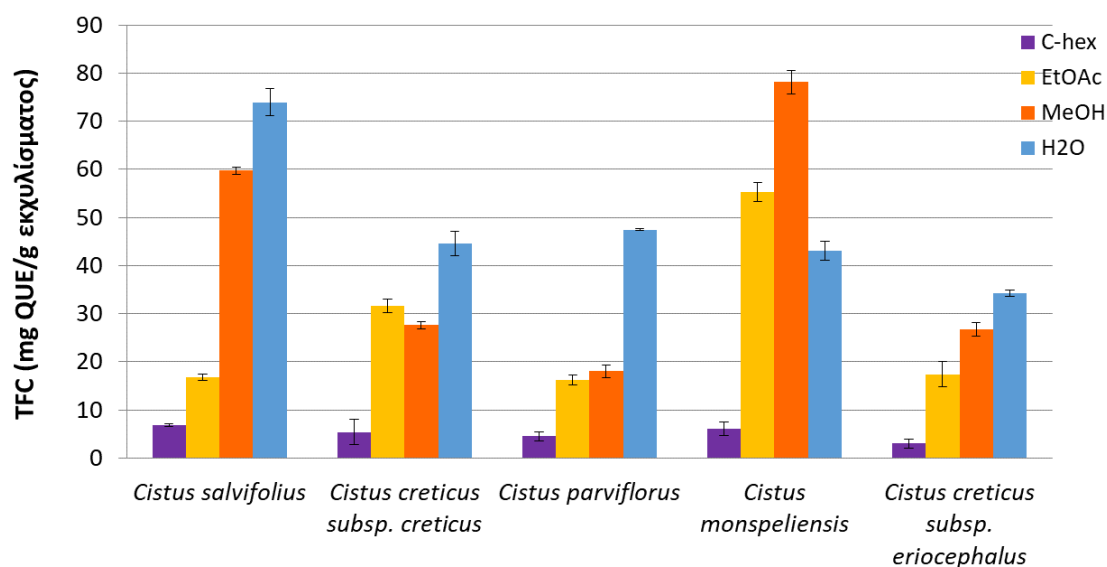
Όπως ήταν αναμενόμενο τα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα εμφάνισαν σαφώς πλουσιότερο φαινολικό φορτίο σε σχέση με τα εκχυλίσματα του κυκλοεξανίου (c-hex) και οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc). Αυτό παρατηρείται και στα 5 μελετούμενα είδη, γεγονός που δικαιολογείται λόγω της ικανότητας των διαλυτών αυξημένης πολικότητας να παραλαμβάνουν μεγαλύτερες ποσότητες φαινολικών συστατικών. Μεταξύ των πολικών εκχυλισμάτων των μελετούμενων ειδών, πλουσιότερα χαρακτηρίζονται το υδατικό εκχύλισμα του *Cistus salvifolius* με 239 ± 13.5 mg ισοδύναμα GA / g εκχυλίσματος και το μεθανολικό εκχύλισμα *Cistus monspeliensis* με 269 ± 2.4 ισοδύναμα GA / g εκχυλίσματος.

Όπως έχει αναφερθεί τα φαινολικά συστατικά θεωρούνται μια σημαντική χημική κατηγορία που συμβάλλει στην εκδήλωση αντιοξειδωτικής ικανότητας στα φυτικά εκχυλίσματα (Cai et al., 2004; Djerdane et al., 2006; Dorman et al., 2004; Surveswaran et al., 2007).

9.2.2 Προσδιορισμός του ολικού περιεχομένου σε φλαβονοειδή (TFC)

Η ολική περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδή προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.1.3.2. Όλα τα εκχυλίσματα αρχικά ελέγχθηκαν σε συγκεντρώσεις από 400 μ g/mL έως 50 μ g/mL (τελική συγκέντρωση), ενώ τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ισοδύναμα mg κερκετίνης ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εκχυλίσματος

(mg QUE / g εκχυλίσματος) μέσω της καμπύλης αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων της κερκετίνης. Κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές και τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στην εικόνα 3 με τη μορφή ραβδογράμματος:



Εικόνα 39 Ολική περιεκτικότητα σε флаβονοειδή των εκχυλισμάτων των ειδών *Cistus* εκφρασμένη σε ισοδύναμα mg κερκετίνης ανά γραμμάριο ξηρού βάρους εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος τριών επαναλήψεων $\pm$ STDEV.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα προσδιορισμού του ολικού περιεχομένου σε флаβονοειδή μεταξύ των διαφορετικών εκχυλισμάτων κάθε είδους, παρατηρήσαμε πως τα υδατικά εκχυλίσματα εμφανίζονται πλουσιότερα με εξαίρεση την περίπτωση του *Cistus monspeliensis* όπου το μεθανολικό του εκχύλισμα φαίνεται να περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό флаβονοειδών (78.1 ± 2.4 mg QUE / g εκχυλίσματος). Από τα είδη που μελετήθηκαν, υψηλότερο флаβονοειδικό φορτίο εμφάνισαν τα πολικά εκχυλίσματα του *Cistus salvifolius*, ενώ το *Cistus monspeliensis* χαρακτηρίζεται από το πλουσιότερο χημικό φορτίο. Αξίζει να σημειωθεί πως η κατάταξη των εκχυλισμάτων ανάλογα με φαυνολικό τους φορτίο είναι σε αντιστοιχία με αυτήν της περιεκτικότητάς τους σε флаβονοειδή. Λαμβάνοντας υπ' όψιν και τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών ελέγχων μπορούμε να παρατηρήσουμε πως η εκδήλωση αντιοξειδωτικής ικανότητας φαίνεται να συσχετίζεται με το αυξημένο χημικό φορτίο σε φαυνολικά προϊόντα και флаβονοειδή, όπως άλλωστε αναφέρεται και στη βιβλιογραφία.

10. Προσδιορισμός αντιβακτηριακής δράσης των ολικών εκχυλισμάτων των ειδών *Cistus*

Η αντιβακτηριακή δράση των 20 μελετούμενων εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αραιώσης με άγαρ, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 7.2. Στον Πίνακα 13 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα έναντι των 15 αερόβιων βακτηριακών ειδών (*Bacillus cereus*, *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* sp.) και των 49 βακτηριακών στελεχών συνολικά. Παρατηρούμε ότι τα δείγματα που εκδηλώνουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση είναι τα εκχυλίσματα του κυκλοεξανίου (c-hex) και του οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) των *Cistus monspeliensis* και *Cistus subsp. eriocephalus* έναντι του *Bacillus cereus*. Τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα των *Cistus salviifolius*, *Cistus creticus subsp. creticus* και *Cistus monspeliensis* χαρακτηρίστηκαν από μέτρια αντιβακτηριακή δράση έναντι του *Staphylococcus intermedius*, όπως επίσης και το υδατικό εκχύλισμα του *Cistus salviifolius* έναντι του *Corynebacterium minutissimum*. Η αντιβακτηριακή δράση των 20 εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε επίσης έναντι 6 αναερόβιων μικροοργανισμών και 43 συνολικά βακτηριακών στελεχών, ενώ μεβάση τα αποτελέσματα τα οποία εμφανίζονται στον Πίνακα 14 συμπεραίνουμε ότι τα εκχυλίσματα του κυκλοεξανίου (c-hex) και του οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) και των 5 μελετούμενων ειδών *Cistus* διαθέτουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι και των τριών ειδών *Staphylococcus* (*S. dysgalactiae*, *S. pneumonia*, *S. pyogenes*) ενώ τα μεθανολικά (MeOH) και υδατικά (H₂O) τους εκχυλίσματα δε σημείωσαν δραστηριότητα. Το εκχύλισμα κυκλοεξανίου (c-hex) του *Cistus monspeliensis* ήταν το μόνο που χαρακτηρίστηκε από ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι όλων των μικροοργανισμών (*Propionibacterium* sp. και *Streptococcus* sp.) που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση, ενώ το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα του *Cistus parviflorus* χαρακτηρίστηκε επίσης από ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι ορισμένων στελεχών των βακτηρίων *Propionibacterium* sp. Ομοίως, αξιόλογη δράση εμφάνισαν και τα μη πολικά εκχυλίσματα (c-hex, EtOAc) του *Cistus subsp. eriocephalus*, ενώ τα αντίστοιχα εκχυλίσματα του *Cistus salviifolius* σημείωσαν μέτρια δράση έναντι 5 στελεχών του *Propionibacterium acnes*. Μεταξύ των υδατικών εκχυλισμάτων μόνο το εκχύλισμα του είδους *Cistus parviflorus*

χαρακτηρίστηκε από μέτρια αντιβακτηριακή δράση έναντι μόλις 2 στελεχών του *Propionibacterium sp.*

Πίνακας 13 Αντιβακτηριακός έλεγχος εκχυλισμάτων έναντι αερόβιων βακτηριακών στελεχών. (+):δραστικό, (-): μη δραστικό (M): ήπια δράση.

Μικροοργανισμοί		Εκχυλίσματα, C = 2 mg/mL																			
Sp	Strain	<i>C. salviifolius</i>				<i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i>				<i>C. parviflorus</i>				<i>C. monspeliensis</i>				<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>			
		c-hex	EtOAc	MeOH	H ₂ O	c-hex	EtOAc	MeOH	H ₂ O	c-hex	EtOAc	MeOH	H ₂ O	c-hex	EtOAc	MeOH	H ₂ O	c-hex	EtOAc	MeOH	H ₂ O
<i>Bacillus cereus</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	M	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	CIP 6624	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	clin. strain	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	M	-	-	+	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	CIP 100652T	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Corynebacterium striatum</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium striatum</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus avium</i>	CIP 104 053	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus avium</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus avium</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	CIP 103.018T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus durans</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus durans</i>	CIP 104 999	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus durans</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP103.214	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	CIP 104 676	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	CIP 107.387	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	CIP 103.014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus gallinarum</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus gallinarum</i>	CIP 105 985	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	CIP 103.575	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 57.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25.923	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	clin. strain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	CRBI 21.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CIP 53.124	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	CIP 81.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus intermedius</i>	clin. strain	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	ATCC 43.809	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	CIP 76125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 14 Αντιβακτηριακός έλεγχος εκχυλισμάτων έναντι αναερόβιων βακτηριακών στελεχών. (+):δραστικό, (-): μη δραστικό (M): ήπια δράση.

Μικροοργανισμοί			Εκχυλίσματα, C = 2 mg/mL																			
Sp	Strain	MIC oflo	C. salvifolious				C. creticus subsp creticus				C. parviflorous				C. monspeliensis				C. creticus subsp eriocephalus			
			c-hex	EtOAc	MeOH	H ₂ O	c-hex	EtOAc	MeOH	H ₂ O	c-hex	EtOAc	MeOH	H ₂ O	c-hex	EtOAc	MeOH	H ₂ O	c-hex	EtOAc	MeOH	H ₂ O
Propionibacterium acnes	coll. Fac	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Propionibacterium acnes	coll. Fac	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Propionibacterium acnes	coll. Fac	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Propionibacterium acnes	coll. Fac	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Propionibacterium acnes	coll. Fac	1	M	M	-	-	-	-	-	-	-	+	-	M	+	-	-	-	M	+	-	-
Propionibacterium acnes	coll. Fac	1	M	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Propionibacterium acnes	coll. Fac	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Propionibacterium acnes	coll. Fac	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Propionibacterium acnes	coll. Fac	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	M	+	-	-
Propionibacterium acnes	coll. Fac	1	M	M	-	-	M	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Propionibacterium acnes	coll. Fac	1	M	M	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	M	+	-	-
Propionibacterium acnes	CIP 53 117	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Propionibacterium granulosum	coll. Fac	0,5	-	-	-	-	-	+	-	0,5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Propionibacterium sp.	coll. Fac	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Propionibacterium sp.	coll. Fac	1	M	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	M	+	-	-	-	-	-	-	-
Streptococcus agalactiae	coll. Fac	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Streptococcus agalactiae	coll. Fac	2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Streptococcus agalactiae	CIP 103.227	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Streptococcus agalactiae	coll. Fac	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Streptococcus agalactiae	coll. Fac	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Streptococcus agalactiae	coll. Fac	4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Streptococcus agalactiae	coll. Fac	2	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Streptococcus dysgalactiae	coll. Fac	1	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Streptococcus dysgalactiae	coll. Fac	2	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Streptococcus dysgalactiae	coll. Fac	4	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Streptococcus dysgalactiae	coll. Fac	2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Streptococcus dysgalactiae	CIP 102914T	2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Streptococcus dysgalactiae	CIP 107086	2	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Streptococcus dysgalactiae	coll. Fac	2	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Streptococcus dysgalactiae	coll. Fac	4	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Streptococcus pneumoniae	coll. Fac	2	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Streptococcus pneumoniae	coll. Fac	2	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Streptococcus pneumoniae	coll. Fac	2	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Streptococcus pneumoniae	coll. Fac	4	+	+	-	-	+	+	-	-	+	M	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Streptococcus pneumoniae	ATCC 49619/CIP 104340	2	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Streptococcus pyogenes	IP 56.1	2	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Streptococcus pyogenes	coll. Fac	2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
Streptococcus pyogenes	IP 56.1	2	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Streptococcus pyogenes	coll. Fac	4	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Streptococcus pyogenes	coll. Fac	2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Streptococcus pyogenes	coll. Fac	4	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Streptococcus pyogenes	coll. Fac	2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Streptococcus pyogenes	coll. Fac	2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Streptococcus pyogenes	coll. Fac	2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-

11. Ρητίνη προσρόφησης XAD-4

11.1 Επεξεργασία των ολικών μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων

Όλα τα μεθανολικά και υδατικά εκχυλισμάτα έδειξαν υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες και φλαβονοειδή καθώς και υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Ωστόσο, στη μελέτη του φυτοχημικού τους προφίλ με HPTLC παρατηρήθηκε υψηλή συγκέντρωση σακχάρων και ταννινών και αποφασίστηκε η απομάκρυνσή τους με ρητίνες προσρόφησης.

Για την υλοποίηση της συγκεκριμένης διαδικασίας, 500 mg ξηρής μάζας των ολικών μεθανολικών εκχυλισμάτων των 5 ειδών *Cistus* τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 200 mL, μέσα στις οποίες προστέθηκε νερό όγκου 100 mL και 30 mL προσροφητικής ρητίνης XAD-4. Οι κωνικές φιάλες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε τροχιακό αναδευτήρα για 3 ώρες και κατόπιν η ρητίνη από το κάθε δείγμα απομακρύνθηκε από τα εκχυλίσματα με διήθηση και μεταφέρθηκε σε 5 νέες κωνικές φιάλες των 200 mL, ενώ τα διηθήματα του συμπυκνώθηκαν έως ξηρής μάζας. Στη συνέχεια, 50 mL αιθανόλης προστέθηκαν σε κάθε κωνική που περιείχε τη ρητίνη XAD-4 με το προσροφημένο χημικό φορτίο και οι 5 κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν εκ νέου σε τροχιακό αναδευτήρα για 1 ώρα. Τέλος, η ρητίνη απομακρύνθηκε με διήθηση, ενώ το διήθημα της κάθε φιάλης μεταφέρθηκε σε γυάλινο περιέκτη και συμπυκνώθηκε έως ξηρής μάζας. Στον πίνακα που ακολουθεί, συνοψίζονται τα βάρη τόσο της έκπλυσης, όσο και της αποδέσμευσης από τα 5 μεθανολικά εκχυλίσματα *Cistus*.

Πίνακας 15 Βάρη έκπλυσης και αποδέσμευσης από την προσροφητική ρητίνη XAD-4 των ολικών μεθανολικών εκχυλισμάτων των 5 ειδών *Cistus*

Μεθανολικό εκχύλισμα	Βάρος έκπλυσης (mg)	Βάρος αποδέσμευσης (mg)
<i>C. salviifolius</i>	253.9	176.6
<i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	219.3	124.8
<i>C. parviflorus</i>	251.9	111.1
<i>C. monspeliensis</i>	216.0	203.3
<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	220.5	130.5

Για την επεξεργασία των ολικών υδατικών εκχυλισμάτων ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία. Στον πίνακα που ακολουθεί, συνοψίζονται τα βάρη τόσο της έκπλυσης, όσο και της αποδέσμευσης από τα 5 υδατικά εκχυλίσματα *Cistus*.

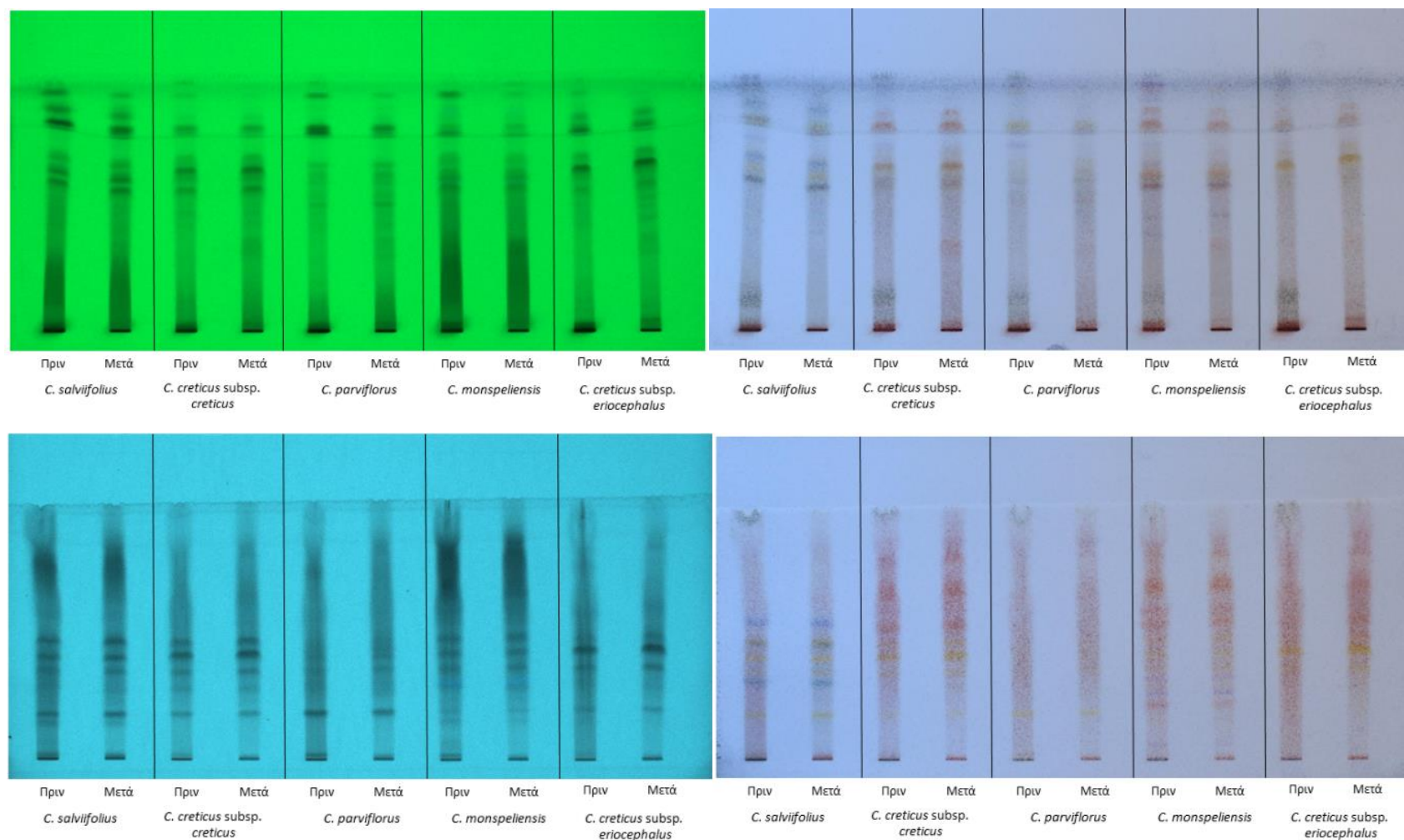
Πίνακας 16 Βάρη έκπλυσης και αποδέσμευσης από την προσροφητική ρητίνη XAD-4 των ολικών υδατικών εκχυλισμάτων των 5 ειδών *Cistus*

Υδατικό εκχύλισμα	Βάρος έκπλυσης (mg)	Βάρος αποδέσμευσης (mg)
<i>C. salviifolius</i>	214.9	233.8
<i>C. creticus</i> subsp. <i>creticus</i>	236.8	208.3
<i>C. parviflorus</i>	259.4	217.4
<i>C. monspeliensis</i>	291.8	168.4
<i>C. creticus</i> subsp. <i>eriocephalus</i>	243.1	204.6

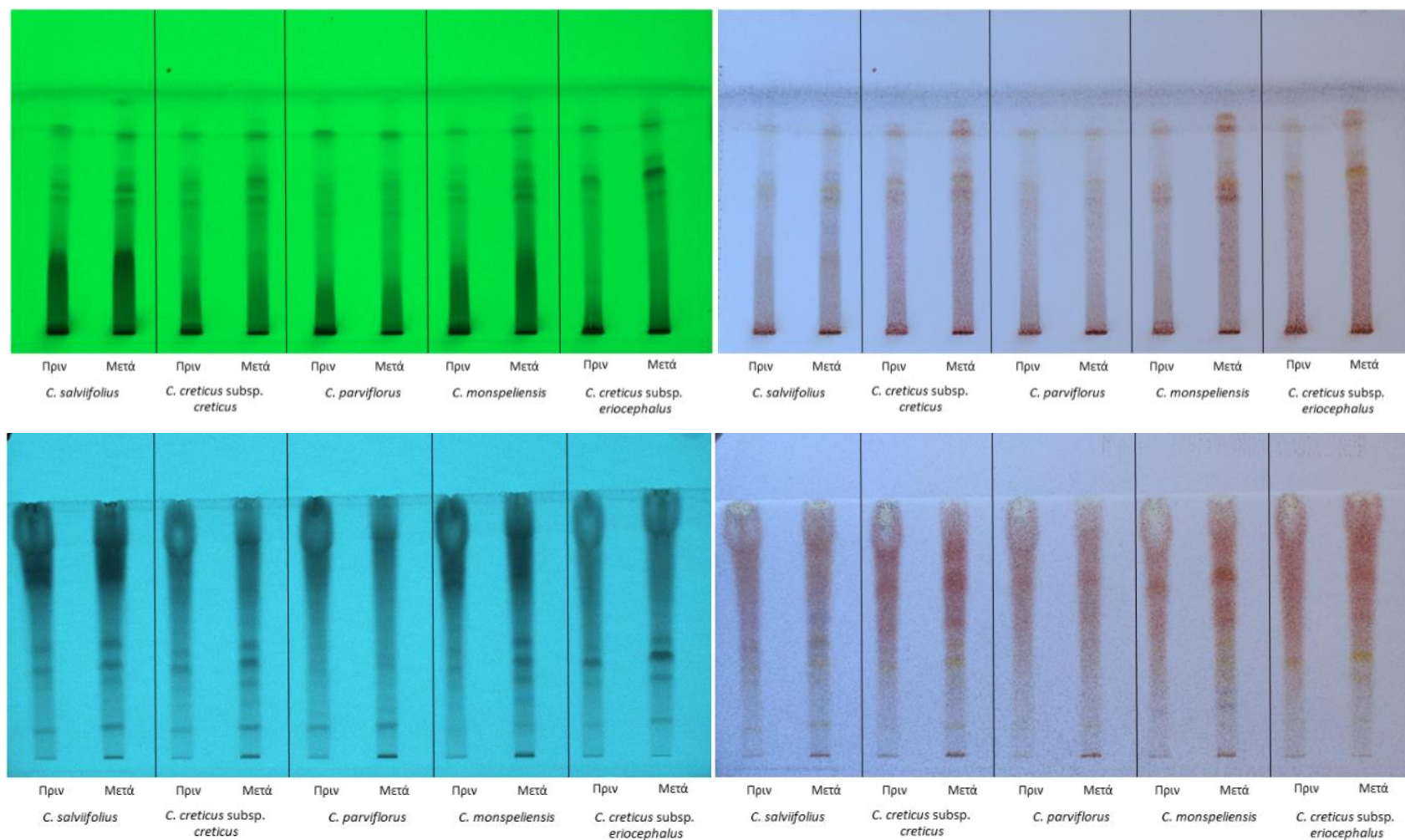
11.2 Σύγκριση του φυτοχημικού προφίλ των εκχυλισμάτων πριν και μετά τη χρήση της ρητίνης XAD-4 με τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)

Στην Εικόνα 40 απεικονίζεται συγκριτικά το φυτοχημικό προφίλ των μεθανολικών εκχυλισμάτων των ειδών *Cistus*, πριν και μετά την επεξεργασία τους με τη ρητίνη XAD-4, ενώ στην Εικόνα 41 παρουσιάζεται το προφίλ των αντίστοιχων δειγμάτων που προήλθαν από τα υδατικά εκχυλίσματα. Για κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν στην χρωματογραφική πλάκα 25 μ L διαλύματος συγκέντρωσης 1 mg/mL.

Όπως φαίνεται στα χρωματογραφήματα των μεθανολικών εκχυλισμάτων (Εικόνα 40), ένα σημαντικό ποσοστό των περιεχόμενων σακχάρων απομακρύνθηκε ύστερα από την επεξεργασία με τη ρητίνη. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό των εκχυλισμάτων σε δευτερογενείς μεταβολίτες, κάτι που γίνεται αντιληπτό κατά την παρατήρηση των χρωματογραφημάτων τόσο στα 254 nm όσο και στο ορατό μετά από ψεκασμό με θειική βανιλίνη και θέρμανση. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούμε κηλίδες μπλέ, κίτρινου και ερυθρού χρώματος που υποδεικνύουν την παρουσία τερπενοειδών, φλαβονοειδών και ακετοφαινονών, αντίστοιχα. Επομένως, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι οι ρητίνες προσρόφησης αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο για την επεξεργασία πολικών εκχυλισμάτων, καθώς συντελούν στην απομάκρυνση ανεπιθύμητων μεταβολιτών και στην παρασκευή εμπλουτισμένων εκχυλισμάτων με πλούσιο φαινολικό φορτίο. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε η ίδια αποτελεσματικότητα των ρητινών στην περίπτωση των υδατικών εκχυλισμάτων (Εικόνα 41), γεγονός που δικαιολογείται από τη μεγάλη τους περιεκτικότητα σε σάκχαρα και φανερώνει ότι πιθανώς χρειαζόταν μεγαλύτερη ποσότητα ρητίνης για την πλήρη απομάκρυνσή τους.



Εικόνα 40 Συγκριτική ΗΡΤΛΚ των ολικών μεθανολικών εκχυλισμάτων των 5 ειδών *Cistus*, πριν την επεξεργασία τους με τη ρητίνη XAD-4 (πριν), αλλά και μετά την αποδέσμευση από τη ρητίνη (μετά). Επάνω: Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA (NP) σε αναλογία 50:10:7:1 Κάτω: Σύστημα ανάπτυξης: H₂O:AcN (RP) σε αναλογία 70:30 και προσθήκη 0.5 mL FA Αριστερά: Παρατήρηση στα 254 nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θεικής βανιλίνης και θέρμανση.



Εικόνα 41 Συγκριτική ΗΡΤΛΚ των ολικών υδατικών εκχυλισμάτων των 5 ειδών *Cistus*, πριν την επεξεργασία τους με τη ρητίνη XAD-4 (πριν), αλλά και μετά την αποδέσμευση από τη ρητίνη (μετά). Επάνω: Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA (NP) σε αναλογία 50:10:7:1 Κάτω: Σύστημα ανάπτυξης: H₂O:AcN (RP) σε αναλογία 70:30 και προσθήκη 0.5 mL FA Αριστερά: παρατήρηση στα 254 nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και θέρμανση.

12. Κλασμάτωση των μεθανολικών εκχυλισμάτων με χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρωση (FCPC)

Η επεξεργασία των μεθανολικών εκχυλισμάτων με ρητίνες προσρόφησης κατέδειξε την υψηλή περιεκτικότητά τους σε φαινολικά παράγωγα, γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί τις δοκιμές προσδιορισμού του ολικού φαινολικού φορτίου και του ολικού φλαβονοειδικού φορτίου (TPC, TFC). Ωστόσο, όπως φάνηκε και από τη μελέτη του φυτοχημικού προφίλ των εκχυλισμάτων με HPTLC (Εικόνα 40), ένα μέρος των σακχάρων και των ταννινών δεν απομακρύνθηκε. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε τα 5 μεθανολικά εκχυλίσματα που παρελήφθησαν με την τεχνική ASE από τα 5 είδη *Cistus*, να υποβληθούν σε επεξεργασία με χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρωση (FCPC) με σκοπό την κλασμάτωσή τους και την καλύτερη ανάλυση των περιεχόμενων συστατικών.

Εξ' αιτίας της υψηλής χημικής ποικιλομορφίας των μεθανολικών εκχυλισμάτων των υπέργειων τμημάτων των ειδών *Cistus*, ήταν δύσκολο να βρεθεί μια αποτελεσματική, γρήγορη και άμεση μέθοδος κλασμάτωσης μέσω ενός κλασικού διφασικού συστήματος διαλυτών. Αυτό οφειλόταν κυρίως στο μεγάλο εύρος της πολικότητας που καλύπτουν τα συστατικά των προαναφερόμενων φυτικών εκχυλισμάτων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται διτερπένια, φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, ταννίνες κ.ά.

Οι σειρές συστημάτων που δοκιμάστηκαν αρχικά παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα:

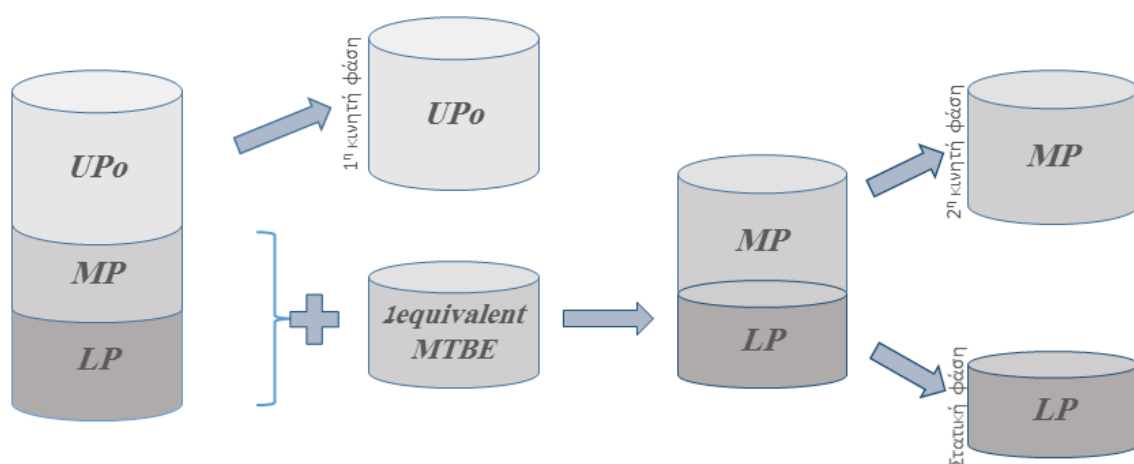
Πίνακας 17 Συστήματα που δοκιμάστηκαν για CPC

Συστήματα	Αναλογίες
MTBE:AcN:H ₂ O	4:1:5
n-BuOH:n-PrOH:H ₂ O	4:1:5
CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O	7:13:8
CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O	1:1:1
n-Hex:EtOAc:MeOH:H ₂ O	2:7:3:7
n-Hept:MTBE:AcN:H ₂ O	1:1:1:1
n-Hept:MTBE:AcN:H ₂ O	2:2:3:2
<u>n-Hept:MTBE:AcN:H₂O</u>	<u>1:1:2:1</u>
n-Hept:MTBE:AcN:H ₂ O	2:1:3:2
n-Hept:MTBE:AcN:H ₂ O	2:3:3:2
n-Hept:MTBE:AcN:H ₂ O	3:5:5:3
n-Hept:MTBE:AcN:H ₂ O	1:2:2:3
n-Hept:EtOAc:EtOH:H ₂ O	18:1:18:1
n-Hept:EtOAc:EtOH:H ₂ O	10:1:10:1
n-Hept:EtOAc:BuOH:EtOH:H ₂ O	x/y/z/10/5

n-Hept:EtOAc:MeOH:H ₂ O	1:5:1:5
EtOAc:EtOH:H ₂ O	5:1.5:5
EtOAc:EtOH:Ac:H ₂ O	16:4:1:20
EtOAc:BuOH:EtOH:H ₂ O	30:6:10:5
n-Hept:EtOAc:EtOH:H ₂ O	x/y/1/5
n-Hept:EtOAc:EtOH:H ₂ O	5:10:5:10

Επειδή τα αρχικά ακατέργαστα εκχυλίσματα αποτελούνταν στο μεγαλύτερο ποσοστό τους από υδατοδιαλυτές ταννίνες, μια πολύ πολική στατική φάση πλούσια σε νερό και AcN, επιλέχθηκε προκειμένου να κατακρατηθούν στη στήλη CPC, και κατά συνέπεια τα ολικά εκχυλίσματα να εμπλουτιστούν με τις επιθυμητές προς περαιτέρω ανάλυση ουσίες, ενώ ταυτόχρονα προσέφερε μια αξιόλογη κλασμάτωση του αρχικού εκχυλίσματος.

Η παρασκευή του συστήματος διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε τελικά περιγράφεται στο σχήμα (Εικόνα 42). Το σύστημα αυτό, n-Hept:MTBE:AcN:H₂O, αποτελεί ένα τριφασικό σύστημα διαλυτών που προκύπτει από την ανάμειξη των προαναφερόμενων διαλυτών σε αναλογία 1:1:2:1.



Εικόνα 42 Σχηματική απεικόνιση προετοιμασίας τριφασικού συστήματος διαλυτών n-Hept:MTBE:AcN:H₂O σε αναλογία 1:1:2:1. Τροποποίηση εικόνας από Hamzaoui et al., 2013.

Από το συνολικό όγκο 1 L του τριφασικού συστήματος που προέκυψε από τη ανάμειξη 200 mL n-Hept, 200 mL MTBE, 400 mL AcN και 200 mL H₂O σε διαχωριστική χοάνη, απομακρύνθηκε η πάνω φάση (UP_o) και πραγματοποιήθηκε προσθήκη ενός ακόμα ισοδυνάμου MTBE (200 mL) προκειμένου να μειωθεί ελαφρά η πολικότητα των δύο φάσεων που απέμειναν στο σύστημα διαλυτών, και στη συνέχεια έγινε παραλαβή των δύο φάσεων που προέκυψαν: μεσαία φάση (MP) και κάτω φάση (LP). Η τελική αναλογία των

τριών φάσεων ήταν η εξής: 300 mL πάνω φάσης (UP_o) / 740 mL μεσαίας φάσης (MP) / 160 mL κάτω φάσης (LP).

Στατική φάση του πειράματος αποτέλεσε η LP, ενώ κινητές φάσεις ήταν η UP_o και η MP.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε πλήρωση της στήλης με την LP σε descending mode χωρίς στροφές, με ροή 5 mL/min και κατόπιν αλλαγή σε ascending mode και γέμισμα της στήλης με την πρώτη κινητή φάση (UP_o) με ροή 1 mL/min και στροφές 800 rpm έως την εξισορρόπηση των δύο φάσεων μέσα στη στήλη.

12.1 Κλασμάτωση του εκχυλίσματος του *Cistus salviifolius*

250 mg του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus salviifolius* διελύθησαν σε μικροποσότητα του τριφασικού συστήματος (3.5 mL) και κατόπιν το δείγμα εισήχθη με ένεση στη στήλη. Ο αριθμός και ο όγκος των κλασμάτων που παρελήφθησαν με την πρώτη κινητή φάση (UP_o), με τη δεύτερη κινητή φάση (MP), καθώς και με τη στατική (LP) δίνονται παρακάτω:

Πίνακας 18 Αριθμός και όγκος των κλασμάτων CPC του είδους *C. salviifolius* που παρελήφθησαν με την πρώτη και δεύτερη κινητή φάση (UP_o και MP αντίστοιχα) και τη στατική (LP).

Αριθμός κλασμάτων	Φάσεις	Όγκος (mL)
0-2	UP _o	3
3-10		1
11-27		3
28-40	MP	1
41-43		5
44-54		4
55-71	LP	1
72-τέλος		>10

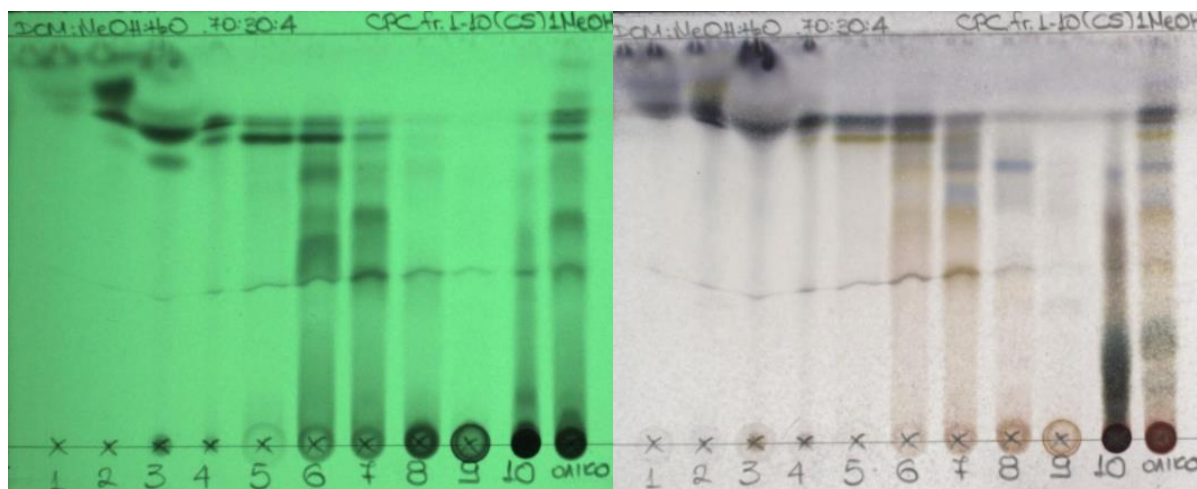
Τα 72 κλάσματα αυτά υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν. Τα βάρη των κλασμάτων που προέκυψαν από τις συνενώσεις αυτές, συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 19 Βάρη τελικών κλασμάτων CPC του είδους *C. salviifolius*

Κωδικός Κλάσματος	Βάρος (g)
CPC_Cs_1	0.0036
CPC_Cs_2	0.0027
CPC_Cs_3	0.0016
CPC_Cs_4	0.0038
CPC_Cs_5	0.0044
CPC_Cs_6	0.0100
CPC_Cs_7	0.0107
CPC_Cs_8	0.0097
CPC_Cs_9	0.0107

CPC_Cs_10	0.1007
-----------	--------

Η εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) δίνεται παρακάτω:



Εικόνα 43 TLC των κλασμάτων CPC του *C. salvifolius* Σύστημα ανάπτυξης: DCM:MeOH:H₂O σε αναλογία 70:30:4 Αριστερά: παρατήρηση στα 254nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό, κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση.

12.2 Κλασμάτωση του εκχυλίσματος του *Cistus creticus* subsp. *creticus*

250 mg του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus creticus* subsp. *creticus* διαλύθηκαν σε μικροποσότητα του τριφασικού συστήματος (3.5 mL) και κατόπιν το δείγμα εισήχθη με ένεση στη στήλη. Ο αριθμός και ο όγκος των κλασμάτων που παρελήφθησαν με την πρώτη κινητή φάση (UP₀), με τη δεύτερη κινητή φάση (MP), καθώς και με τη στατική (LP) δίνονται παρακάτω:

Πίνακας 20 Πλήθος και όγκος των κλασμάτων CPC του είδους *Cistus creticus* subsp. *creticus* που παρελήφθησαν με την πρώτη και δεύτερη κινητή φάση (UP₀ και MP αντίστοιχα) και τη στατική (LP).

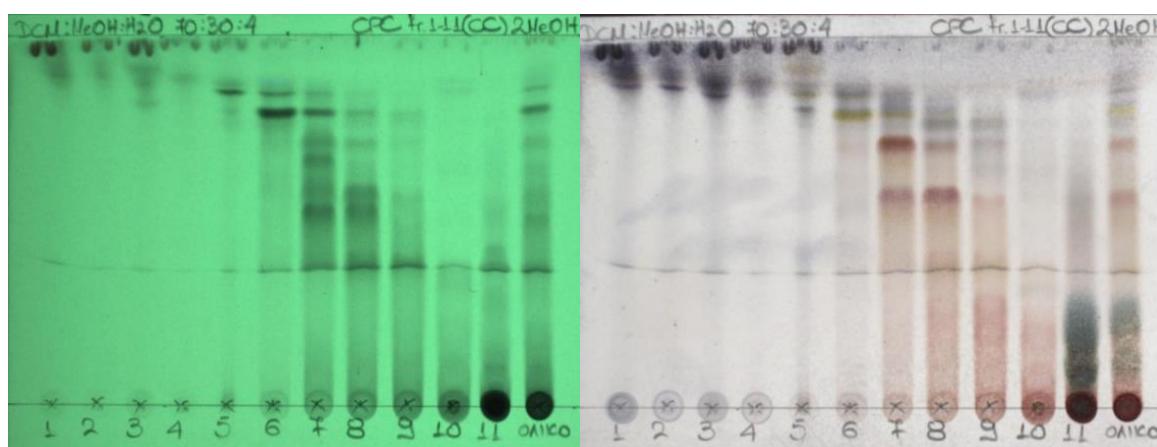
Αριθμός κλασμάτων	Φάσεις	Όγκος (mL)
0	UP ₀	10
1		5
2		2.5
3-20		1
21-36	MP	3
37-44		1
45-57		2
58-84	LP	2
85-89		5
90-τέλος		>10

Τα κλάσματα αυτά υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν. Τα βάρη των κλασμάτων που προέκυψαν από τις συνενώσεις αυτές, συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 21 Βάρη τελικών κλασμάτων CPC του είδους *Cistus creticus* subsp. *creticus*

Κωδικός Κλάσματος	Βάρος (g)
CPC_Ccc_1	0.0006
CPC_Ccc_2	0.0028
CPC_Ccc_3	0.0024
CPC_Ccc_4	0.0023
CPC_Ccc_5	0.0026
CPC_Ccc_6	0.0036
CPC_Ccc_7	0.0072
CPC_Ccc_8	0.0079
CPC_Ccc_9	0.0045
CPC_Ccc_10	0.0057
CPC_Ccc_11	0.1272

Η εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) δίνεται παρακάτω:



Εικόνα 44 TLC των κλασμάτων CPC του *C. creticus* subsp. *creticus* Σύστημα ανάπτυξης: DCM:MeOH:H₂O σε αναλογία 70:30:4 Αριστερά: παρατήρηση στα 254nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό, κατόπιν ψεκασμού με θεική βανιλίνη και καύση.

12.3 Κλασμάτωση του εκχυλίσματος του *Cistus parviflorus*

250 mg του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus parviflorus* διαλύθηκαν σε μικροποσότητα του τριφασικού συστήματος (3.5 mL) και κατόπιν το δείγμα εισήχθη με ένεση στη στήλη. Ο αριθμός και ο όγκος των κλασμάτων που παρελήφθησαν με την πρώτη κινητή φάση (UP₀), με τη δεύτερη κινητή φάση (MP), καθώς και με τη στατική (LP) δίνονται παρακάτω:

Πίνακας 22 Πλήθος και όγκος των κλασμάτων CPC του είδους *Cistus parviflorus* που παρελήφθησαν με την πρώτη και δεύτερη κινητή φάση (UP₀ και MP αντίστοιχα) και τη στατική (LP).

Αριθμός κλασμάτων	Φάσεις	Όγκος (mL)
0-1	UP ₀	3
2		2
3-11		1

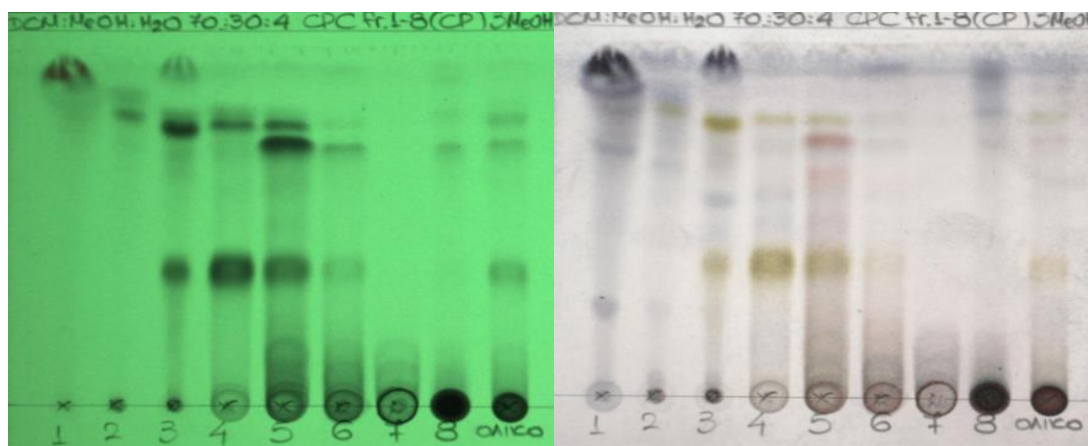
12-27	MP	3
28-40		1
41-45		3
46-57		3
58-70	LP	1
71-τέλος		>10

Τα κλάσματα αυτά υπεβλήθησαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν. Τα βάρη των κλασμάτων που προέκυψαν από τις συνενώσεις αυτές, συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 23 Βάρη τελικών κλασμάτων CPC του είδους *Cistus parviflorus*

Κωδικός Κλάσματος	Βάρος (g)
CPC_Cp_1	0.0024
CPC_Cp_2	0.0016
CPC_Cp_3	0.0035
CPC_Cp_4	0.0032
CPC_Cp_5	0.0085
CPC_Cp_6	0.0066
CPC_Cp_7	0.0116
CPC_Cp_8	0.0750

Η εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) δίνεται παρακάτω:



Εικόνα 45 TLC των κλασμάτων CPC του *C. parviflorus* με σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH:H₂O σε αναλογία 70:30:4. Αριστερά: παρατήρηση στα 254nm. Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό, κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση.

12.4 Κλασμάτωση του εκχυλίσματος του *Cistus monspeliensis*

250 mg του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* διαλύθηκαν σε μικροποσότητα του τριφασικού συστήματος (3.5 mL) και κατόπιν το δείγμα εισήχθη με ένεση στη στήλη. Ο αριθμός και ο όγκος των κλασμάτων που παρελήφθησαν με την πρώτη

κινητή φάση (UP_o), με τη δεύτερη κινητή φάση (MP), καθώς και με τη στατική (LP) δίνονται παρακάτω:

Πίνακας 24 Πλήθος και όγκος των κλασμάτων CPC του είδους *Cistus monspeliensis* που παρελήφθησαν με την πρώτη και δεύτερη κινητή φάση (UP_o και MP αντίστοιχα) και τη στατική (LP).

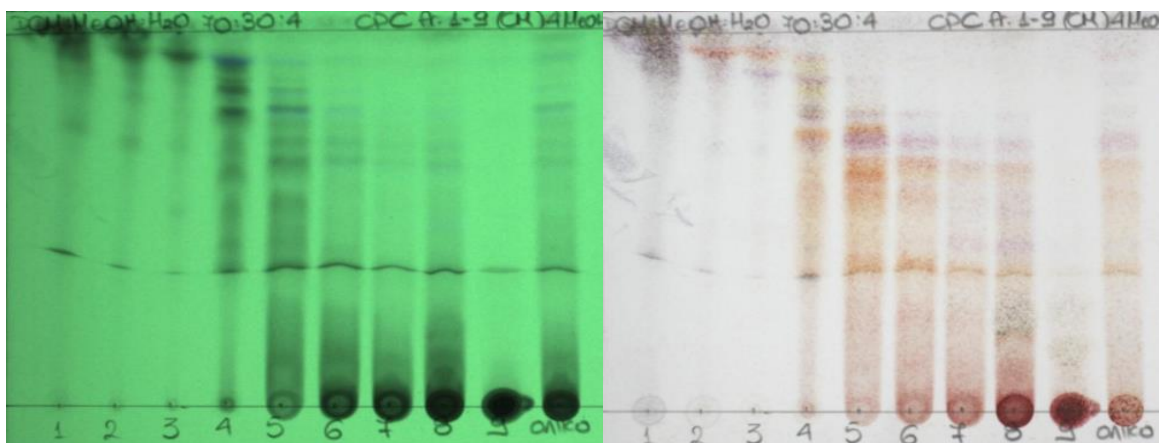
Αριθμός κλασμάτων	Φάσεις	Όγκος (mL)
0-3	UP _o	8
4		5
5		3
6-9		1
10		2
11-12		2.5
13		2
14-32	MP	2
33-42		0.8
43-89		1
90-τέλος	LP	2

Τα κλάσματα αυτά υπεβλήθησαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν. Τα βάρη των κλασμάτων που προέκυψαν από τις συνενώσεις αυτές, συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 25 Βάρη τελικών κλασμάτων CPC του είδους *Cistus monspeliensis*

Κωδικός Κλάσματος	Βάρος (g)
CPC_Cm_1	0.0008
CPC_Cm_2	0.0043
CPC_Cm_3	0.0009
CPC_Cm_4	0.0026
CPC_Cm_5	0.0152
CPC_Cm_6	0.0148
CPC_Cm_7	0.0106
CPC_Cm_8	0.0335
CPC_Cm_9	0.0773

Η εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) δίνεται παρακάτω:



Εικόνα 46 TLC των κλασμάτων CPC του *C. monspeliensis* Σύστημα ανάπτυξης: DCM:MeOH:H₂O σε αναλογία 70:30:4 Αριστερά: παρατήρηση στα 254nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό, κατόπιν ψεκασμού μεθειική βανιλίνη και καύση.

12.5 Κλασμάτωση του εκχυλίσματος του *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*

250 mg του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* διαλύθηκαν σε μικροποσότητα του τριφασικού συστήματος (3.5 mL) και κατόπιν το δείγμα εισήχθη με ένεση. Ο αριθμός και ο όγκος των κλασμάτων που παρελήφθησαν με την πρώτη κινητή φάση (UP₀), με τη δεύτερη κινητή φάση (MP), καθώς και με τη στατική (LP) δίνονται παρακάτω:

Πίνακας 26 Πλήθος και όγκος των κλασμάτων CPC του είδους *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* που παρελήφθησαν με την πρώτη και δεύτερη κινητή φάση (UP₀ και MP αντίστοιχα) και τη στατική (LP).

Αριθμός κλασμάτων	Φάσεις	Όγκος (mL)
0-2	UP ₀	3
3-15		1
16-22	MP	2
23-33		3
34-50		1
51-80	LP	2
81-τέλος		>10

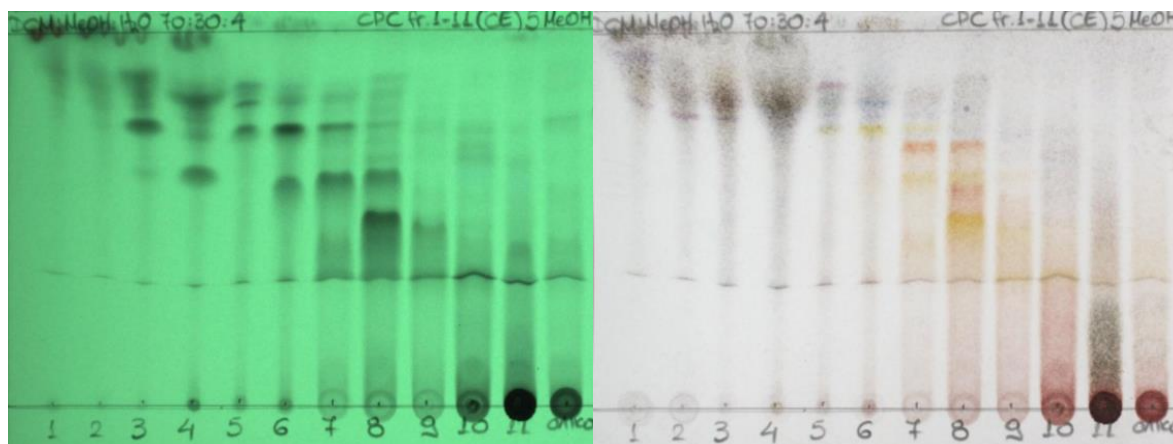
Τα κλάσματα αυτά υπεβλήθησαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν. Τα βάρη των κλασμάτων που προέκυψαν από τις συνενώσεις αυτές, συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 27 Βάρη τελικών κλασμάτων CPC του είδους *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*

Κωδικός Κλάσματος	Βάρος (g)
CPC_Cce_1	0.0029
CPC_Cce_2	0.0018
CPC_Cce_3	0.0020

CPC_Cce_4	0.0020
CPC_Cce_5	0.0034
CPC_Cce_6	0.0028
CPC_Cce_7	0.0036
CPC_Cce_8	0.0082
CPC_Cce_9	0.0043
CPC_Cce_10	0.0112
CPC_Cce_11	0.1160

Η εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) δίνεται παρακάτω:

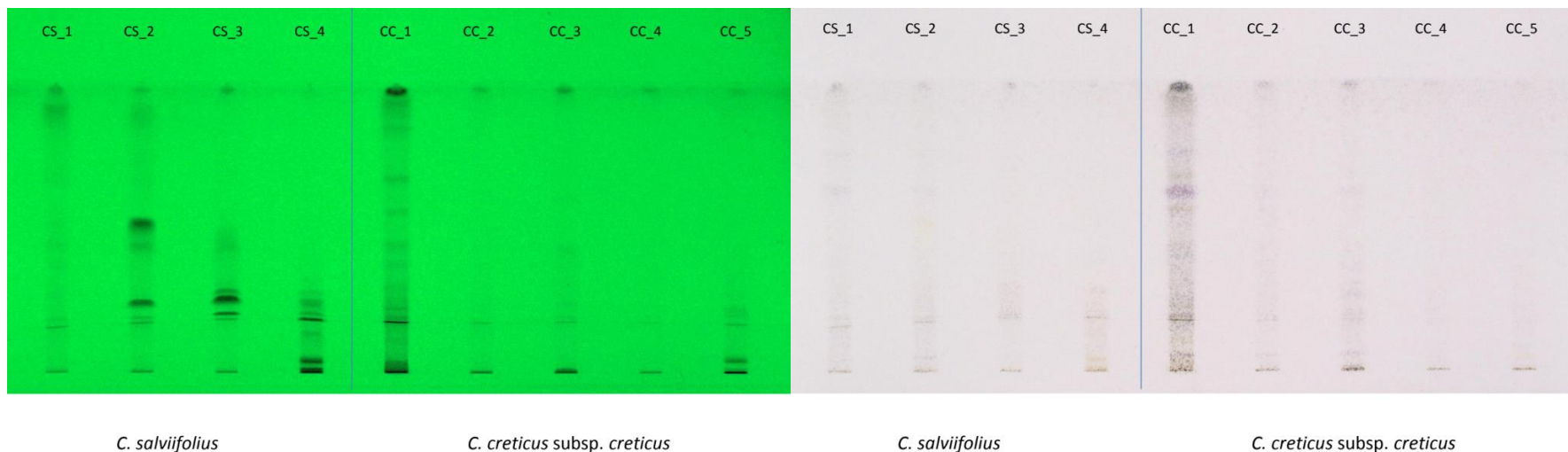


Εικόνα 47 TLC των κλασμάτων CPC του *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* Σύστημα ανάπτυξης: DCM:MeOH:H₂O σε αναλογία 70:30:4 Αριστερά: παρατήρηση στα 254nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό, κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση.

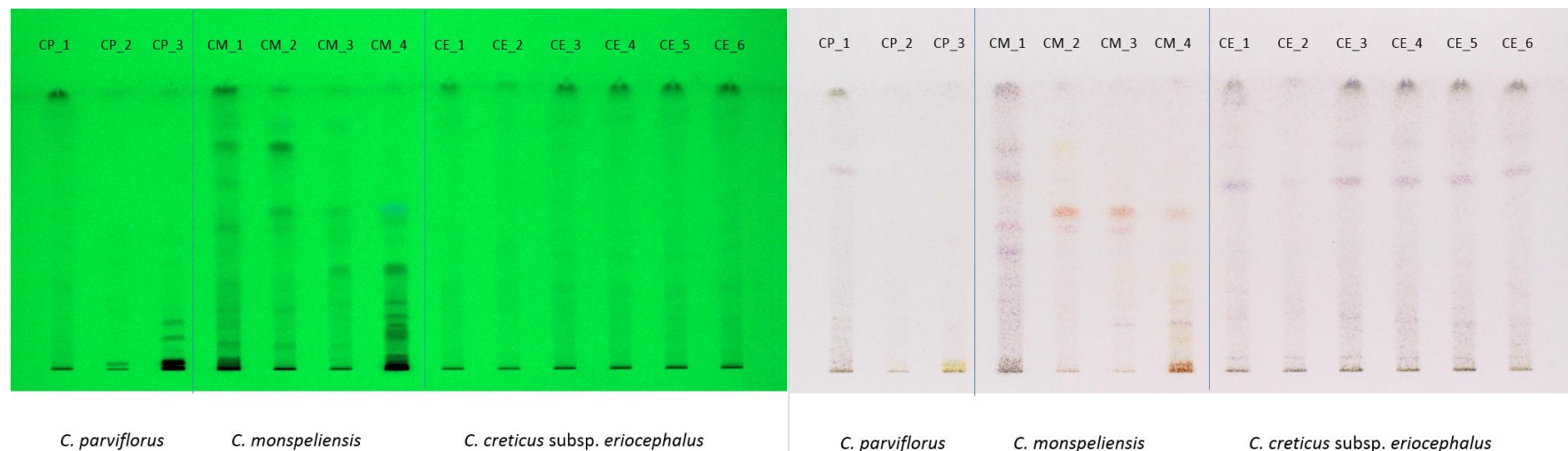
12.6 Συγκριτική μελέτη φυτοχημικού προφίλ των κλασμάτων FCPC με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC)

Με σκοπό την καλύτερη αξιολόγηση του χημικού περιεχομένου των 5 μεθανολικών εκχυλισμάτων, αποφασίστηκε η συνένωση των επιμέρους κλασμάτων, τα οποία προέκυψαν από την εφαρμογή της χρωματογραφίας κατανομής με φυγοκέντρωση, σε 10-11 τελικά κλάσματα για το κάθε εκχύλισμα, τα οποία ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με την πολικότητα των μεταβολιτών που αυτά περιέχουν. Στη συνέχεια, τα συνενωμένα κλάσματα των μεθανολικών εκχυλισμάτων των 5 ειδών *Cistus* υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC). Παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg / mL και στην πλάκα τοποθετήθηκαν 25 µL ανά spot. Τα άπολα κλάσματα από το κάθε είδος *Cistus* αναλύθηκαν με χρωματογραφία κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης DCM:MeOH 95:5 (Εικόνα 48, Εικόνα 49), τα μεσαίας πολικότητας κλάσματα αναλύθηκαν με χρωματογραφία κανονικής φάσης σε σύστημα ανάπτυξης EtOAc:MeOH:H₂O:FA 55:7:5:1 (Εικόνα 50, Εικόνα 51), ενώ τα πολικά κλάσματα αναλύθηκαν τόσο με χρωματογραφία κανονικής φάσης σε σύστημα EtOAc:MeOH + 0,5 mL FA (Εικόνα 52) όσο και με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με σύστημα H₂O:AcN 65:35 και την προσθήκη 0,5 mL FA (Εικόνα 53).

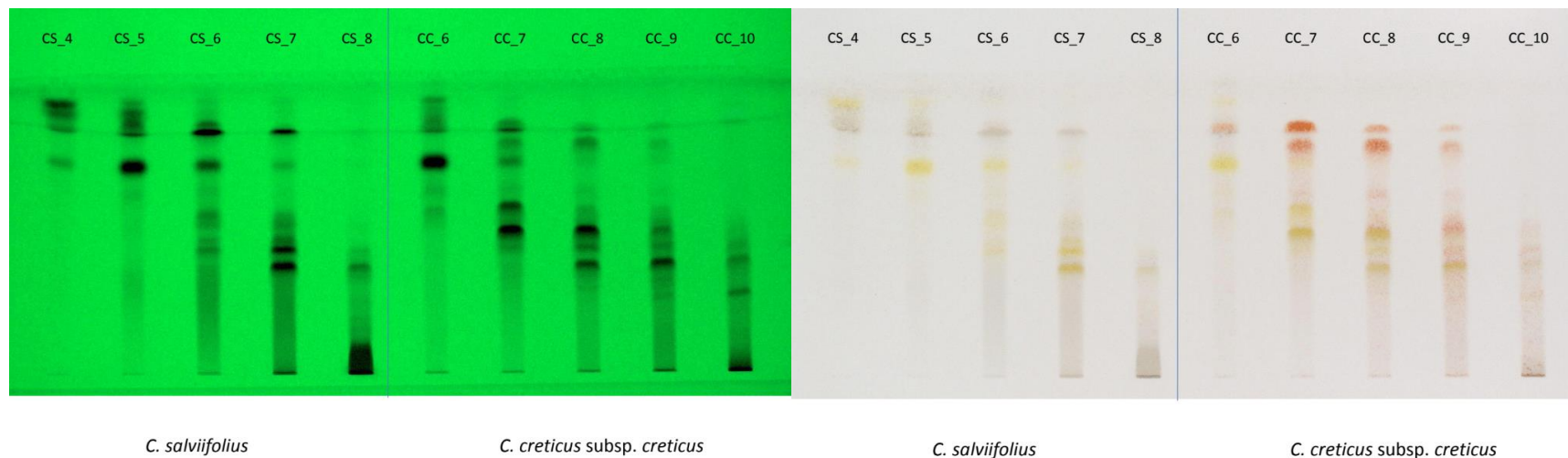
Όπως παρατηρούμε και στις παρακάτω εικόνες, ο διαχωρισμός των συστατικών ήταν επιτυχής και για τα πέντε εκχυλίσματα, γεγονός που οφείλεται στην επιλογή του τριφασικού συστήματος διαλυτών για την πραγματοποίηση των κλασμάτωσεων. Όσον αφορά τα άπολα συστατικά των μεθανολικών εκχυλισμάτων, το εκχύλισμα του *Cistus creticus* subsp. *creticus* φαίνεται να είναι πιο πλούσιο συγκριτικά με τα υπόλοιπα, ενώ στους μεταβολίτες μέσης πολικότητας παρατηρούμε μεγάλες ομοιότητες ανά ζεύγη στα είδη *Cistus salviifolius* και *Cistus parviflorus*, όπως επίσης και στα είδη και *Cistus creticus* subsp. *creticus* με *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, αλλά και λαμβάνοντας υπόψη τις φυτοχημικές μελέτες των προαναφερόμενων ειδών, αποφασίστηκε η περαιτέρω μελέτη των μέσης πολικότητας δευτερογενών μεταβολιτών του είδους *Cistus monspeliensis*. Εξάλλου, το μεθανολικό του εκχύλισμα είχε δείξει την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση στην εξουδετέρωση του ABTS και τη δεύτερη καλύτερη στην εξουδετέρωση της ελεύθερης ρίζας DPPH.



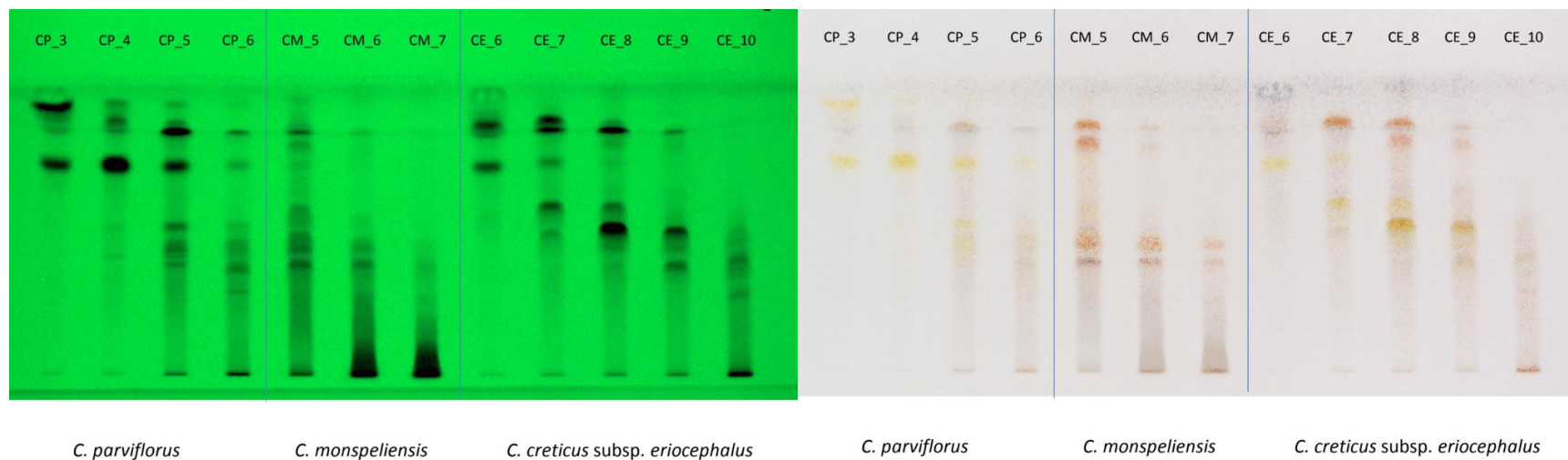
Εικόνα 48 HPTLC των κλασμάτων 1-4 του φυτού *Cistus salviifolius* και 1-5 του φυτού *Cistus creticus subsp. creticus* Σύστημα ανάπτυξης: DCM:MeOH σε αναλογία 95:5 (NP) Αριστερά: παρατήρηση στα 254nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και καύση.



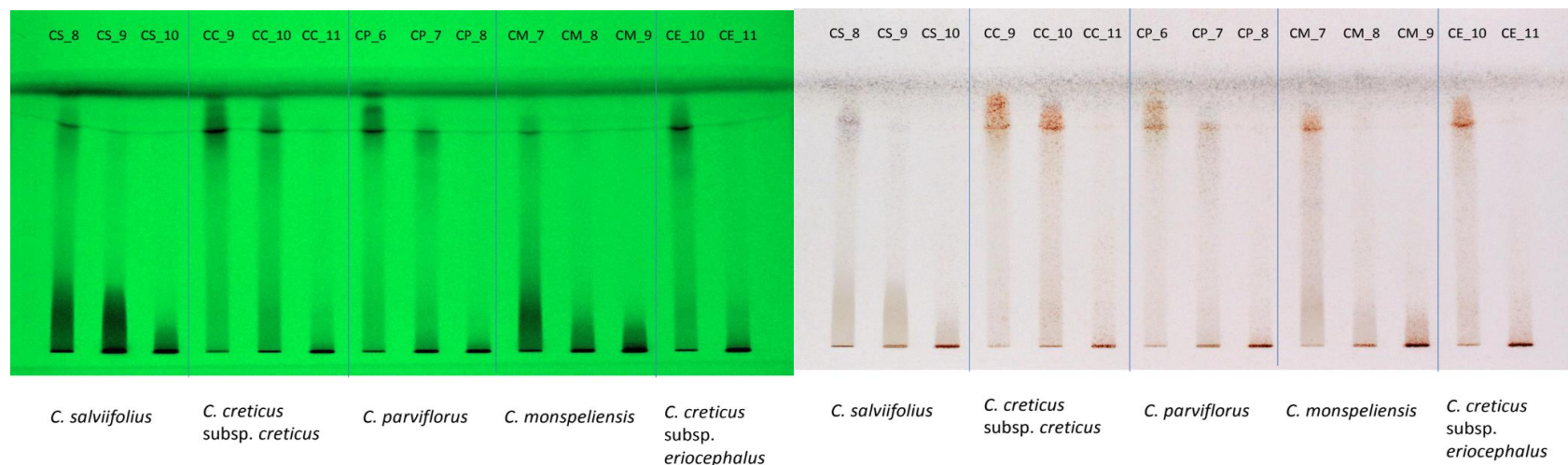
Εικόνα 49 HPTLC των κλασμάτων 1-3 του φυτού *Cistus parviflorus*, 1-4 του φυτού *Cistus monspeliensis* και των κλασμάτων 1-6 του φυτού *Cistus creticus subsp. eriocephalus* Σύστημα ανάπτυξης: DCM:MeOH σε αναλογία 95:5 (NP) Αριστερά: παρατήρηση στα 254nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και καύση.



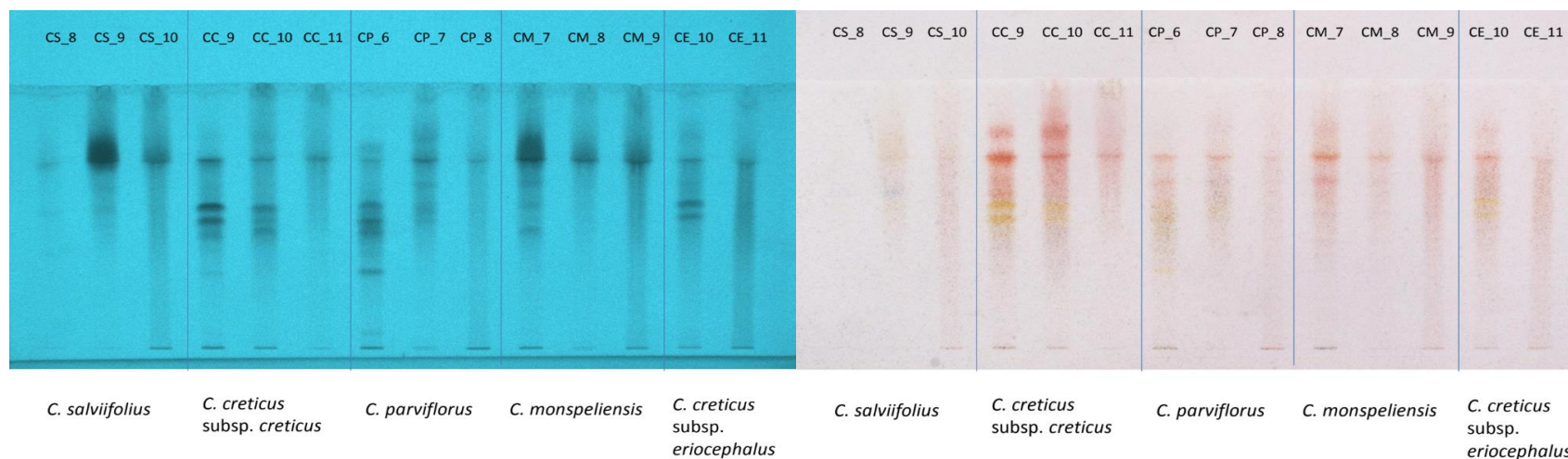
Εικόνα 50 HPTLC των κλασμάτων 4-8 του φυτού *Cistus salviifolius* και 6-10 του φυτού *Cistus creticus subsp. creticus* Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1 (NP) Αριστερά: παρατήρηση στα 254nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και καύση.



Εικόνα 51 HPTLC των κλασμάτων 3-6 του φυτού *Cistus parviflorus*, 5-7 του φυτού *Cistus monspeliensis* και των κλασμάτων 6-10 του φυτού *Cistus creticus subsp. eriocephalus* Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1 (NP) Αριστερά: παρατήρηση στα 254nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και καύση.



Εικόνα 52 HPTLC των κλασμάτων 8-10 του φυτού *Cistus salviifolius*, 9-11 του φυτού *Cistus creticus* subsp. *creticus*, 6-8 του φυτού *Cistus parviflorus*, 7-9 του φυτού *Cistus monspeliensis* και των κλασμάτων 10-11 του φυτού *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH σε αναλογία 65:35 και προσθήκη 0.5 mL FA (NP) Αριστερά: παρατήρηση στα 254nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και καύση.



Εικόνα 53 HPTLC των κλασμάτων 8-10 του φυτού *Cistus salviifolius*, 9-11 του φυτού *Cistus creticus* subsp. *creticus*, 6-8 του φυτού *Cistus parviflorus*, 7-9 του φυτού *Cistus monspeliensis* και των κλασμάτων 10-11 του φυτού *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* Σύστημα ανάπτυξης: H₂O:AcN σε αναλογία 65:35 και προσθήκη 0.5 mL FA (RP) Αριστερά: παρατήρηση στα 254nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και καύση.

13. Φυτοχημική μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Cistus monspeliensis*

Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, από τα 5 είδη *Cistus* που μελετήθηκαν, έγινε επιλογή του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Cistus monspeliensis* για περεταίρω ανάλυση και μελέτη των συστατικών που αυτό περιέχει. Αξίζει να σημειωθεί πως είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται φυτοχημική ανάλυση σε μεθανολικό εκχύλισμα *Cistus monspeliensis* της ελληνικής χλωρίδας.

13.1 Κλασμάτωση μεθανολικού εκχυλίσματος με χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση (FCPC)

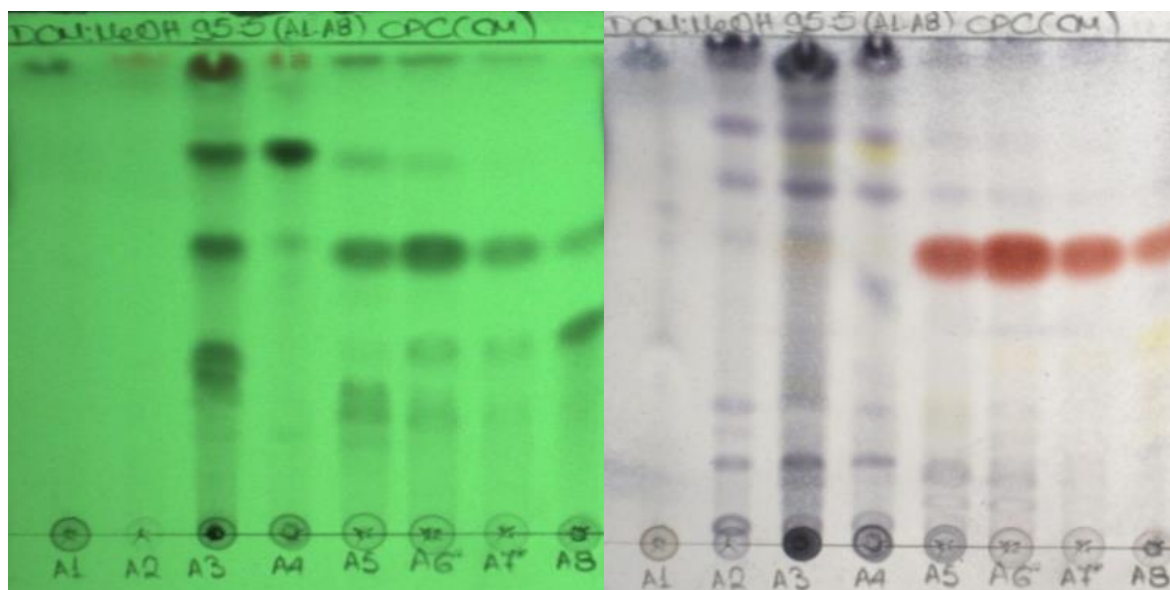
Με σκοπό την απομόνωση των συστατικών του του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του *Cistus monspeliensis* πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση (FCPC) μεγαλύτερης κλίμακας, σε στήλη χωρητικότητας 1000 mL.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε καθώς και το σύστημα των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε, ήταν ίδια με αυτή που περιεγράφηκε στο κεφάλαιο (*Κλασμάτωση των μεθανολικών εκχυλισμάτων με χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση (FCPC)*).

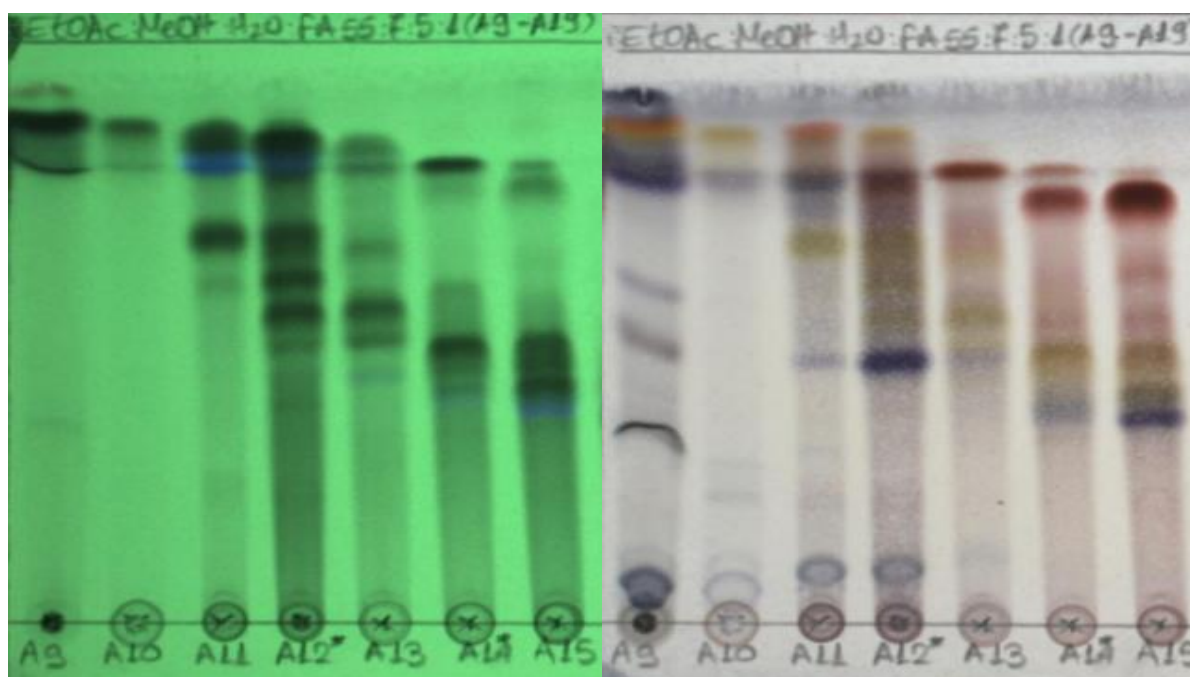
Πιο συγκεκριμένα, παρήχθησαν συνολικά 10 L τριφασικού συστήματος n-Hept:MTBE:AcN:H₂O σε αναλογία 1:1:2:1. Οι όγκοι των διαλυτών ήταν οι εξής: 2 L n-Hept, 2 L MTBE, 4 L AcN, 2 L H₂O. Μετά την απομάκρυνση της πάνω φάσης (UP₀, πρώτη κινητή φάση), ένα ισοδύναμο MTBE που αντιστοιχούσε σε όγκο 2 L προστέθηκε στη διαχωριστική χοάνη για την παραλαβή της δεύτερης κινητής (MP) και της στατικής φάσης (LP). Η πλήρωση της στήλης με τη στατική φάση (LP) έγινε σε descending mode, ροή 15 mL/min και χωρίς στροφές, ενώ κατά τη διάρκεια της διέλευσης της πρώτης (UP₀) και της δεύτερης (MP) κινητής φάσης σε ascending mode, η ροή ήταν 10 mL / min και στροφές 1000 rpm.

Από τη διαδικασία αυτή, παρελήφθησαν συνολικά 110 κλάσματα, όγκου 30 mL το καθένα, τα οποία στη συνέχεια συνενώθηκαν σε 26 κλάσματα (A1-A26).

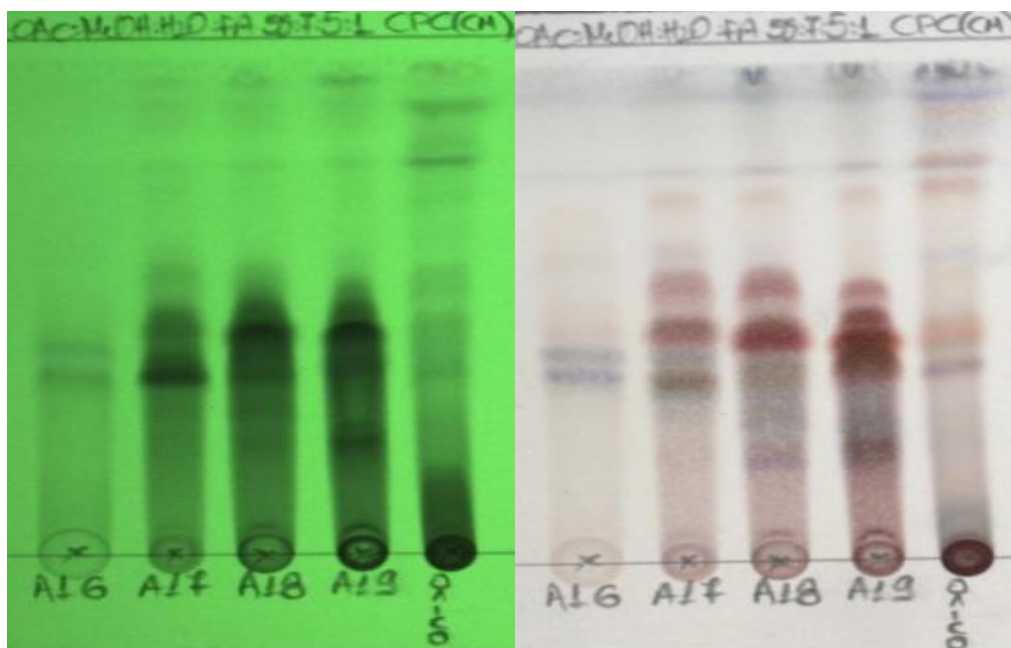
Η εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) δίνεται παρακάτω:



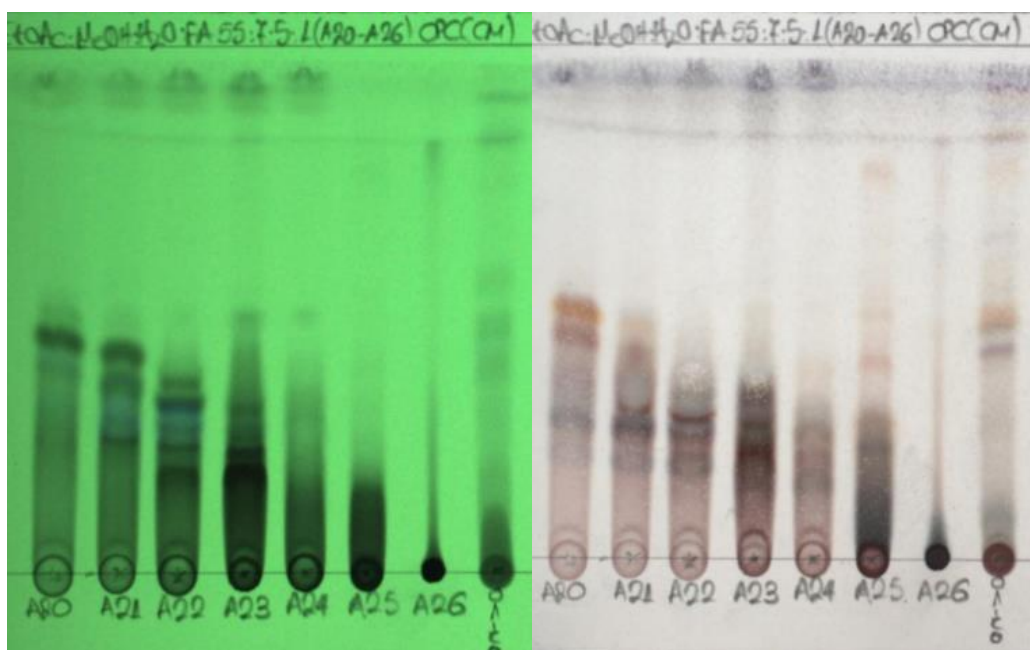
Εικόνα 54 Εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων A1-A8 με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) Σύστημα ανάπτυξης: DCM:MeOH σε αναλογία 95:5 Αριστερά: παρατήρηση στα 254 nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση.



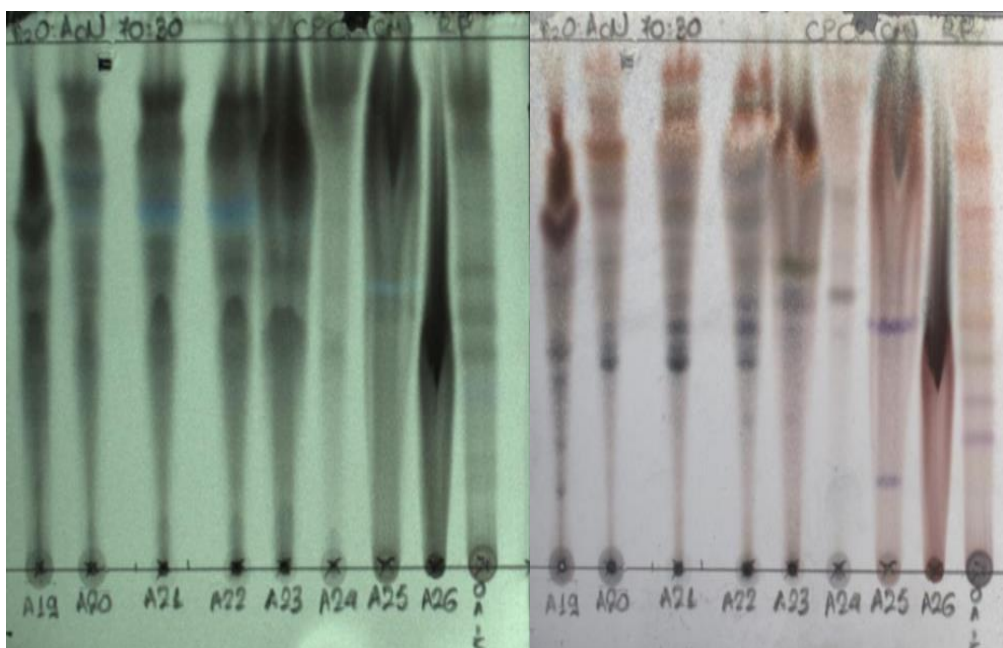
Εικόνα 55 Εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων A9-A15 με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1 Αριστερά: παρατήρηση στα 254 nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση.



Εικόνα 56 Εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων A16-A19 με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1 Αριστερά: παρατήρηση στα 254 nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση.



Εικόνα 57 Εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων A20-A26 με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1 Αριστερά: παρατήρηση στα 254 nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση.



Εικόνα 58 Εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων A19-A26 με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) Σύστημα ανάπτυξης: $\text{H}_2\text{O}:\text{AcN}$ σε αναλογία 70:30 (RP) Αριστερά: παρατήρηση στα 254 nm Δεξιά: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με θειική βανιλίνη και καύση.

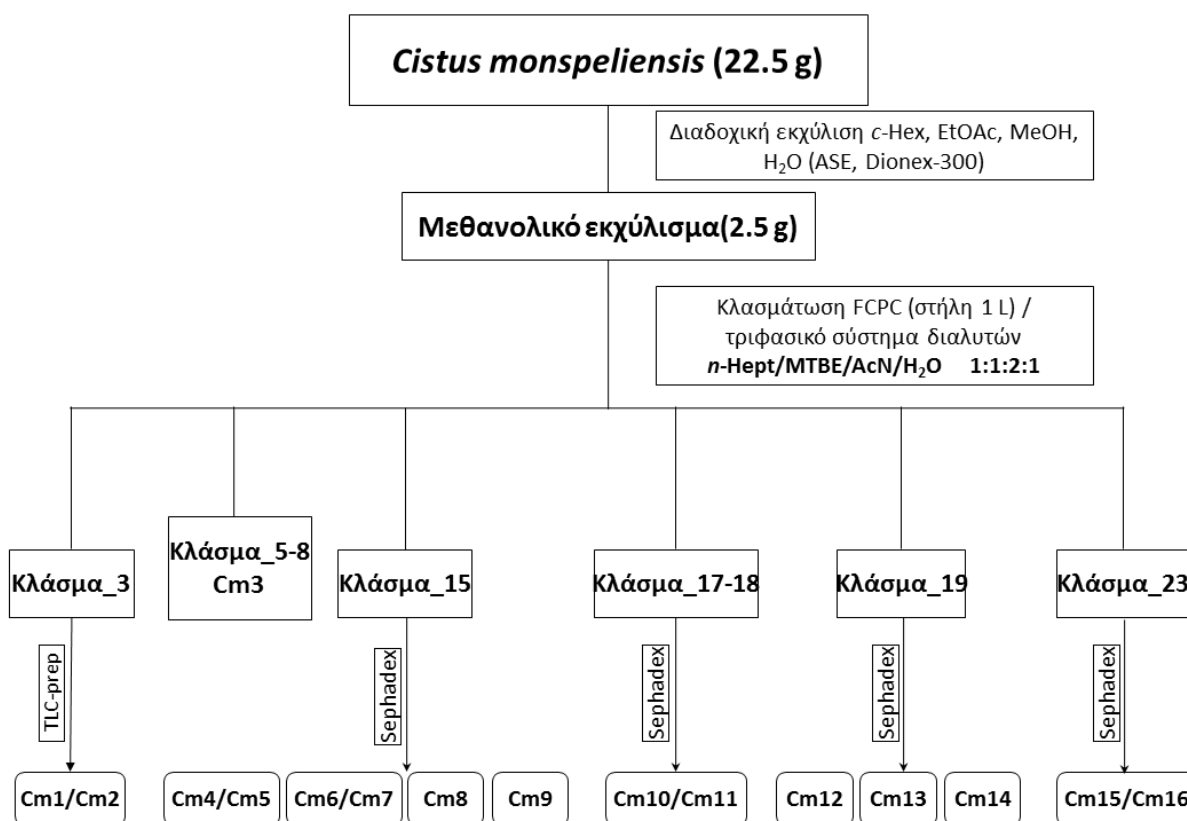
Τα βάρη των τελικών κλασμάτων συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Κωδικός Κλάσματος	Βάρος (g)
A1	0.0046
A2	0.0833
A3	0.0194
A4	0.0129
A5	0.0026
A6	0.0013
A7	0.0010
A8	0.0059
A9	0.0133
A10	0.0124
A11	0.0188
A12	0.0147
A13	0.0347
A14	0.0138
A15	0.0457
A16	0.0220
A17	0.0290
A18	0.0362
A19	0.0688
A20	0.0210
A21	0.0245
A22	0.0254
A23	0.1465
A24	0.0455
A25	0.1652
A26	1.3131

Η συνολική απόδοση της διαδικασίας προσδιορίστηκε σε ποσοστό 90.60%, καθώς το άθροισμα των μαζών των επιμέρους κλασμάτων ανέρχεται στα 2.1816 g, ενώ η αρχική ποσότητα από το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Cistus monspeliensis* ήταν 2.4079 g.

13.2 Απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών του *Cistus monspeliensis*

Η απομόνωση των κυριότερων συστατικών του μεθανολικού εκχυλίσματος των υπέργειων τμημάτων του φυτού *Cistus monspeliensis* πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης μοριακού αποκλεισμού Sephadex LH-20 και παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος. Συνολικά από την ανάλυση του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 16 δευτερογενείς μεταβολίτες (Εικόνα 59). Πιο συγκεκριμένα από τα 26 κλάσματα του CPC, 5 υποβλήθηκαν σε περεταίρω κλασμάτωση με τη χρήση της χρωματογραφίας στήλης μοριακού αποκλεισμού Sephadex LH-20 και 1 με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC - prep).



Εικόνα 59 Σχεδιάγραμμα απομόνωσης δευτερογενών μεταβολιτών

13.2.1 Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (prep-TLC) στο κλάσμα A3

Στο κλάσμα A3 που προέκυψε από τη χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση (CPC) του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Cistus monspeliensis* πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με σκοπό την απομόνωση των μεταβολιτών που περιέχονται σε αυτό. Από τη διαδικασία αυτή, απομονώθηκαν οι μεταβολίτες **cm1** και **cm2**.

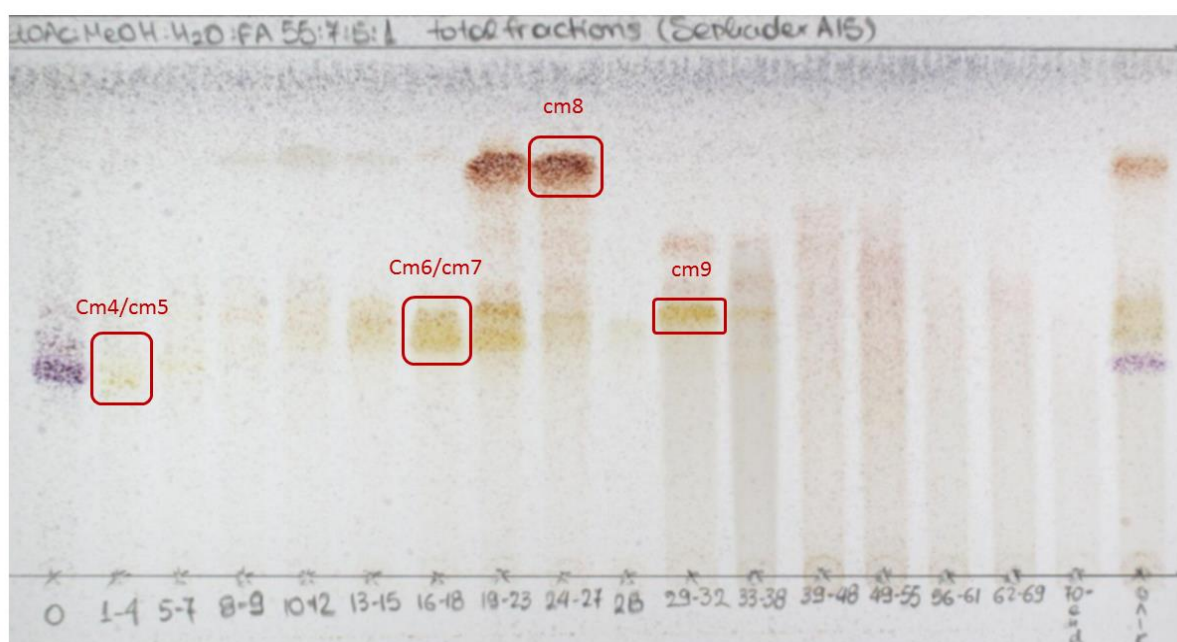
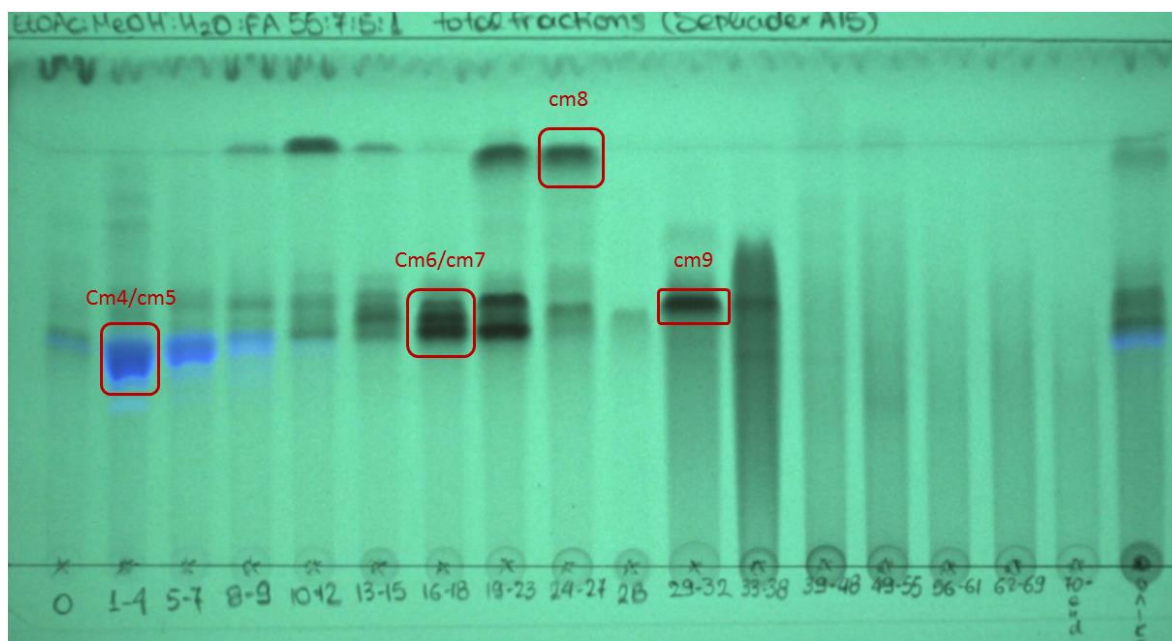
13.2.2 Sephadex LH-20 στο κλάσμα A15

Το πείραμα υλοποιήθηκε με τη χρήση γυάλινης στήλης, στην οποία τοποθετήθηκε το κλάσμα A15 βάρους 45.7 mg. Συνολικά παρελήφθησαν 90 κλάσματα, τα οποία ύστερα από έλεγχο με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας κανονικής και αντίστροφης φάσης, συνενώθηκαν σε 17 κλάσματα. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι κωδικοί των κλασμάτων πριν και μετά τις συνενώσεις αυτών, καθώς και τα βάρη των τελικών κλασμάτων:

Πίνακας 28 Κωδικοί και βάρη τελικών κλασμάτων από τη στήλη Sephadex LH-20 για το κλάσμα A15

Κλάσμα	Βάρος (g)
CM_CPC_A15_Seph0	0.0162
CM_CPC_A15_Seph2-4	0.0025
CM_CPC_A15_Seph5-7	0.0014
CM_CPC_A15_Seph8-9	0.0010
CM_CPC_A15_Seph10-12	0.0017
CM_CPC_A15_Seph13-15	0.0008
CM_CPC_A15_Seph16-18	0.0021
CM_CPC_A15_Seph19-23	0.0056
CM_CPC_A15_Seph24-27	0.0037
CM_CPC_A15_Seph28	0.0008
CM_CPC_A15_Seph29-32	0.0025
CM_CPC_A15_Seph33-38	0.0018
CM_CPC_A15_Seph39-48	0.0008
CM_CPC_A15_Seph49-55	0.0006
CM_CPC_A15_Seph56-61	0.0003
CM_CPC_A15_Seph62-69	0.0006
CM_CPC_A15_Seph70-end	0.0009

Οι φωτογραφίες που ακολουθούν απεικονίζουν τις ουσίες που εμπεριέχονται στα συνενωμένα κλάσματα με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Σε ορισμένα από τα κλάσματα αυτά πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος με NMR απ' όπου ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες **cm4**, **cm5**, **cm6**, **cm7**, **cm8** και **cm9**.



Εικόνα 60 Απεικόνιση των τελικών συνενωμένων κλασμάτων της στήλης Sephadex LH-20 του κλάσματος A15 με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Επάνω: παρατήρηση στα 254nm Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και καύση. Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1. Με κόκκινο περίγραμμα σημειώνονται οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν.

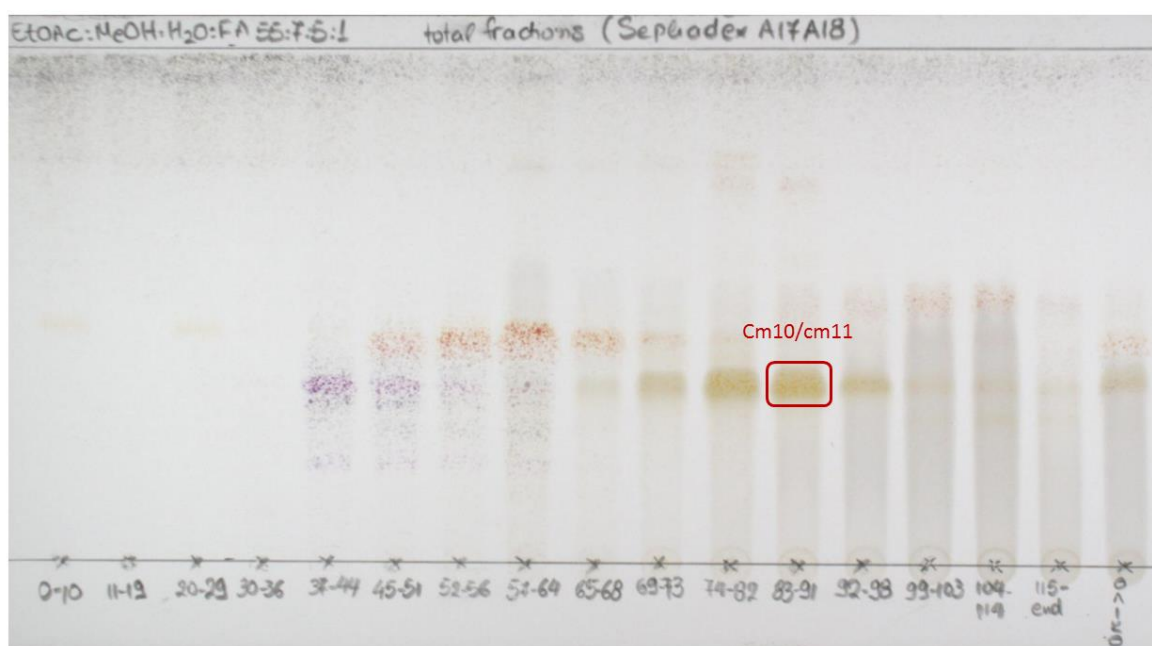
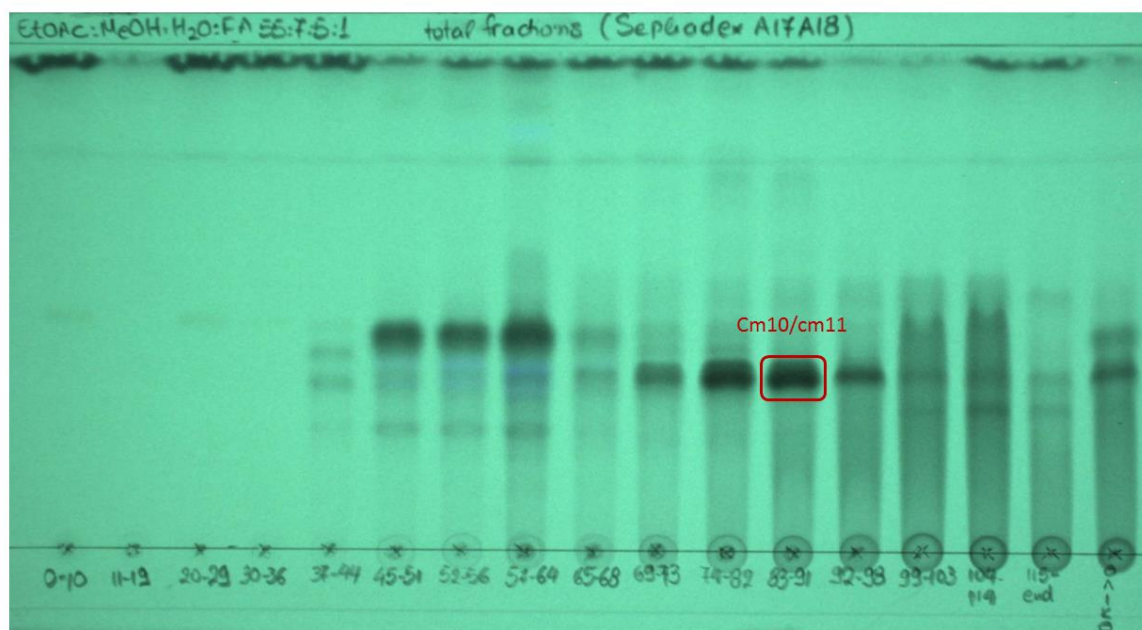
13.2.3 Sephadex LH-20 στο κλάσμα A17A18

Το πείραμα υλοποιήθηκε με τη χρήση γυάλινης στήλης όγκου περίπου 35 mL, στην οποία τοποθετήθηκε το κλάσμα A17 συνενωμένο με το κλάσμα A18 (συνολικού βάρους 65.2 mg). Συνολικά παρελήφθησαν 116 κλάσματα, τα οποία ύστερα από έλεγχο με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας κανονικής και αντίστροφης φάσης, συνενώθηκαν σε 16 κλάσματα. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι κωδικοί των κλασμάτων πριν και μετά τις συνενώσεις αυτών, καθώς και τα βάρη των τελικών κλασμάτων:

Πίνακας 29 Κωδικοί και βάρη τελικών κλασμάτων από τη στήλη Sephadex LH-20 για το κλάσμα A17A18

Κλάσμα	Βάρος (g)
CM_CPC_A1718_Seph0-10	0.0019
CM_CPC_A1718_Seph11-19	0.0005
CM_CPC_A1718_Seph20-29	0.0046
CM_CPC_A1718_Seph30-36	0.0028
CM_CPC_A1718_Seph37-44	0.0058
CM_CPC_A1718_Seph45-51	0.0091
CM_CPC_A1718_Seph52-56	0.0086
CM_CPC_A1718_Seph57-64	0.0099
CM_CPC_A1718_Seph65-68	0.0030
CM_CPC_A1718_Seph69-73	0.0027
CM_CPC_A1718_Seph74-82	0.0036
CM_CPC_A1718_Seph83-91	0.0039
CM_CPC_A1718_Seph92-98	0.0014
CM_CPC_A1718_Seph99-103	0.0014
CM_CPC_A1718_Seph104-114	0.0024
CM_CPC_A1718_Seph115-end	0.0046

Οι φωτογραφίες που ακολουθούν απεικονίζουν τις ουσίες που εμπεριέχονται στα συνενωμένα κλάσματα με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), στα 254nm, 366nm και κατόπιν ψεκασμού και θέρμανσης με τη χρήση του αντιδραστηρίου βανιλίνης. Το σύστημα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1. Σε ορισμένα από τα κλάσματα αυτά πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος με NMR απ' όπου ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες **cm10** και **cm11**.



Εικόνα 61 Απεικόνιση των τελικών συνενωμένων κλασμάτων της στήλης Sephadex LH-20 του κλάσματος A17A18 με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Επάνω: παρατήρηση στα 254nm Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και καύση. Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1. Με κόκκινο περίγραμμα σημειώνονται οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν.

13.2.4 Sephadex LH-20 στο κλάσμα A19

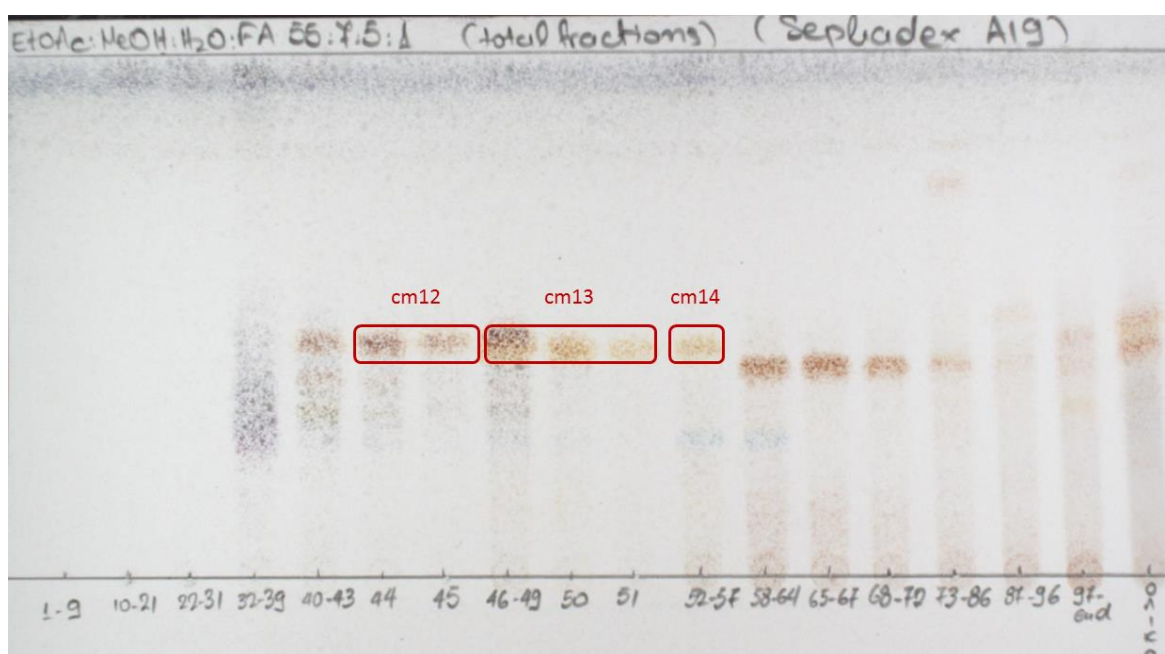
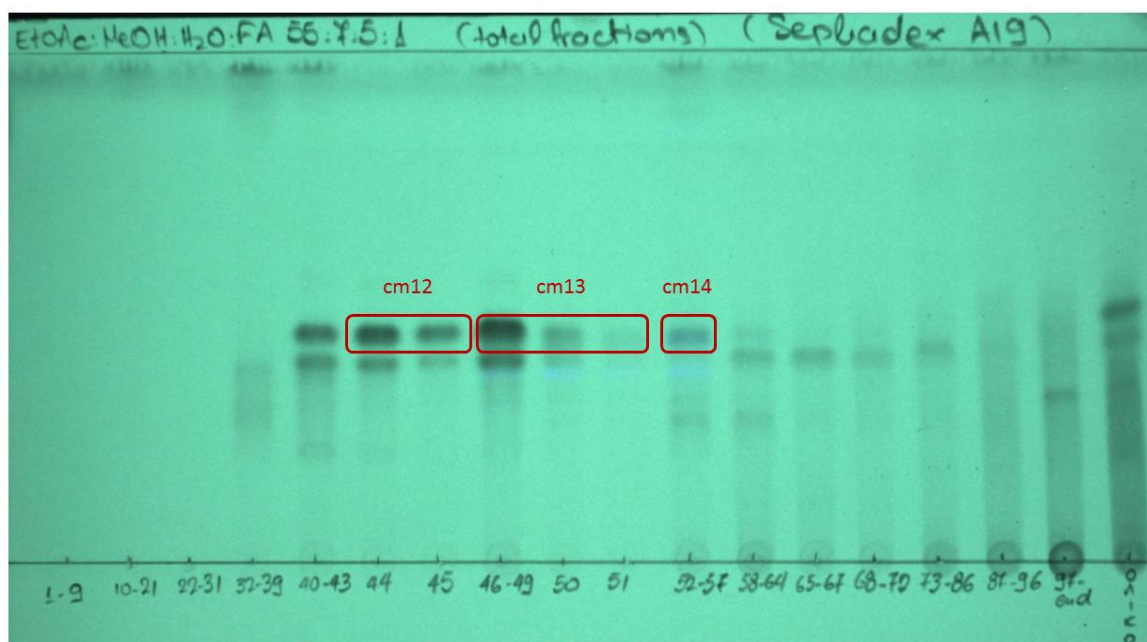
Το πείραμα υλοποιήθηκε με τη χρήση γυάλινης στήλης όγκου περίπου 35 mL, στην οποία τοποθετήθηκε το κλάσμα A19 βάρους 68.8 mg.

Συνολικά παρελήφθησαν 98 κλάσματα, τα οποία ύστερα από έλεγχο με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας κανονικής και αντίστροφης φάσης, συνενώθηκαν σε 17 κλάσματα. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι κωδικοί των κλασμάτων πριν και μετά τις συνενώσεις αυτών, καθώς και τα βάρη των τελικών κλασμάτων:

Πίνακας 30 Κωδικοί και βάρη τελικών κλασμάτων από τη στήλη Sephadex LH-20 για το κλάσμα A19

Κλάσμα	Βάρος (g)
CM_CPC_A19_Seph1-9	0.0006
CM_CPC_A19_Seph10-21	0.0011
CM_CPC_A19_Seph22-31	0.0007
CM_CPC_A19_Seph32-39	0.0057
CM_CPC_A19_Seph40-43	0.0051
CM_CPC_A19_Seph44	0.0008
CM_CPC_A19_Seph45	0.0005
CM_CPC_A19_Seph46-49	0.0038
CM_CPC_A19_Seph50	0.0009
CM_CPC_A19_Seph51	0.0001
CM_CPC_A19_Seph52-57	0.0005
CM_CPC_A19_Seph58-64	0.0004
CM_CPC_A19_Seph65-67	0.0001
CM_CPC_A19_Seph68-72	0.0008
CM_CPC_A19_Seph73-86	0.0013
CM_CPC_A19_Seph87-96	0.0012
CM_CPC_A19_Seph97-end	0.0021

Οι φωτογραφίες που ακολουθούν απεικονίζουν τις ουσίες που εμπεριέχονται στα συνενωμένα κλάσματα με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), στα 254nm, 366nm και κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου βανιλίνης και θέρμανσης. Το σύστημα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1. Σε ορισμένα από τα κλάσματα αυτά πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος με NMR απ' όπου ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες **cm12**, **cm13** και **cm14**.



Εικόνα 62 Απεικόνιση των τελικών συνενωμένων κλασμάτων της στήλης Sephadex LH-20 του κλάσματος A19 με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Επάνω: παρατήρηση στα 254nm Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και καύση. Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1. Με κόκκινο περίγραμμα σημειώνονται οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν.

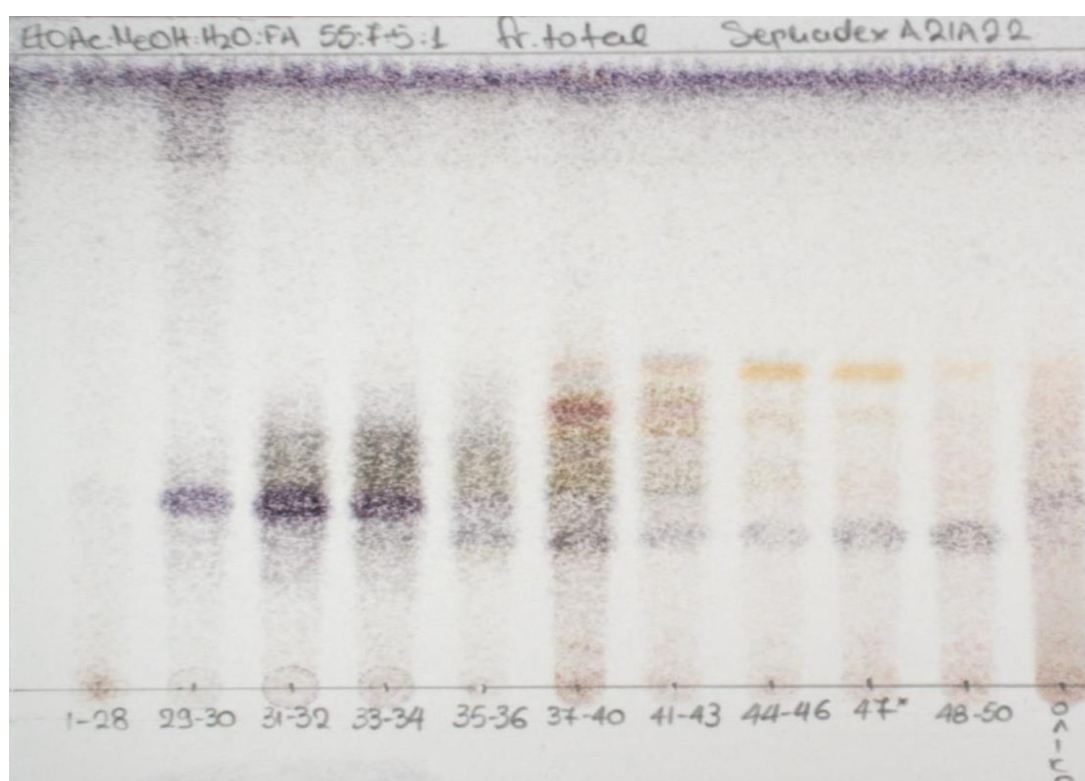
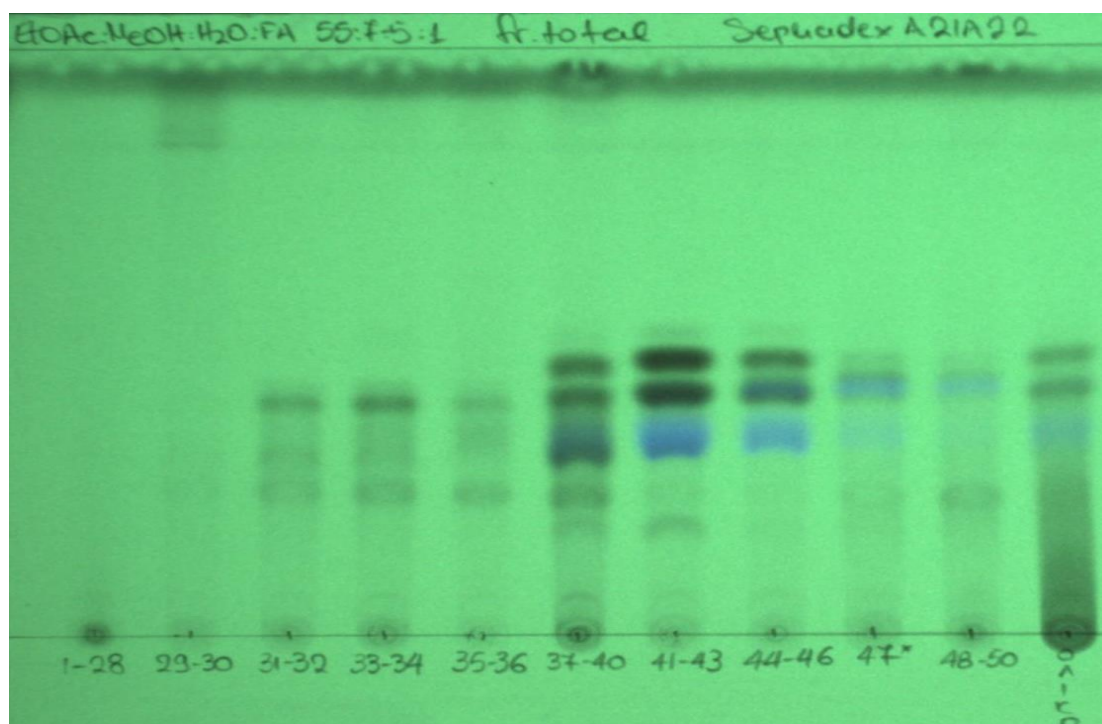
13.2.5 Sephadex LH-20 στο κλάσμα A21A22

Το πείραμα υλοποιήθηκε με τη χρήση γυάλινης στήλης όγκου περίπου 60 mL, στην οποία τοποθετήθηκε το κλάσμα A21 συνενωμένο με το κλάσμα A22, συνολικού βάρους 49.9 mg. Συνολικά παρελήφθησαν 121 κλάσματα, τα οποία ύστερα από έλεγχο με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας κανονικής και αντίστροφης φάσης, συνενώθηκαν σε 19 κλάσματα. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι κωδικοί των κλασμάτων πριν και μετά τις συνενώσεις αυτών, καθώς και τα βάρη των τελικών κλασμάτων:

Πίνακας 31 Κωδικοί και βάρη τελικών κλασμάτων από τη στήλη Sephadex LH-20 για το κλάσμα A21A22

Κλάσμα	Βάρος (g)
CM_CPC_A2122_Seph1-28	0.0009
CM_CPC_A2122_Seph29-30	0.0003
CM_CPC_A2122_Seph31-32	0.0007
CM_CPC_A2122_Seph33-34	0.0021
CM_CPC_A2122_Seph35-36	0.0019
CM_CPC_A2122_Seph37-40	0.0026
CM_CPC_A2122_Seph41-43	0.0026
CM_CPC_A2122_Seph44-46	0.0013
CM_CPC_A2122_Seph47	0.0002
CM_CPC_A2122_Seph48-50	0.0003
CM_CPC_A2122_Seph51-54	0.0010
CM_CPC_A2122_Seph55-59	0.0013
CM_CPC_A2122_Seph60-68	0.0015
CM_CPC_A2122_Seph69-76	0.0013
CM_CPC_A2122_Seph77-82	0.0010
CM_CPC_A2122_Seph83-95	0.0018
CM_CPC_A2122_Seph96-99	0.0013
CM_CPC_A2122_Seph100-110	0.0016
CM_CPC_A2122_Seph111-120	0.0018

Οι φωτογραφίες που ακολουθούν απεικονίζουν τις ουσίες που εμπεριέχονται στα συνενωμένα κλάσματα με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), στα 254nm, 366nm και κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου βανιλίνης και Θέρμανσης. Το σύστημα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1.



Εικόνα 63 Απεικόνιση των τελικών συνενωμένων κλασμάτων της στήλης Sephadex LH-20 του κλάσματος A15 με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Επάνω: παρατήρηση στα 254nm Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και καύση. Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1.

Δεν πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση μεταβολιτών, καθώς τα βάρη των κλασμάτων δεν επέτρεψαν την υλοποίηση φασματοσκοπικού ελέγχου με NMR.

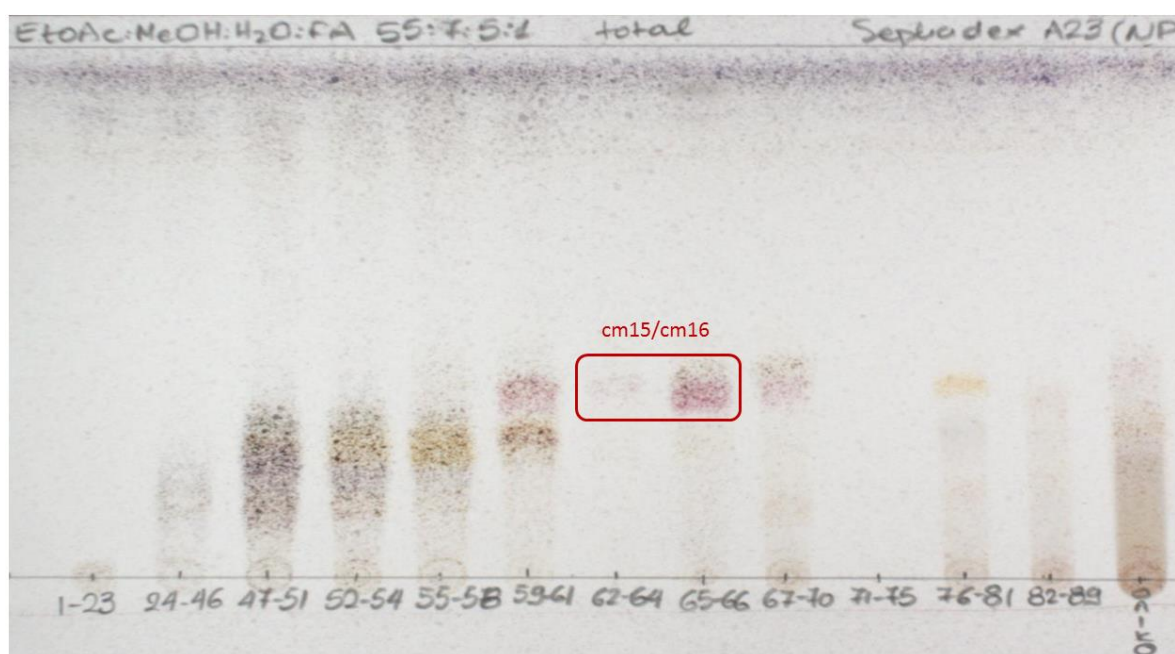
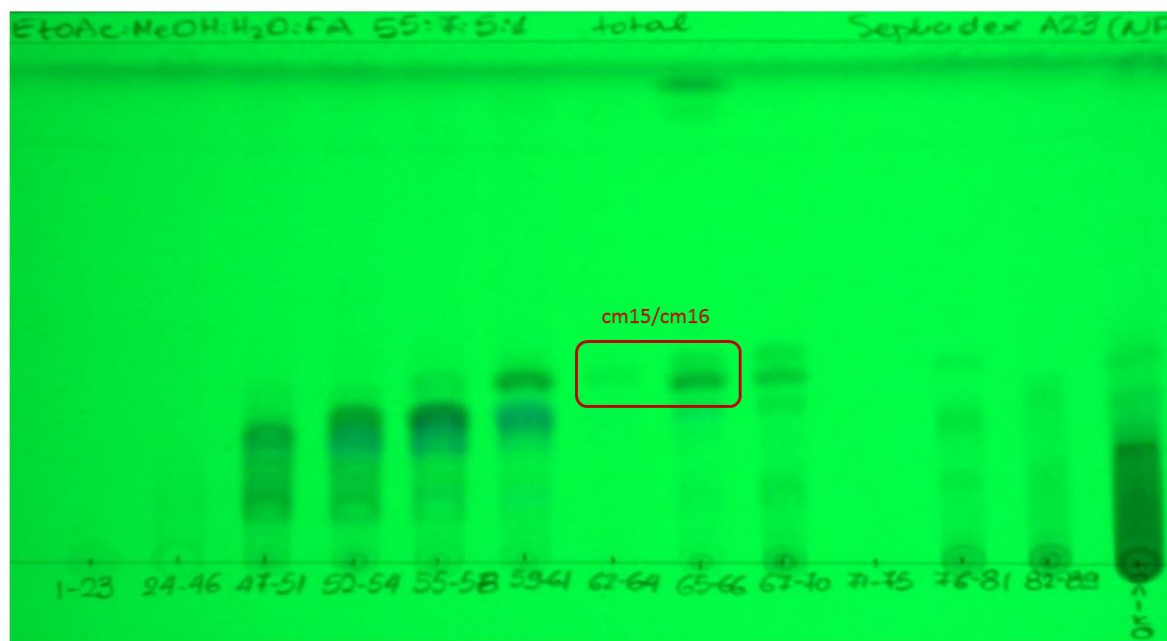
13.2.6 Sephadex LH-20 στο κλάσμα A23

Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση γυάλινης στήλης όγκου περίπου 75 mL, στην οποία τοποθετήθηκε το κλάσμα A23 βάρους 146.5 mg. Συνολικά παρελήφθησαν 180 κλάσματα, τα οποία ύστερα από έλεγχο με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας κανονικής και αντίστροφης φάσης, συνενώθηκαν σε 18 κλάσματα. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι κωδικοί των κλασμάτων πριν και μετά τις συνενώσεις αυτών, καθώς και τα βάρη των τελικών κλασμάτων:

Πίνακας 32 Κωδικοί και βάρη τελικών κλασμάτων από τη στήλη Sephadex LH-20 για το κλάσμα A23

Κλάσμα	Βάρος (g)
CM_CPC_A23_Seph1-23	0.0011
CM_CPC_A23_Seph24-46	0.0003
CM_CPC_A23_Seph47-51	0.0033
CM_CPC_A23_Seph52-54	0.0046
CM_CPC_A23_Seph55-58	0.0033
CM_CPC_A23_Seph59-61	0.0018
CM_CPC_A23_Seph62-64	0.0034
CM_CPC_A23_Seph65-66	0.0036
CM_CPC_A23_Seph67-70	0.0011
CM_CPC_A23_Seph71-75	0.0017
CM_CPC_A23_Seph76-81	0.0017
CM_CPC_A23_Seph82-89	0.0008
CM_CPC_A23_Seph90-101	0.0030
CM_CPC_A23_Seph102-104	0.0006
CM_CPC_A23_Seph105-115	0.0002
CM_CPC_A23_Seph116-137	0.0040
CM_CPC_A23_Seph138-176	0.0011
CM_CPC_A23_Seph177-180	0.0002

Οι φωτογραφίες που ακολουθούν απεικονίζουν τις ουσίες που εμπεριέχονται στα συνενωμένα κλάσματα με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), στα 254nm, 366nm και κατόπιν ψεκασμού και καύσης με τη χρήση του αντιδραστηρίου βανιλίνης. Το σύστημα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1. Σε ορισμένα από τα κλάσματα αυτά πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικός έλεγχος με NMR απ' όπου ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες **cm15** και **cm16**.



Εικόνα 64 Απεικόνιση των τελικών συνενωμένων κλασμάτων της στήλης Sephadex LH-20 του κλάσματος A23 με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Επάνω: παρατήρηση στα 254nm Κάτω: εμφάνιση στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με τη χρήση του αντιδραστηρίου της θειικής βανιλίνης και καύση. Σύστημα ανάπτυξης: EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 55:7:5:1. Με κόκκινο περίγραμμα σημειώνονται οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν.

13.3 Φασματοσκοπικά δεδομένα δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού *Cistus monspeliensis*

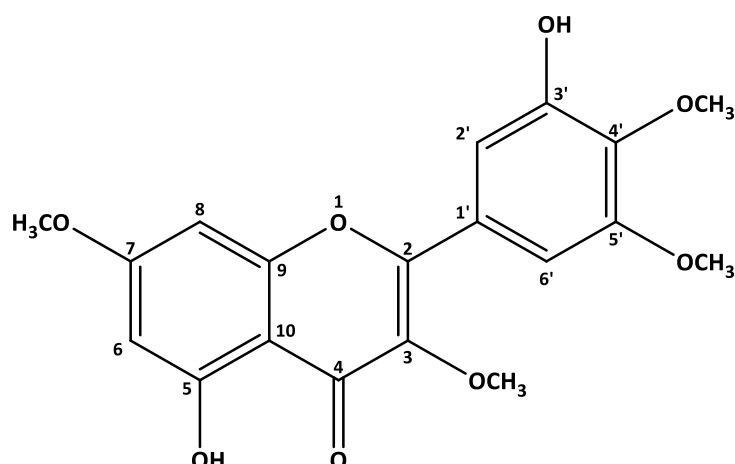
13.3.1 Μεταβολίτης **cm1**

Ο μεταβολίτης **cm1** παραλήφθηκε με τη μορφή υποκίτρινης σκόνης μετά την επεξεργασία του κλάσματος A3 του CPC του μεθανολικού εκχυλίσματος *Cistus monspeliensis* με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται κίτρινη. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **cm1** είναι η **3, 7, 4', 5'-τετρα-Ο-μεθυλομυρικετίνη**.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούνται σήματα στην περιοχή 7.70-6.20 ppm, τα οποία αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια της ένωσης, ενώ σε δ 3.95-3.75 εμφανίζονται τα σήματα των μεθοξυλίων ως απλές κορυφές. Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή παρατηρούμε δυο ευρείες απλές κορυφές στα 6.63 και 6.34 που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούν στα H-8 και H-6 του δακτυλίου A. Η μετατόπιση των σημάτων τους σε χαμηλότερα πεδία, σε σύγκριση με τις φλαβονόλες που φέρουν υδροξυλομάδες στις θέσεις C-7 και C-5, υποδηλώνει υποκατάσταση μίας ή/και των δύο υδροξυλομάδων των προαναφερόμενων θέσεων. Επίσης, στην ίδια περιοχή του φάσματος εμφανίζεται μια ευρεία απλή κορυφή (δ 7.32), η οποία ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα H-2' και H-6'. Οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται σε δ 108.6 και 105.1 αντίστοιχα, γεγονός που φανερώνει ότι δεν υπάρχει χημική ισοδυναμία και δικαιολογεί την διαφορετική υποκατάσταση στις θέσεις C-3' και C-5'. Τέλος στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρουσιάζονται 4 απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν στα μεθοξύλια των θέσεων C-3, C-7, C-4', C-5'. Συγκεκριμένα, σε δ 3.91 παρατηρούμε την κορυφή του μεθοξυλίου της θέσης 7, καθώς στο φάσμα HMBC φαίνεται η σύζευξη ανάμεσα στα προαναφερόμενα πρωτόνια και τον άνθρακα C-7 στα 167.9 ppm. Αντίστοιχα, στα 3.84 ppm παρατηρούμε την κορυφή του μεθοξυλίου της θέσης 3 καθώς από το φάσμα HMBC παρατηρούμε το σήμα σύζευξης με τον άνθρακα C-3 στα 141.1 ppm. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι οι άνθρακες των $\text{CH}_3\text{O}-3$ (δ 60.3) και $\text{CH}_3\text{O}-4'$ (δ 61.1) είναι πιο αποθωρακισμένοι από τους άνθρακες των μεθοξυλομάδων $\text{CH}_3\text{O}-7$ (δ

55.8) και $\text{CH}_3\text{O}-5'$ (δ 56.1). Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Zaiter et al., 2012).

3, 7, 4', 5'–τετραμεθυλμυρικετίνη



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
2	-	155.0
3	-	141.1
3-OCH ₃	3.84 (3H, s)	60.3
4	-	178.8
5	-	162.0
6	6.34 (1H, brs)	98.0
7	-	167.9
7-OCH ₃	3.91 (3H, s)	55.8
8	6.63 (1H, brs)	92.9
9	-	156.8
10	-	106.7
1'	-	126.0
2'	7.32 (1H, brs)	108.6
3'	-	152.1
4'	-	137.9
4'-OCH ₃	3.90 (3H, s)	61.1
5'	-	149.2
5'-OCH ₃	3.94 (3H, s)	56.1
6'	7.32 (1H, brs)	105.1

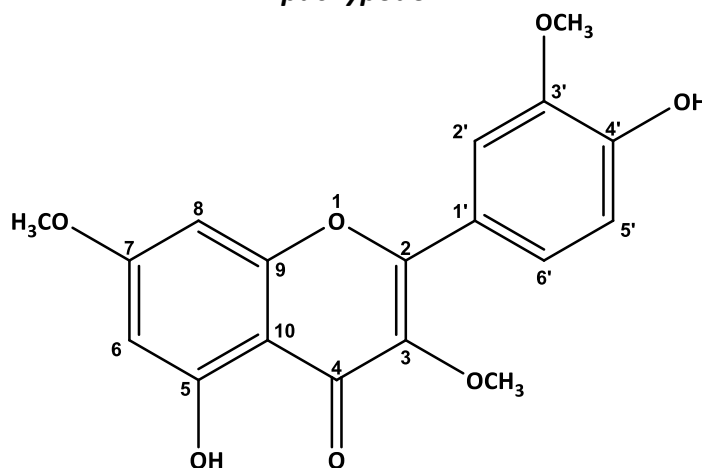
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ουσία **3, 7, 4', 5'– τετρα-O-μεθυλομυρικετίνη** έχει απομονωθεί στο παρελθόν από το είδος *Cistus monspeliensis* (Demetzos et al., 2001; Venditti et al., 2014) ενώ παρουσιάζει μέτρια δραστικότητα έναντι μιας MDR ανθεκτικής σειράς (Kennedy et al., 2011) και αντιμικροβιακή δράση (Demetzos et al., 2001).

13.3.2 Μεταβολίτης cm2

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **cm2** εμφανίζονται παρόμοια με αυτά του μεταβολίτη **cm1**. Οι διαφορές στα φάσματα των δύο ενώσεων εντοπίζονται στα σήματα των πρωτονίων του δακτυλίου Β, καθώς παρατηρείται μια διπλή κορυφή στα 7.72 ppm με μικρή σταθερά σύζευξης, μια διπλή κορυφή στα 6.99 ppm με σταθερά σύζευξης 8.3 Hz (*ortho*- σύζευξη) και μια ευρεία διπλή κορυφή στα 7.68 ppm με σταθερά σύζευξης 8.3 Hz. Οι κορυφές αυτές υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός ABX συστήματος με υποκατάσταση στις θέσεις C-3' και C-4'. Τέλος, παρατηρείται η ύπαρξη μιας απλής κορυφής στα 4.01 ppm που ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια και αντιστοιχεί στη μεθύλυ ομάδα της θέσης C-3', ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 56.0 ppm.

Η απόλυτη ταύτιση των υπολοίπων σημάτων του μεταβολίτη **cm1** με τα αντίστοιχα σήματα του μεταβολίτη **cm2** οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για την ουσία **pachypodol** (**3,7,3'**-τριμεθυλ-αιθέρας της κερκετίνης). Η δομή αυτή επιβεβαιώθηκε με αυτά της βιβλιογραφίας (Nantapap et al., 2017).

pachypodol



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
2	-	155.7
3	-	141.1
3-OCH ₃	3.84 (3H, s)	61.1
4	-	178.8
5	-	161.9
6	6.34 (1H, brs)	97.9
7	-	161.9
7-OCH ₃	3.92 (3H, s)	56.0
8	6.63 (1H, brs)	93.8

9	-	156.74
10	-	107.3
1'	-	124.4
2'	7.72 (1H, <i>brs</i>)	114.4
3'	-	151.2
3'-OCH ₃	4.01 (3H, <i>s</i>)	56.0
4'	-	149.6
5'	6.99 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.3)	110.4
6'	7.68 (1H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 8.3)	121.52

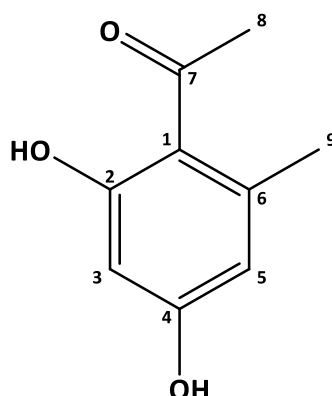
Η ουσία **pachypodol** σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα παρουσιάζει αντιμικροβιακή, αντιμεταλλαξιγόνο και αντιεμετική δράση (Ali et al., 2008). Η **pachypodol** (3,7,3'-τριμεθυλαιθέρας της κερκετίνης) ταυτοποιείται για πρώτη φορά στο γένος *Cistus*.

13.3.3 Μεταβολίτης **cm3**

Ο μεταβολίτης **cm3** παραλήφθηκε με τη μορφή σκούρας πορφυρής σκόνης από τα κλάσματα A5, A6, A7 και A8 κατά την επεξεργασία του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* με τη χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση (CPC). Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται πορφυρο-κόκκινη. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι πρόκειται για την ουσία **2, 4 – διυδροξυ–6–μεθυλακετοφαινόνη**.

Συγκεκριμένα, τα σήματα των πρωτονίων H-3 και H-5 εμφανίζονται με τη μορφή διπλών κορυφών που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία σε δ 6.14 (*d*, *J* = 2.4 Hz, *meta*-σύζευξη) και 6.19 (*d*, *J* = 2.4 Hz, *meta*-σύζευξη) αντίστοιχα, ενώ τα πρωτόνια των μεθυλίων των θέσεων C-8 και C-9 εμφανίζονται ως απλές κορυφές που ολοκληρώνουν για 3 πρωτόνια η κάθε μία σε δ 2.56 και 2.42 με τους αντίστοιχους άνθρακες σε δ 32.5 και 23.2. Αξίζει να σημειωθεί πως τα πρωτόνια της θέσης C-8 εμφανίζονται σε χαμηλότερα πεδία σε σχέση με τα μεθυλικά πρωτόνια της θέσης C-9 λόγω της αποθωράκισης από το καρβονύλιο της θέσης C-7. Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Yu et al., 1998).

2, 4 – διυδροξυ – 6 – μεθυλακετοφενόνη



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
1	-	118.1
2	-	159.2
3	6.14 (1H, d, J=2.4)	101.1
4	-	160.2
5	6.19 (1H, d, J=2.4)	112.0
6	-	142.7
7	-	206.5
8-CH ₃	2.56 (3H, s)	32.5
9-CH ₃	2.42 (3H, s)	23.2

Η ουσία **2,4-διυδροξυ-6-μεθυλακετοφαινόνη** εντοπίζεται για πρώτη φορά στο γένος *Cistus* ενώ σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, παρουσιάζει αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση (Hussain et al., 2018).

13.3.4 Μεταβολίτης **cm4**

Ο μεταβολίτης **cm4** παραλήφθηκε σε μίγμα με το μεταβολίτη **cm5** με τη μορφή κίτρινης σκόνης κατά την επεξεργασία του κλάσματος A15 του CPC του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* σε στήλη Sephadex LH-20. Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται κίτρινη. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι για την ουσία **5-O-γλυκοπυρανοσυλο-2-(4, 5-διμεθοξυ-3-υδροξυφαινυλο)-3, 7-διμεθοξυχρωμεν-4-όνη**.

Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή του φάσματος ¹H-NMR παρατηρούμε δύο διπλές κορυφές (J = 2.3 Hz) σε δ 6.94 και 6.93, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-8 του δακτυλίου A, ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται σε δ 103.8 και 97.2. Η

αποθωράκιση των πρωτονίων H-6 και H-8 είναι χαρακτηριστική της γλυκοσυλίσωσης στη θέση 5 της γενίνης, η οποία επιβεβαιώνεται από το φάσμα HMBC στο οποίο φαίνεται η σύζευξη 3J ανάμεσα στο ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόσης (δ 4.94, *d*, $J = 7.7$) και τον άνθρακα C-5 (δ 159.8).

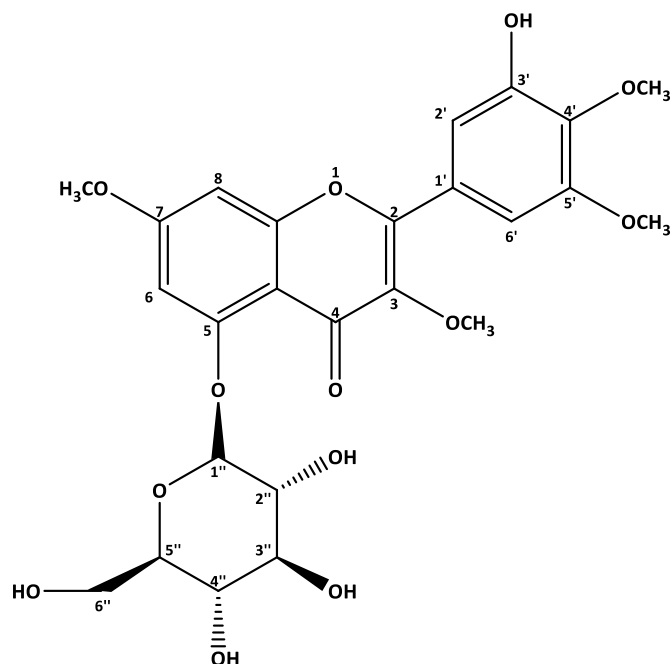
Επίσης, στην αρωματική περιοχή του φάσματος εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές ($J = 2.0$ Hz) σε δ 7.34 και 7.35 τα πρωτόνια του H-2' και H-6', ενώ το γεγονός ότι τα προαναφερόμενα πρωτόνια δεν είναι χημικώς ισοδύναμα συνάδει με την σύνδεση των δύο μεθοξυλομάδων του δακτυλίου B στις θέσεις 4' και 5' και όχι στις θέσεις 3' και 5'. Η σύνδεση των τεσσάρων μεθοξυλομάδων επιβεβαιώνεται από τα σήματα των συζεύξεων 3J ανάμεσα στα πρωτόνιά τους και τους αντίστοιχους οξυγονωμένους αρωματικούς άνθρακες σε δ 142.3 (C-3), δ 166.4 (C-7), δ 140.6 (C-4') και δ 155.0 (C-5'). Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι οι άνθρακες των CH₃O-3 (δ 60.8) και CH₃O-4' (δ 61.4) είναι πιο αποθωρακισμένοι από τους άνθρακες των μεθοξυλομάδων CH₃O-7 (δ 56.9) και CH₃O-5' (δ 56.9).

Επιπλέον, χαρακτηριστικά είναι και τα υπόλοιπα σήματα της γλυκοπυρανόζης, τα οποία εμφανίζονται στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ ως μία διπλή-διπλής κορυφή ($J = 9.5 / 7.7$, H-2'') σε δ 3.66, μία τριπλή κορυφή ($J = 9.5$, H-3'') σε δ 3.54, μία τριπλή κορυφή ($J = 9.5$, H-4'') σε δ 3.45, μία πολλαπλή κορυφή σε δ 3.52 (H-5'') και μία διπλή-διπλής κορυφή ($J = 12.0 / 6.0$, H-6b'') σε δ 3.76.

Με βάση τα δεδομένα τα οποία προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 1D και 2D-NMR επιτεύχθηκε η απόδοση των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

5-Ο-γλυκοκυρανοσυλο-2-(4, 5-διμεθοξυ-3-υδροξυφαινυλο)-3, 7-διμεθοξυχρωμεν-4-

όνη



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
2		155.8
3		142.3
4		178.8
5		159.8
6	6.93 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.3)	103.8
7		166.4
8	6.93 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.3)	97.2
9		160.2
10		110.8
1'		127.4
2'	7.32 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =2.1)	105.7
3'		152.0
4'		140.6
5'		155.0
6'	7.32 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =2.1)	111.1
CH ₃ O-3	3.82 (3H, <i>s</i>)	60.8
CH ₃ O-7	3.96 (3H, <i>s</i>)	56.9
CH ₃ O-4'	3.89 (3H, <i>s</i>)	61.4
CH ₃ O-5'	3.95 (3H, <i>s</i>)	56.9
1''	4.94 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.7)	105.0
2''	3.66 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9.5 / 7.7)	74.9
3''	3.54 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9.5)	77.6
4''	3.45 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9.5)	71.6
5''	3.52 (1H, <i>m</i>)	78.8
6''	3.96 (1H, *) / 3.76 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12.0 / 6.0)	62.8

Μολονότι, ο μεταβολίτης **cm4** αποτελεί νέο φυσικό προϊόν, με βάση την αναζήτηση της διεθνούς βιβλιογραφίας που έλαβε χώρα στη βάση δεδομένων 'REAXYS', το αντίστοιχο μη γλυκοσυλιωμένο παράγωγο έχει απομονωθεί στο παρελθόν από το είδος *C. monspeliensis* (Demetzos et al., 2001).

13.3.5 Μεταβολίτης **cm5**

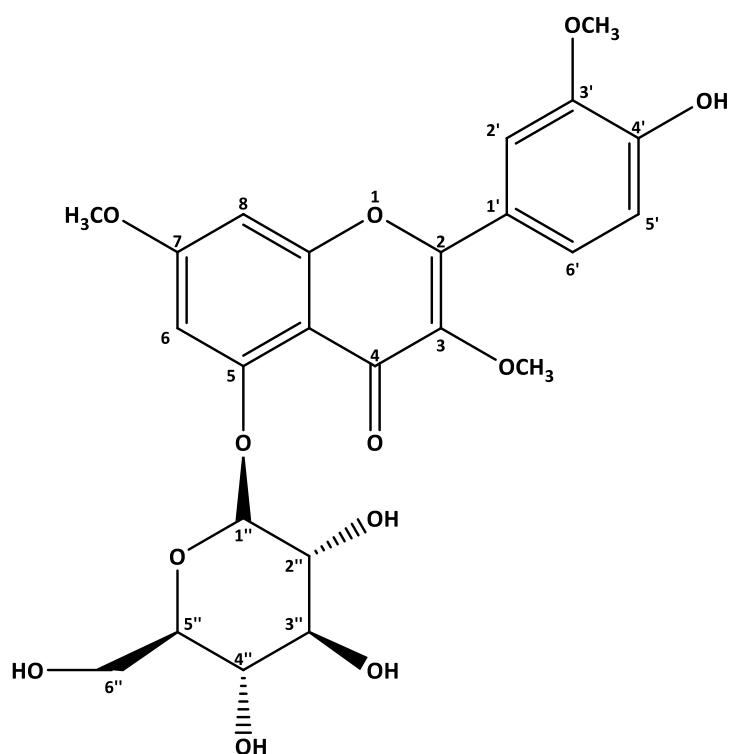
Ο μεταβολίτης **cm5** παραλήφθηκε σε μείγμα με το μεταβολίτη **cm4** με τη μορφή κίτρινης σκόνης κατά την επεξεργασία του κλάσματος A15 του CPC του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* σε στήλη Sephadex LH-20. Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται κίτρινη. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **cm5** πρόκειται για την ουσία **5-O-γλυκοκυρανοσυλ-2-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)-3,7-διμεθοξυ-5-υδροξυχρωμεν-4-όνη**.

Πιο συγκεκριμένα, στην αρωματική περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ παρατηρούμε δύο διπλές κορυφές ($J = 2.3 \text{ Hz}$) σε δ 6.95 και 6.94, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-6 και H-8 του δακτυλίου A, ενώ οι αντίστοιχοι άνθρακες συντονίζονται σε δ 104.0 και 97.1. Η αποθωράκιση των πρωτονίων H-6 και H-8 είναι χαρακτηριστική της γλυκοσυλίσωσης στη θέση 5 της γενίνης, η οποία επιβεβαιώνεται από το φάσμα HMBC στο οποίο φαίνεται η σύζευξη 3J ανάμεσα στο ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόσης (δ 4.93, d , $J = 7.7$) και τον άνθρακα C-5 (δ 159.8). Επίσης, στην ίδια περιοχή του φάσματος εμφανίζονται οι κορυφές ενός ABX τρισυποκατεστημένου αρωματικού συστήματος και συγκεκριμένα μία διπλή κορυφή ($J = 2.1 \text{ Hz}$) σε δ 7.78 (H-2'), μία διπλή-διπλής κορυφή ($J = 8.5 / 2.1$) σε δ 7.70 (H-6') και μία διπλή κορυφή ($J = 8.5 \text{ Hz}$) δ 6.97. Οι θέσεις σύνδεσης των τριών μεθοξυλομάδων καθορίστηκαν από τα σήματα των συζεύξεων 3J ανάμεσα στα πρωτόνιά τους και τους αντίστοιχους οξυγονωμένους αρωματικούς άνθρακες σε δ 142.4 (C-3), δ 166.5 (C-7) και δ 149.8 (C-3'). Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι ο άνθρακας του $\text{CH}_3\text{O-3}$ (δ 60.5) είναι πιο αποθωρακισμένος από τους άνθρακες των μεθοξυλομάδων $\text{CH}_3\text{O-7}$ (δ 57.0) και $\text{CH}_3\text{O-5'}$ (δ 57.0). Επιπλέον, χαρακτηριστικά είναι και τα υπόλοιπα σήματα της γλυκοκυρανόζης, τα οποία εμφανίζονται στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ ως μία διπλή-διπλής κορυφή ($J = 9.5 / 7.7$, H-2'') σε δ 3.66, μία τριπλή κορυφή ($J = 9.5$, H-3'') σε δ 3.54,

μία τριπλή κορυφή ($J = 9.5$, H-4'') σε δ 3.45, μία πολλαπλή κορυφή σε δ 3.52 (H-5'') και μία διπλή-διπλής κορυφή ($J = 12.0 / 6.0$, H-6b'') σε δ 3.76.

Με βάση τα δεδομένα τα οποία προέκυψαν από τη μελέτη των φασμάτων 1D και 2D-NMR επιτεύχθηκε η απόδοση των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης όπως φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

5-Ο-γλυκοκυρανοσυλ-2-(3-μεθοξυ-4-υδροξυφαινυλο)-3,7-διμεθοξυ-5-υδροξυχρωμεν-4-όνη.



Θέση	$^1\text{H NMR}$ δ σε ppm (J σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ δ σε ppm
2	-	157.1
3	-	142.4
4	-	171.7
5	-	160.1
6	6.95 (1H, d , $J = 2.2$)	104.0
7	-	166.6
8	6.94 (1H, d , $J = 2.2$)	97.1
9	-	160.2
10	-	110.9
1'	-	121.2
2'	7.78 (1H, d , $J=2.1$)	105.7
3'	-	152.0
4'	-	140.6

5'		155.0
6'	7.32 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =2.1)	111.1
CH ₃ O-3	3.82 (3H, <i>s</i>)	60.8
CH ₃ O-7	3.96 (3H, <i>s</i>)	56.9
CH ₃ O-4'	3.89 (3H, <i>s</i>)	61.4
CH ₃ O-5'	3.95 (3H, <i>s</i>)	56.9
1''	4.94 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.7)	105.0
2''	3.66 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9.5 / 7.7)	74.9
3''	3.54 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9.5)	77.6
4''	3.45 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 9.5)	71.6
5''	3.52 (1H, <i>m</i>)	78.8
6''	3.96 (1H, *) / 3.76 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12.0 / 6.0)	62.8

Μολονότι, ο μεταβολίτης **cm5** αποτελεί νέο φυσικό προϊόν, με βάση την αναζήτηση της διεθνούς βιβλιογραφίας που έλαβε χώρα στη βάση δεδομένων 'REAXYS', το αντίστοιχο μη γλυκοσυλιωμένο παράγωγο έχει απομονωθεί στο παρελθόν από διάφορα φυτικά είδη.

13.3.6 Μεταβολίτης cm6

Ο μεταβολίτης **cm6** παραλήφθηκε σε μείγμα με τη μορφή κίτρινης σκόνης κατά την επεξεργασία του κλάσματος A15 του CPC του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* σε στήλη Sephadex LH-20. Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται κίτρινη. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι πρόκειται για την ουσία **3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης της κερκετίνης (ισοκερκετίνη)**.

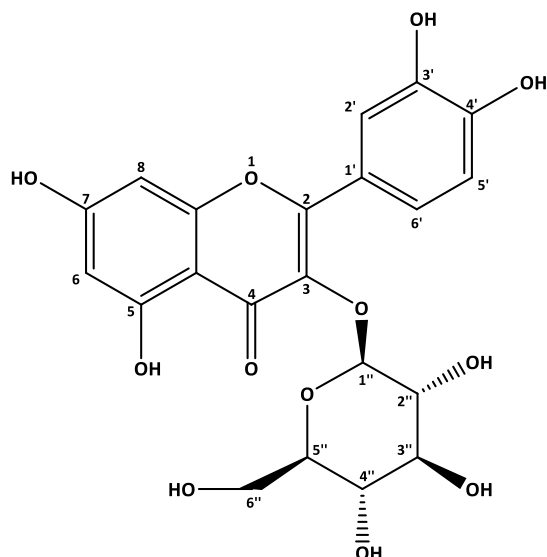
Στο φάσμα ¹H-NMR φαίνεται η ύπαρξη μίας φλαβονόλης, καθώς και ενός σακχάρου. Συγκεκριμένα τα σήματα των πρωτονίων H-2' και H-5' του δακτυλίου B εμφανίζονται με τη μορφή διπλών κορυφών που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία σε δ 7.73 (H-2', *d*, *J* = 2.0 Hz) και 6.89 (H-5', *d*, *J* = 8.4 Hz), ενώ το σήμα του πρωτονίου H-6' εμφανίζεται ως διπλώς διπλή κορυφή στα 7.61 ppm (H-6', *dd*, *J* = 8.4/2.0 Hz) χαρακτηριστικό της *ortho*- και *meta*- σύζευξης του με τα πρωτόνια H-5' και H-2', αντίστοιχα. Σε υψηλότερα πεδία εμφανίζονται τα H-6 και H-8 της φλαβονόλης με τη μορφή διπλών κορυφών με σταθερά σύζευξης *J* = 2.1 Hz σε δ 6.22 και 6.42, αντίστοιχα.

Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρούνται τα χαρακτηριστικά σήματα της γλυκοκυρανόσης. Πιο συγκεκριμένα το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται με τη μορφή διπλής κορυφής σε δ 5.29 (*d*, *J* = 7.6 Hz) και το πρωτόνιο H-5'' εμφανίζεται ως πολλαπλή

κορυφή σε δ 3.24, ενώ τα υπόλοιπα πρωτόνια του σακχάρου συντονίζονται σε δ 3.65-3.40 δίνοντας επικαλυπτόμενα σήματα.

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Yu et al., 1998).

3-O- β -D-γλυκοκυρανοσίδης της κερκετίνης (ισοκερκετίνη)



Θέση	^1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm
2	-	158.4
3	-	135.6
4	-	179.5
5	-	163.0
6	6.22 (1H, d , $J=2.1$)	100.0
7	-	166.0
8	6.42 (1H, d , $J=2.1$)	94.7
9	-	158.4
10	-	105.7
1'	-	123.1
2'	7.73 (1H, d , $J = 2.0$)	117.6
3'	-	145.9
4'	-	150.0
5'	6.89 (1H, d , $J = 8.4$)	116.0
6'	7.61 (1H, dd , $J = 8.4 / 2.0$)	123.2
1''	5.29 (1H, d , $J = 7.6$)	104.4
2''	3.53-3.47 (*)	75.7
3''	3.53-3.47 (*)	78.1
4''	3.45 (1H, t , $J = 9.0$)	71.2
5''	3.24 (1H, m)	78.4
6''a	3.73 (1H, dd , $J=12.0/2.2$)	62.6
6''b	3.63-3.54 (*)	

*Οι πολλαπλότητες και οι συζεύξεις δεν διακρίνονται λόγω αλληλοεπικάλυψης των σημάτων

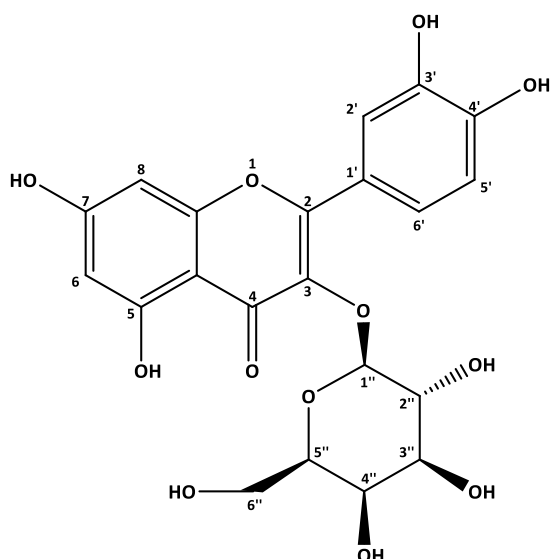
Η **ισοκερκετίνη** έχει εντοπισθεί στα μήλα, τα κρεμμύδια και πολλά άλλα φρούτα και λαχανικά. Ακόμα, έχει απομονωθεί από το είδος *C. ladanifer* (Tomás-Lorente et al., 1992). Τα οφέλη για την υγεία που αποδίδονται στην **ισοκερκετίνη** έχουν συσχετιστεί με τη βελτίωση της φυσιολογικής κατάστασης των αιμοφόρων αγγείων, αλλά και την επίδρασή της στην παραγωγή ισταμίνης (Auger et al., 2015; Wolffram et al., 2018).

13.3.7 Μεταβολίτης **cm7**

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **cm7** εμφανίζονται παρόμοια με αυτά του μεταβολίτη **cm6**. Οι διαφορές στα φάσματα των δύο ενώσεων εντοπίζονται κυρίως (α) στη χημική μετατόπιση του πρωτονίου H-2', το οποίο στην περίπτωση του μεταβολίτη **cm7** συντονίζεται σε δ 7.87 αντί για 7.73, (β) στη χημική μετατόπιση του πρωτονίου H-2'' του σακχάρου, το οποίο στην περίπτωση της γαλακτόσης εμφανίζεται πιο αποθωρακισμένο, και (γ) στη μορφή των πρωτονίων H-3'', H-4'' και H-5'' λόγω του αξονικού προσανατολισμού του υδροξυλίου στη θέση C-4''.

Η απόλυτη ταύτιση των υπολοίπων σημάτων του μεταβολίτη **cm7** με τα αντίστοιχα σήματα του μεταβολίτη **cm6** οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για την ουσία **υπεροσίδης**. Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Guvenalp and Demirezer, 2005).

υπεροσίδης



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
2	-	158.7
3	-	135.2
4	-	178.9
5	-	163.0
6	6.22 (1H, d, J=2.1)	101.3
7	-	167.2
8	6.43 (1H, d, J=2.1)	95.7
9	-	158.5
10	-	105.0
1'	-	122.2
2'	7.87 (1H, d, J = 2.0)	116.0
3'	-	146.2
4'	-	148.5
5'	6.89 (1H, d, J = 8.4)	117.6
6'	7.61 (1H, dd, J = 7.5 / 2.0)	122.9
1''	5.20 (1H, d, J = 7.6)	105.8
2''	3.84 (1H, dd, J = 9.0 / 7.6)	73.2
3''	3.63-3.54 (*)	75.2
4''	3.87 (1H, d, J = 3.5)	70.0
5''	3.63-3.54 (*)	77.1
6''a	3.63-3.54 (*)	
6''b	3.58 (1H, dd, J = 11.5 / 6.2)	61.9

*Οι πολλαπλότητες και οι συζεύξεις δεν διακρίνονται λόγω αλληλοεπικάλυψης των σημάτων

Ο υπεροσίδης αποτελεί τον 3-Ο-γαλακτοσίδη της κερκετίνης. Έχει εντοπιστεί στο παρελθόν στο γένος *Cistus* και πιο συγκεκριμένα στα είδη *C. parviflorus*, *C. salviifolius*, *C. laurifolius* και *C. creticus* L. (Gürbüz et al., 2018). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία παρουσιάζει αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση (Li et al., 2005).

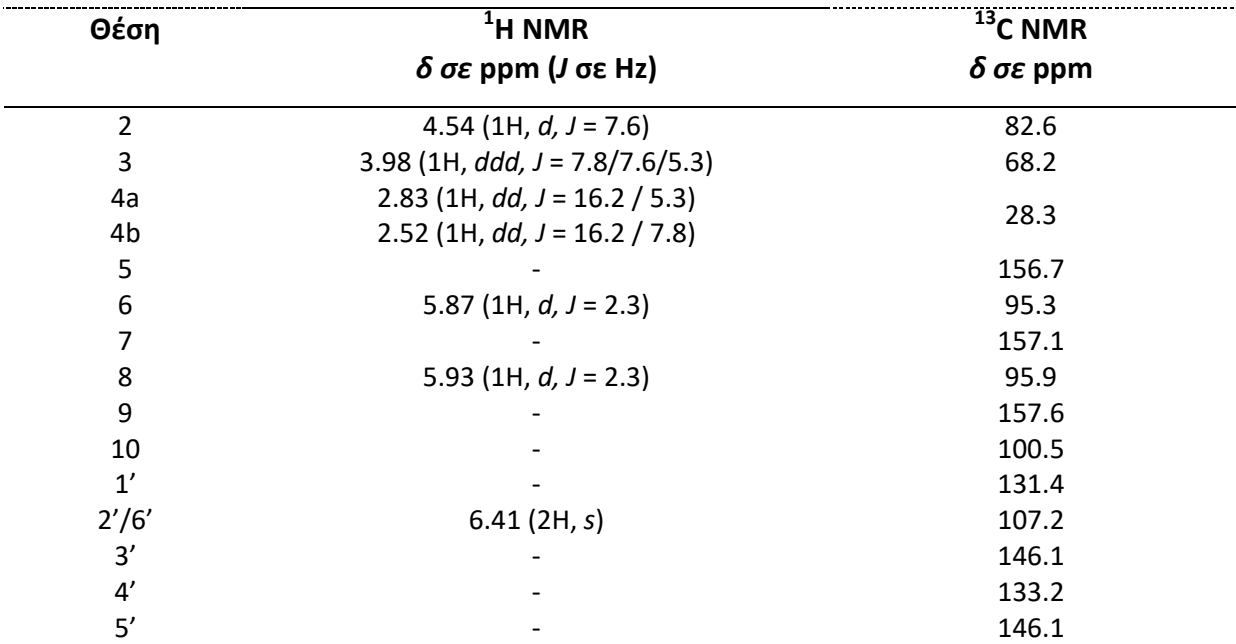
13.3.8 Μεταβολίτης **cm8**

Ο μεταβολίτης **cm8** παραλήφθηκε με τη μορφή σκούρας κόκκινης σκόνης κατά την επεξεργασία του κλάσματος A15 του CPC του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* σε στήλη Sephadex LH-20. Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται κόκκινη. Η μελέτη με φασματοσκοπία ^1H -NMR έδειξε ότι πρόκειται για την ουσία **γαλλοκατεχίνη**.

Στο φάσμα ^1H -NMR φαίνεται η ύπαρξη μίας φλαβανόλης καθώς σε δ 4.52 παρατηρείται μια διπλή κορυφή με σύζευξη 7.5 Hz και σε δ 3.96 παρατηρείται η ύπαρξη ενός πρωτονίου με τη μορφή μιας διπλής διπλώς διπλής κορυφής ($J=7.8/7.5/5.3$ Hz), υποδηλώνοντας την απουσία διπλού δεσμού στο δακτύλιο C. Τα προαναφερόμενα σήματα αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-2 και H-3. Επίσης, παρατηρούνται δύο διπλές διπλών κορυφές σε δ 2.83 ($J=16.1/5.3$ Hz) και 2.52 ($J=16.1/7.8$ Hz) που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης C-4.

Επίσης, στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^1H -NMR εμφανίζονται τα σήματα των πρωτονίων H-6 και H-8 σε δ 5.87 και 5.93 αντίστοιχα, ως δύο διπλές κορυφές μεσταθερά σύζευξης 2.3 Hz, όπως επίσης και τα ισοδύναμα πρωτόνια H-2' και H-6' σε δ 6.41 ως μία απλή κορυφή που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια.

Η δομή της γαλλοκατεχίνης επιβεβαιώθηκε και μετα δεδομένα της βιβλιογραφίας, καθώς στην περίπτωση της επιγαλλοκατεχίνης το πρωτόνιο της θέσεως H-2 εμφανίζεται ως απλή κορυφή, ενώ οι σταθερές σύζευξης μεταξύ του πρωτονίου H-3 και των πρωτονίων της θέσης C-4 είναι 4.6 και 3.4 Hz. Οι προαναφερόμενες διαφορές οφείλονται στο γεγονός ότι στην επιγαλλοκατεχίνη οι υποκαταστάτες στις θέσεις C-2 και C-3 έχουν τον ίδιο προσανατολισμό, ενώ στην περίπτωση της γαλλοκατεχίνης έχουν αντίθετο. Μάλιστα οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων των αρωματικών πρωτονίων των δακτυλίων A και B ταιριάζουν περισσότερο με τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τη (+)-γαλλοκατεχίνη, της οποίας η δομή εικονίζεται ακολούθως, αλλά απαιτείται η λήψη στροφικής ικανότητας στην καθαρή μορφή της ένωσης για να εξαχθούν αξιόπιστα συμπεράσματα.



148

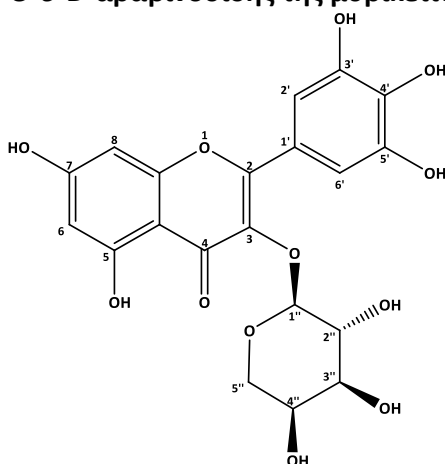
13.3.9 Μεταβολίτης **cm9**

Ο μεταβολίτης **cm9** παραλήφθηκε με τη μορφή κίτρινης σκόνης κατά την επεξεργασία του κλάσματος A15 του CPC του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* σε στήλη Sephadex LH-20. Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται κίτρινη. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι πρόκειται για την ουσία **3-O-β-D-αραβινοσίδη της μυρικετίνης**.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ φαίνεται η ύπαρξη μίας φλαβονόλης, καθώς και ενός σακχάρου. Η περαιτέρω μελέτη του φάσματος COSY, έδειξε ότι πρόκειται για την φλαβονόλη μυρικετίνη και το σάκχαρο αραβινόση. Συγκεκριμένα τα σήματα των πρωτονίων H-2' και H-6' του δακτυλίου B εμφανίζονται με τη μορφή μιας ευρείας απλής κορυφής που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια σε δ 7.33. Σε υψηλότερα πεδία εμφανίζονται τα H-6 και H-8 της φλαβονόλης με τη μορφή διπλών κορυφών με *meta*- σύζευξη 2.1 Hz σε δ 6.22 και 6.41, αντίστοιχα.

Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρούνται τα χαρακτηριστικά σήματα της αραβινόσης. Πιο συγκεκριμένα το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται με τη μορφή διπλής κορυφής σε δ 5.17 (*d*, $J = 6.7$). Τα υπόλοιπα πρωτόνια του σακχάρου συντονίζονται στην περιοχή 3.90-3.45 ppm.

3-O-β-D-αραβινοσίδης της μυρικετίνης



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
2	-	157.5
3	-	137.5
4	-	179.4
5	-	163.0
6	6.22 (1H, d, J=2.1)	99.7
7	-	166.0
8	6.41 (1H, d, J=2.1)	94.4
9	-	158.4
10	-	105.7
1'	-	120.5
2'	7.33 (2H, brs)	109.6
6'	-	146.5
3'	-	138.2
4'	-	146.5
5'	-	104.5
1''	5.17 (1H, d, J = 6.7)	72.2
2''	3.92 (1H, dd, J = 8.5 / 6.7)	73.4
3''	3.67 (1H, dd, J = 8.5 / 3.4)	68.4
4''	3.85 (1H, m)	66.4
5''a	3.87 (1H, dd, J = 11.2 / 3.4)	
5''b	3.50 (1H, d, J = 11.2)	

Ο αραβινοσίδης της μυρικετίνης αποτελεί μία φλαβονόλη που συναντάται κυρίως στα *Cranberry* (Wang et al., 2016) αλλά και σε ψυχανθή φυτά όπως τη *Mimosa diplotricha* (Bahtiar and Han, 2017), τα οποία έχουν παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί για την προστασία του ουροποιητικού συστήματος από λοιμώξεις, αλλά και σε περιπτώσεις αιματηρής διάρροιας. Η ουσία αυτή εντοπίζεται για πρώτη φορά στο γένος *Cistus*.

13.3.10 Μεταβολίτης cm10

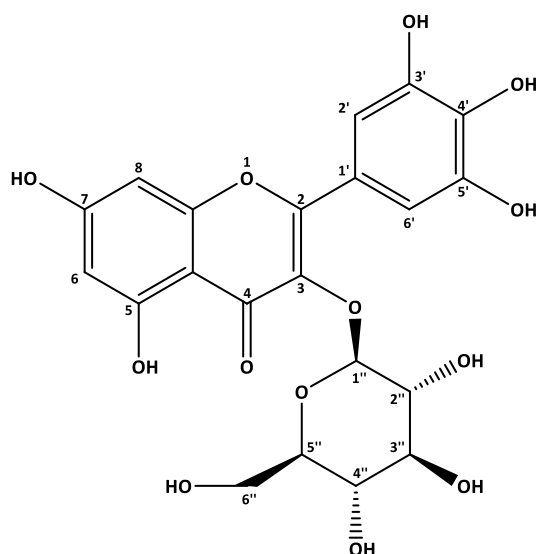
Ο μεταβολίτης **cm10** παραλήφθηκε σε μίγμα με το μεταβολίτη **cm11** με τη μορφή κίτρινης σκόνης κατά την επεξεργασία του κλάσματος A17A18, το οποίο προήλθε από το CPC του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* σε στήλη Sephadex LH-20. Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια μεγάλη κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται κίτρινη. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι πρόκειται για την ουσία **3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδη της μυρικετίνης**.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ φαίνεται η ύπαρξη μίας φλαβονόλης, καθώς και ενός σακχάρου. Η περαιτέρω μελέτη των φασμάτων COSY, HSQC και HMBC έδειξε ότι πρόκειται για την φλαβονόλη μυρικετίνη και το σάκχαρο β-γλυκοκυρανόση. Συγκεκριμένα, τα σήματα των πρωτονίων H-2' και H-6' του δακτυλίου B εμφανίζονται με τη μορφή μιας απλής κρυφής που ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια σε δ 7.29 (H-2', H-6', s). Σε υψηλότερα πεδία εμφανίζονται τα H-6 και H-8 της φλαβονόλης με τη μορφή διπλών κορυφών με *meta*-σύζευξη σε δ 6.21 και 6.40, αντίστοιχα.

Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρούνται τα χαρακτηριστικά σήματα της γλυκοκυρανόσης. Πιο συγκεκριμένα το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται με τη μορφή διπλής κορυφής σε δ 5.25 (d, $J = 7.8$ Hz), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 104.4 ppm, το οποίο δηλώνει O-γλυκοσυλίωση. Τα υπόλοιπα πρωτόνια του σακχάρου συντονίζονται στην περιοχή 3.72-3.23 ppm. Στο φάσμα HMBC παρατηρείται η χαρακτηριστική σύζευξη 3J του C-3 της μυρικετίνης με το ανωμερικό πρωτόνιο H-1'' που επιβεβαιώνει την σύνδεση της γλυκόσης στη θέση 3 της ένωσης.

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Kazuma et al., 2003).

3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης της μυρικετίνης



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
2	-	158.9
3	-	135.7
4	-	179.4
5	-	163.0
6	6.23 (1H, d, J=2.0)	99.8
7	-	165.9
8	6.41 (1H, d, J=2.0)	94.6
9	-	158.4
10	-	105.7
1'	-	121.9
2'	7.29 (2H, s)	110.0
6'		
3'	-	146.4
4'	-	138.0
5'	-	146.4
1''	5.27 (1H, d, J=7.8)	104.4
2''	3.53 (1H, dd, J=7.8 / 9.0)	75.7
3''	3.46 (1H, t, J = 9.0)	78.4
4''	3.40 (1H, t, J = 9.0)	71.1
5''	3.25 (1H, m)	78.2
6''a	3.75 (1H, dd, J=12.0/2.4)	62.4
6''b	3.64 (1H, dd, J=12.0/5.4)	

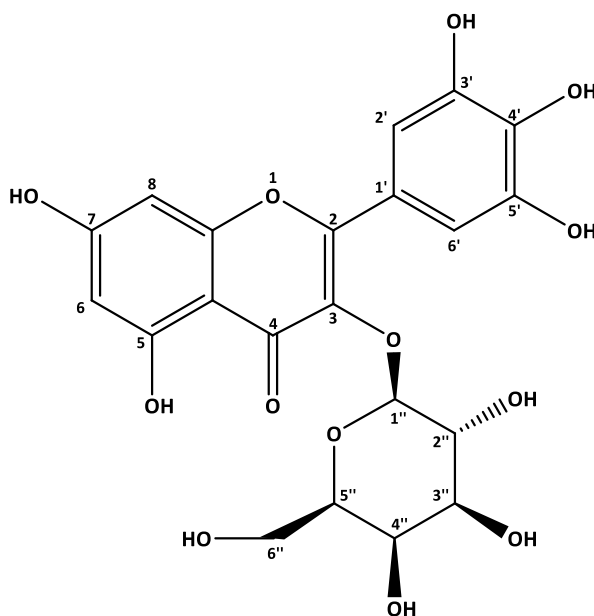
Ο 3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδης της μυρικετίνης περιέχεται στο πράσινο τσάι (Scharbert et al., 2004), στα λεμόνια (Gadetskaya et al., 2017) ενώ έχει απομονωθεί στο παρελθόν από το είδος *Cistus ladanifer* (Tomás-Lorente et al., 1992). Παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση (Darwish et al., 2016).

13.3.11 Μεταβολίτης cm11

Ο μεταβολίτης **cm11** απομονώθηκε σε μείγμα με τον μεταβολίτη **cm10**. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **cm11** εμφανίζονται παρόμοια με αυτά του μεταβολίτη **cm10**. Οι διαφορές στα φάσματα των δύο ενώσεων εντοπίζονται (α) στις χημικές μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων H-2' και H-6', τα οποία στην περίπτωση του μεταβολίτη **cm11** εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή σε δ 7.40 αντί για 7.32 στην περίπτωση του μεταβολίτη **cm10**, (β) στις μετατοπίσεις των πρωτονίων του σακχάρου και ιδίως των πρωτονίων H-4'' και H-2'', τα οποία στην περίπτωση του μεταβολίτη **cm11** είναι εμφανώς πιο αποθωρακισμένα και (γ) στη μορφή των πρωτονίων H-3'' (*dd*), H-4'' (*brd*) και H-5'' (*m*) η οποία φανερώνει την παρουσία γαλακτόσης στην ένωση.

Η ταύτιση των υπολοίπων σημάτων του μεταβολίτη **cm11** με τα αντίστοιχα σήματα του μεταβολίτη **cm10** οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για την ουσία **3-O-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης της μυρικετίνης**. Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Scharbert et al., 2004).

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



Θέση	^1H NMR δ σε ppm (<i>J</i> σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm
2	-	157.8
3	-	136.4
4	-	179.3

5	-	162.2
6	6.23 (1H, d, J=2.0)	99.2
7	-	165.4
8	6.42 (1H, d, J=2.0)	94.1
9	-	157.2
10	-	104.8
1'	-	120.9
2'	7.40 (1H, s)	109.6
6'	-	137.2
3'	-	145.4
4'	-	137.2
5'	-	104.5
1''	5.22 (1H, d, J = 7.8)	66.5
2''	3.85 (1H, dd, J = 9.7/7.8)	69.2
3''	3.59 (1H, dd, J = 9.7/3.5)	76.2
4''	3.89 (1H, ~t, J = 3.5)	74.3
5''	3.51 (1H, m)	60.9
6''a	3.68 (1H, dd, J = 11.3 / 6.1)	
6''b	3.60 (1H, dd, J = 11.3 / 6.5)	

Ο **3-O-β-D-γαλακτοπυρανοοσίδης της μυρικετίνης** βρίσκεται στο κόκκινο κρασί (Castillo-Munoz et al., 2009), στο τσάι (Scharbert et al., 2004) και παρουσιάζει αντιβακτηριακή δράση (Tuvshintulga et al., 2017). Ακόμα, πρόσφατες μελέτες απέδειξαν την ανταγωνιστική δράση της ουσίας αυτής έναντι του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης I (ACE) (Jenis et al., 2017) και πώς περιορίζει την αίσθηση του πόνου (A. de O. Azevedo et al., 2015).

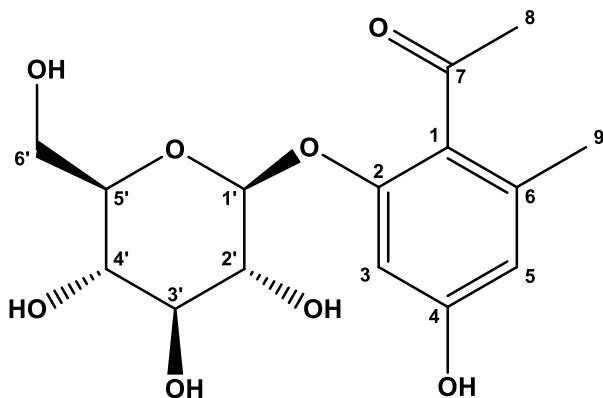
13.3.12 Μεταβολίτης **cm12**

Ο μεταβολίτης **cm12** παραλήφθηκε με τη μορφή σκούρας πορτοκαλί σκόνης κατά την επεξεργασία του κλάσματος A19 του CPC του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* σε στήλη Sephadex LH-20. Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια μεγάλη κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση εμφανίζει κεραμιδί χρώση. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **cm12** είναι η **2-O-γλυκοπυρανοσυλο-2,4-διυδροξυ-6-μεθυλοακετοφαινόνη**.

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος πρωτονίου παρατηρούνται δυο διπλές κορυφές σε δ 6.55 και δ 6.34 με σύζευξη μεταξύ τους 2.2 Hz που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-3 και H-5. Επιπροσθέτως, στην οξυγονομένη περιοχή του φάσματος παρατηρούμε την ύπαρξη των σημάτων ενός σακχάρου και συγκεκριμένα μιας β-D-γλυκόσης. Το ανωμερικό πρωτόνιο του

σακχάρου συντονίζεται σε δ 4.93 με σταθερά σύζευξης 7.5 Hz, ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας εμφανίζεται σε δ 102.8. Η θέση πρόσδεσης του σακχάρου στον αρωματικό δακτύλιο καθορίστηκε από το φάσμα HMBC καθώς το ανωμερικό πρωτόνιο παρουσιάζει σύζευξη με τον C-2 στα 158.6 ppm, ενώ ο προαναφερόμενος άνθρακας παρουσιάζει σύζευξη και με το πρωτόνιο H-3. Τέλος, στην αλειφατική περιοχή του φάσματος υπάρχει η παρουσία δυο απλών κορυφών σε δ 2.54 και δ 2.19 που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η κάθε μια και αντιστοιχούν στα μεθυλικά πρωτόνια των θέσεων C-8 και C-9. Η θέση πρόσδεσης των μεθυλίων στον αρωματικό δακτύλιο καθορίστηκε από το φάσμα HMBC. Τα πρωτόνια της θέσης C-9 σε δ 2.19 παρουσιάζουν σύζευξη με τον C-6 στα 140.1 ppm όπως και το πρωτόνιο H-5, ενώ τα πρωτόνια της θέσης C-8 σε δ 2.52 παρουσιάζουν σύζευξη 2J με την κετονομάδα στη θέση C-7 στα 208.4 ppm και επίσης σύζευξη 3J με τον άνθρακα της θέσης C-1 (δ 124.9). Οι υπόλοιπες χημικές μετατοπίσεις και συζεύξεις παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα.

2-Ο-γλυκοπυρανοσυλο-2,4-διυδροξυ-6-μεθυλοακετοφαινόνη



Θέση	^1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm
1	-	124.9
2	-	158.6
3	6.54 (1H, d , $J = 2.2$)	101.9
4	-	161.3
5	6.36 (1H, d , $J = 2.2$)	113.1
6	-	139.6
7	-	208.4
8-CH ₃	2.54 (3H, s)	33.4
9-CH ₃	2.19 (3H, s)	20.4
1'	4.92 (1H, d , $J = 7.5$)	102.8
2'	3.44-3.41 (*)	74.7
3'	3.44-3.41 (*)	77.9

4'	3.44-3.41 (*)	71.1
5'	3.44-3.41 (*)	78.1
6'a	3.72 (1H, <i>dd</i> , 12.4 / 5.3)	
6'b	3.91 (1H, <i>dd</i> , 12.4 / 2.2)	62.9

*Οι πολλαπλότητες και οι συζεύξεις δεν διακρίνονται λόγω αλληλοεπικάλυψης των σημάτων

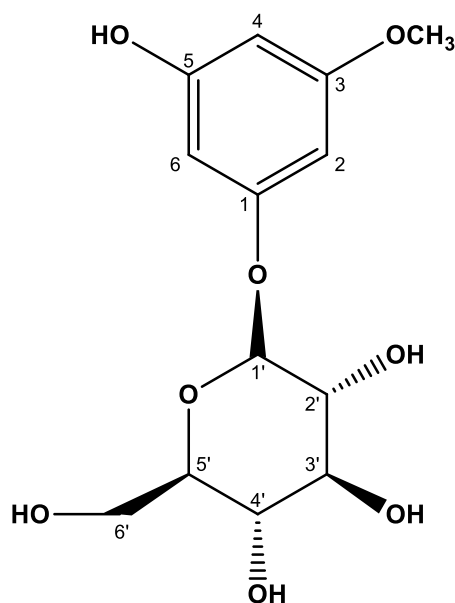
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αναζήτησης στη βάση δεδομένων 'REAXYS' η προαναφερόμενη ένωση αποτελεί ένα **νέο φυσικό προϊόν**

13.3.13 Μεταβολίτης **cm13**

Ο μεταβολίτης **cm13** παραλήφθηκε με τη μορφή κίτρινης σκόνης κατά την επεξεργασία του κλάσματος A19 του CPC του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* σε στήλη Sephadex LH-20. Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται σκούρο πορτοκαλί. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **cm13** πρόκειται για τον **1-Ο-γλυκοκυρανοσυλο-3-Ο-μεθυλοφλορογλουκινόλη**.

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος ¹H-NMR παρατηρούνται τρεις τριπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης 2.2 Hz, οι οποίες ανήκουν στα πρωτόνια H-2 (δ 6.22), H-4 (δ 6.07) και H-6 (δ 6.19). Το γεγονός ότι τα τρία προαναφερόμενα πρωτόνια του σκελετού της φλορογλουκινόλης είναι μη ισοδύναμα μεταξύ τους συνάδει με την διαφορετική υποκατάσταση των τριών υδροξυλομάδων. Η παρουσία του μεθοξυλίου είναι εμφανής από την απλή κορυφή σε δ 3.74, η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια, ενώ χαρακτηριστικά είναι τα σήματα του ανωμερικού (δ 4.85, d, J = 7.7 Hz) και των μεθυλενικών πρωτονίων H-6a' (δ 3.91, *dd*, J = 12.1 / 2.0 Hz) και H-6b' (δ 3.72, *dd*, J = 12.1 / 5.8 Hz) της γλυκόσης.

1-Ο-γλυκοκυρανοσυλο-3-Ο-μεθυλοφλορογλουκινόλη



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
1	-	160.9
2	6.22 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 2.2 Hz)	96.8
3	-	162.9
CH ₃ O-3	3.74 (3H, <i>s</i>)	55.7
4	6.07 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 2.2 Hz)	95.6
5	-	160.1
6	6.19 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 2.2 Hz)	97.8
1'	4.85 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.7 Hz)	102.8
2'	3.50-3.36*	74.9
3'	3.50-3.36*	78.0
4'	3.50-3.36*	71.4
5'	3.50-3.36*	78.3
6a'	3.91 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12.1 / 2.0 Hz)	62.6
6b'	3.72 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 12.1 / 5.8 Hz)	

Η **1-Ο-γλυκοκυρανοσυλο-3-Ο-μεθυλοφλορογλουκινόλη** έχει απομονωθεί από το είδος *Sedum sediforme* (Sakar et al., 1993) και το είδος *Cistus salvifolius* (Danne et al., 1994).

13.3.14 Μεταβολίτης **cm14**

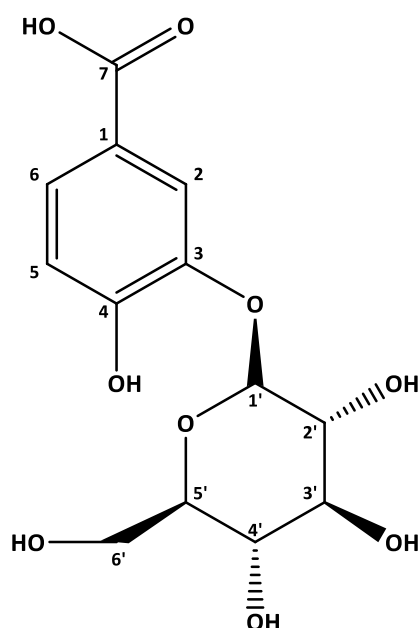
Ο μεταβολίτης **cm14** παραλήφθηκε με τη μορφή υποκίτρινης σκόνης κατά την επεξεργασία του κλάσματος A19 του CPC του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* σε στήλη Sephadex LH-20. Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται κίτρινη. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι πρόκειται για τον **3-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδη του πρωτοκατεχικού οξέος**.

Συγκεκριμένα, τα σήματα των πρωτονίων H-2 και H-5 εμφανίζονται με τη μορφή διπλών κορυφών που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία σε δ 7.56 (H-2, *d*, $J = 2.5$ Hz) και 6.82 (H-5, *d*, $J = 8.6$ Hz), ενώ το σήμα του πρωτονίου H-6 εμφανίζεται ως διπλώς διπλή κορυφή στα 7.18 ppm (H-6, *dd*, $J = 8.6 / 2.5$ Hz) χαρακτηριστικό της ύπαρξης *ortho*- και *meta*- σύζευξης με τα πρωτόνια H-5 και H-2 αντίστοιχα.

Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρούνται τα χαρακτηριστικά σήματα της γλυκοκυρανόσης. Πιο συγκεκριμένα το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται σε δ 4.47 (H-1', *d*, $J = 7.4$), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 102.9 ppm, το οποίο δηλώνει *O*-γλυκοσυλίωση. Τα υπόλοιπα πρωτόνια του σακχάρου συντονίζονται στην περιοχή 4.00-3.75 ppm. Στο φάσμα HMBC παρατηρείται η χαρακτηριστική σύζευξη 3J του C-3 του πρωτοκατεχικού οξέος με το ανωμερικό πρωτόνιο H-1' που επιβεβαιώνει την σύνδεση της γλυκόσης στη θέση 3.

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Yamanaka et al., 1995).

3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης του πρωτοκατεχικού οξέος



Θέση	¹ H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	¹³ C NMR δ σε ppm
1	-	123.2
2	7.58 (1H, d, J=2.5)	119.1
3	-	145.9
4	-	152.4
5	6.83 (1H, d, J = 8.8)	116.8
6	7.18 (1H, dd, J = 8.8 / 2.5)	126.9
7-CO	-	169.4
1'	4.74 (1H, d, J = 7.4)	102.9
2'	4.00-3.65 (*)	74.1
3'	4.00-3.65 (*)	77.5
4'	4.00-3.65 (*)	70.5
5'	4.00-3.65 (*)	76.7
6'a	4.00-3.65 (*)	61.8
6'b	4.00-3.65 (*)	

*Οι πολλαπλότητες και οι συζεύξεις δεν διακρίνονται λόγω αλληλοεπικάλυψης των σημάτων

Ο 3-O-β-D-γλυκοπυρανοσίδης του πρωτοκατεχικού οξέος απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό *Lobelia sessilifolia* (Yamanaka et al., 1995), ενώ εντοπίζεται για πρώτη φορά στο γένος *Cistus*. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία παρουσιάζει ήπια αντιοξειδωτική δράση (Nassar et al., 2011).

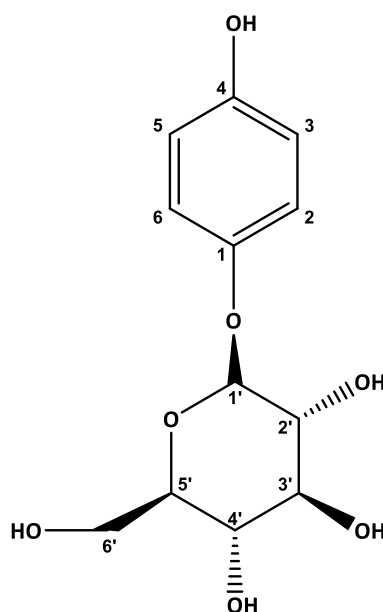
13.3.15 Μεταβολίτης **cm15**

Ο μεταβολίτης **cm15** παραλήφθηκε με τη μορφή σκούρας πορφυρής σκόνης κατά την επεξεργασία του κλάσματος A23 του CPC του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* σε στήλη Sephadex LH-20. Στο χρωματογράφημα TLC εμφανίζεται μια κηλίδα η οποία απορροφά έντονα στα 254 nm και 366 nm, ενώ μετά από ψεκασμό με διάλυμα θειικής βανιλίνης και θέρμανση χρωματίζεται κόκκινη. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι πρόκειται για την ουσία **αρβουτίνη**.

Συγκεκριμένα, τα σήματα των πρωτονίων H-3 / H-5 και H-2 / H-6 εμφανίζονται με τη μορφή διπλών κορυφών που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η κάθε μία σε δ 6.70 (*d*, *J* = 8.4 Hz) και 6.96 (*d*, *J* = 8.4 Hz), αντίστοιχα. Στην οξυγονωμένη περιοχή του φάσματος παρατηρούνται τα χαρακτηριστικά σήματα της γλυκοπυρανόσης. Πιο συγκεκριμένα το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται με τη μορφή διπλής κορυφής σε δ 4.73 (H-1', *d*, *J* = 7.5 Hz), ενώ ο αντίστοιχος άνθρακας συντονίζεται στα 103.5 ppm, το οποίο δηλώνει *O*-γλυκοσυλίωση. Επίσης, τα μεθυλενικά πρωτόνια της εξόξης εμφανίζονται ως διπλές διπλών κορυφές σε δ 3.90 (1H, *dd*, *J* = 12.0 / 1.5) και δ 3.71 (1H, *dd*, *J* = 12.0 / 4.7). Τα υπόλοιπα πρωτόνια του σακχάρου συντονίζονται στην περιοχή 3.65-3.40 ppm. Στο φάσμα HMBC παρατηρείται η χαρακτηριστική σύζευξη 3J του C-3 της υδροκινόνης με το ανωμερικό πρωτόνιο H-1' που επιβεβαιώνει την σύνδεση της γλυκόσης στη θέση 1.

Η παραπάνω δομή επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Winter et al., 2015).

αρβουτίνη



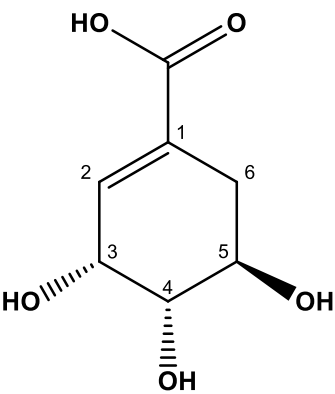
Θέση	^1H NMR δ σε ppm (J σε Hz)	^{13}C NMR δ σε ppm
1	-	152.7
2	6.96 (2H, d , $J=8.4$)	119.2
6		
3	6.70 (2H, d , $J=8.4$)	116.2
5		
4	-	154.1
1'	4.73 (1H, d , $J=7.5$)	103.5
2'	3.65-3.43 (*)	74.5
3'	3.65-3.43 (*)	78.3
4'	3.65-3.43 (*)	71.2
5'	3.37 (1H, m)	77.7
6'a	3.90 (1H, dd , $J = 12.0 / 1.5$)	72.6
6'b	3.71 (1H, dd , $J = 12.0 / 4.7$)	

Η **αρβουτίνη** αποτελεί μια γλυκοσυλιωμένη υδροκινόννη που έχει απομονωθεί και από το φυτό *Arctostaphylos uva-ursi* μεταξύ πολλών άλλων φαρμακευτικών φυτών, κυρίως της οικογένειας Ericaceae. Η **αρβουτίνη** έχει αντιμικροβιακές, στυπτικές και απολυμαντικές ιδιότητες, ενώ αν εφαρμοστεί τοπικά, αναστέλλει την τυροσινάση και επομένως εμποδίζει τον σχηματισμό της μελανίνης, γεγονός που την καθιστά έναν αποτελεσματικό παράγοντα λεύκανσης του δέρματος (Parejo et al., 2001). Η ουσία αυτή εντοπίζεται για πρώτη φορά στο γένος *Cistus*.

13.3.16 Μεταβολίτης cm16

Ο μεταβολίτης **cm16** παραλήφθηκε ως μίγμα με το μεταβολίτη **cm15** κατά την επεξεργασία του κλάσματος A23 του CPC του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus monspeliensis* με στήλη Sephadex LH-20. Η μελέτη με φασματοσκοπία NMR (1D, 2D) έδειξε ότι ο μεταβολίτης **cm16** είναι το **σικιμικό οξύ**.

Πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ εμφανίζονται αρκετά σήματα στην οξυγονωμένη περιοχή και συγκεκριμένα σε δ 4.35 (1H, *dd*, $J = 4.2 / 3.5$), 3.66 (1H, *dd*, $J = 7.6 / 4.2$) και 3.99 (1H, *ddd*, $J = 7.6 / 6.0 / 5.3$), τα οποία συντιστοιχούν στα πρωτόνια H-3, H-4 και H-5. Επίσης, το ολεφινικό πρωτόνιο H-2 εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή στα 6.74 ppm, ενώ τα μεθυλενικά πρωτόνια της θέσης C-6 συντονίζονται σε δ 2.74 (1H, *dddd*, $J = 18.0 / 5.3 / 1.6 / 1.2$) και 2.21 (1H, *dddd*, $J = 18.0 / 6.0 / 1.7 / 1.3$).

σικιμικό οξύ		
		
Θέση	$^1\text{H NMR}$ δ σε ppm (J σε Hz)	$^{13}\text{C NMR}$ δ σε ppm
1	-	130.6
2	6.74 (1H, m)	137.4
3	4.35 (1H, <i>dd</i> , $J = 4.2 / 3.5$)	67.1
4	3.66 (1H, <i>dd</i> , $J = 7.6 / 4.2$)	72.9
5	3.99 (1H, <i>ddd</i> , $J = 7.6 / 6.0 / 5.3$)	68.3
6a	2.74 (1H, <i>dddd</i> , $J = 18.0 / 5.3 / 1.6 / 1.2$)	31.7
6b	2.21 (1H, <i>dddd</i> , $J = 18.0 / 6.0 / 1.7 / 1.3$)	
7	-	170.2

Το σικιμικό οξύ είναι ένας μεταβολίτης ο οποίος έχει εντοπισθεί στο παρελθόν σε είδη του γένους *Cistus* (*C. incanus* και *C. salvifolius*) (Scognamiglio et al., 2014).

14. Συμπεράσματα - Προοπτικές

Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η φυτοχημική μελέτη του φυτού *Cistus monspeliensis*, καθώς και η συγκριτική μελέτη ως προς το χημικό φορτίο, την αντιοξειδωτική και την αντιμικροβιακή δράση, συνολικά 5 ειδών *Cistus* της ελληνικής χλωρίδας: *Cistus salviifolius*, *Cistus creticus* subsp. *creticus*, *Cistus parviflorus*, *Cistus monspeliensis* και *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*.

Η συγκριτική μελέτη ως προς το χημικό φορτίο πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC), τόσο των ολικών εκχυλισμάτων που παραλάβαμε μέσω της επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE, όσο και των μεθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων του κάθε είδους *Cistus* που προέκυψαν μετά την επεξεργασία με ρητίνη XAD-4. Ακόμα, μετά την κλασμάτωση των μεθανολικών εκχυλισμάτων των 5 ειδών *Cistus* με τη χρήση της χρωματογραφίας κατανομής με φυγοκέντρωση (FCPC), ακολούθησε συγκριτικός έλεγχος του χημικού τους προφίλ με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC).

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε συγκριτικός έλεγχος των ολικών εκχυλισμάτων *Cistus* ως προς το συνολικό τους περιεχόμενο σε φαινόλες και флаβονοειδή με τη χρήση των μεθόδων TPC και TFC, αλλά και της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας μέσω της χρήσης των ριζών DPPH και ABTS. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα είδη *Cistus monspeliensis* και *Cistus salviifolius* υπερτερούν ένταντι των υπολοίπων 3 ειδών ως προς το φορτίο τους σε φαινόλες και флаβονοειδή, με πλουσιότερο το μεθανολικό εκχύλισμα του *Cistus monspeliensis*. Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των μελετηθέντων εκχυλισμάτων, μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών παρουσίασαν, όπως ήταν αναμενόμενο, τα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα των ειδών *Cistus monspeliensis* και *Cistus salviifolius*. Λαμβάνοντας παράλληλα υπόψη τα αποτελέσματα του χρωματογραφικού ελέγχου αποφασίστηκε η περαιτέρω μελέτη του μεθανολικού εκχυλίσματος του *Cistus monspeliensis*.

Τέλος, τα ολικά εκχυλίσματα των 5 ειδών *Cistus* συγκρίθηκαν ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι 49 βακτηριακών στελεχών. Κατά τον πρώτο γύρο των δοκιμών, αυτών των αερόβιων βακτηρίων, τα εκχυλίσματα κυκλοεξανίου και οξικού αιθυλεστέρα του *Cistus monspeliensis* έδειξαν επιλεκτική δραστηριότητα έναντι των στελεχών *Bacillus cereus*, ενώ τα

ίδια εκχυλίσματα έδειξαν πολύ καλή δραστικότητα έναντι των αναερόβιων βακτηρίων, και συγκεκριμένα έναντι των ειδών *Propionibacterium* και *Streptococcus*.

Η φυτοχημική ανάλυση του φυτού *Cistus monspeliensis* οδήγησε στην απομόνωση και ταυτοποίηση 16 δευτερογενών μεταβολιτών, εκ των οποίων

- 8 εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στο γένος *Cistus* (cm2, cm3, cm4, cm5, cm9, cm12, cm14, cm15)
- 3 αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα (cm4, cm5, cm12).

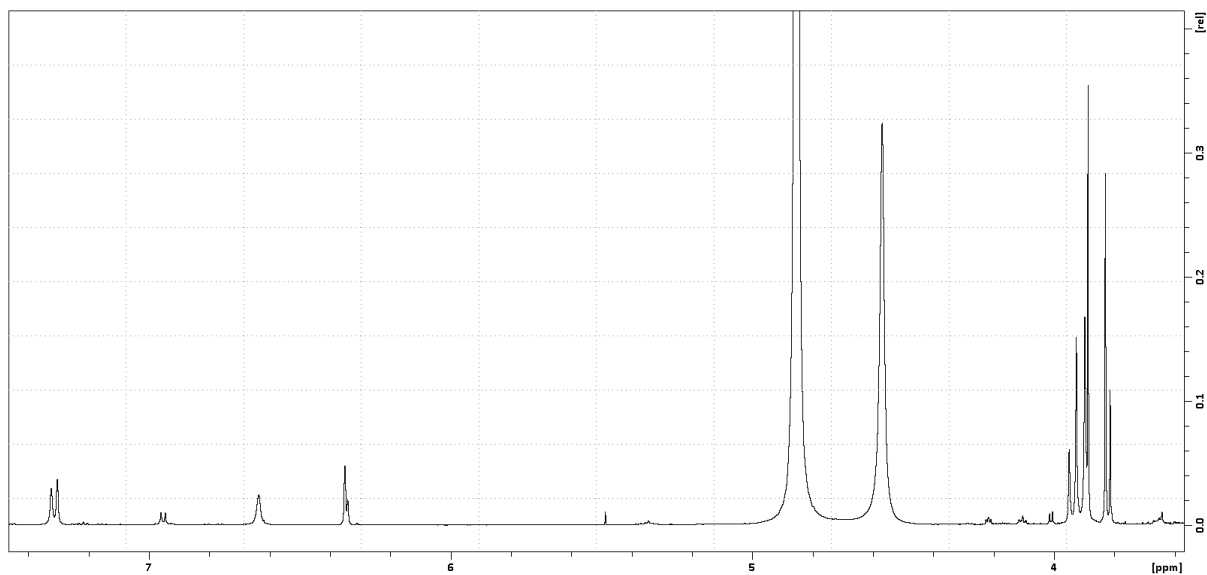
Κεντρικό ρόλο στην απομόνωση έπαιξε η χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντριση (FCPC). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για την αποτελεσματική κλασμάτωση του μεθανολικού εκχυλίσματος και σε συνδυασμό με χρωματογραφία στήλης με πληρωτικό υλικό Sephadex LH-20 και την παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (prep-TLC), συνετέλεσε στην παραλαβή των δευτερογενών μεταβολιτών. Η απόδοση της δομής των μεταβολιτών που απομονώθηκαν, πραγματοποιήθηκε με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Μελλοντικός στόχος αυτής της προσπάθειας είναι:

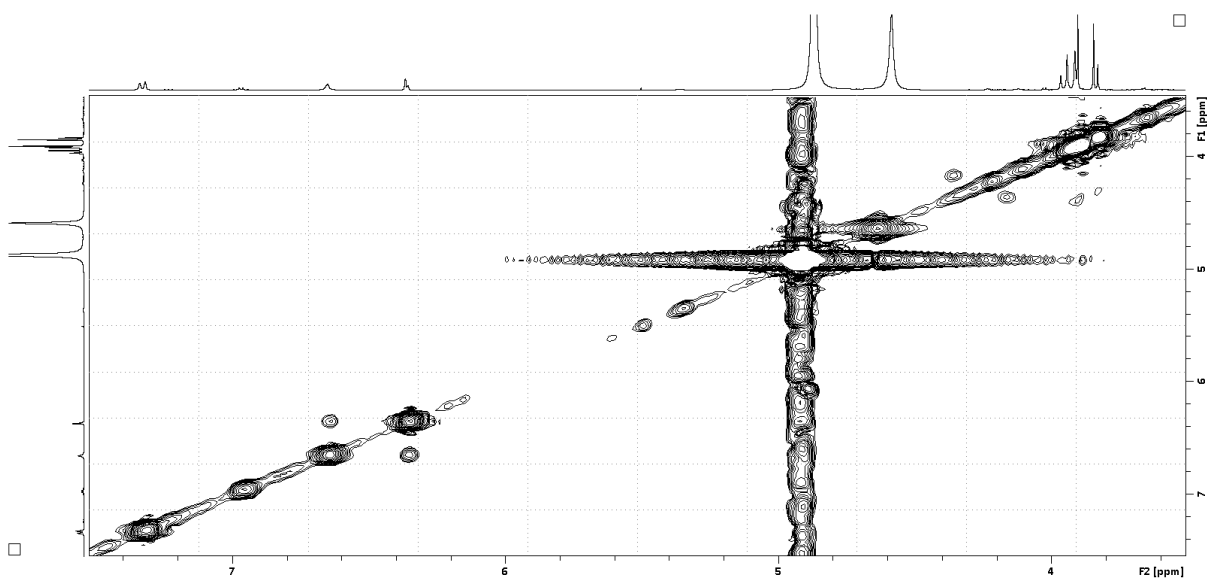
- η συλλογή και των άλλων δυο ειδών *Cistus* της ελληνικής χλωρίδας (*C. sintenisii* and *C. laurifolius*) και η εκχύλιση τους,
- η αξιολόγηση της δράσης τόσο των εκχυλισμάτων, όσο και των απομονομένων ουσιών στην αναστολή ενζύμων όπως τυροσινάση, κολλαγενάση, υαλουρονιδάση, ακετυλοχολινεστεράση και φωσφολιπάση, βιοδοκιμών που υπάρχουν στο εργαστήριο μας
- η φυτοχημική μελέτη των υπόλοιπων βιοδραστικών εκχυλισμάτων
- η συγκριτική μελέτη του μεταβολικού προφίλ ειδών *Cistus* από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας.

15. Παράρτημα

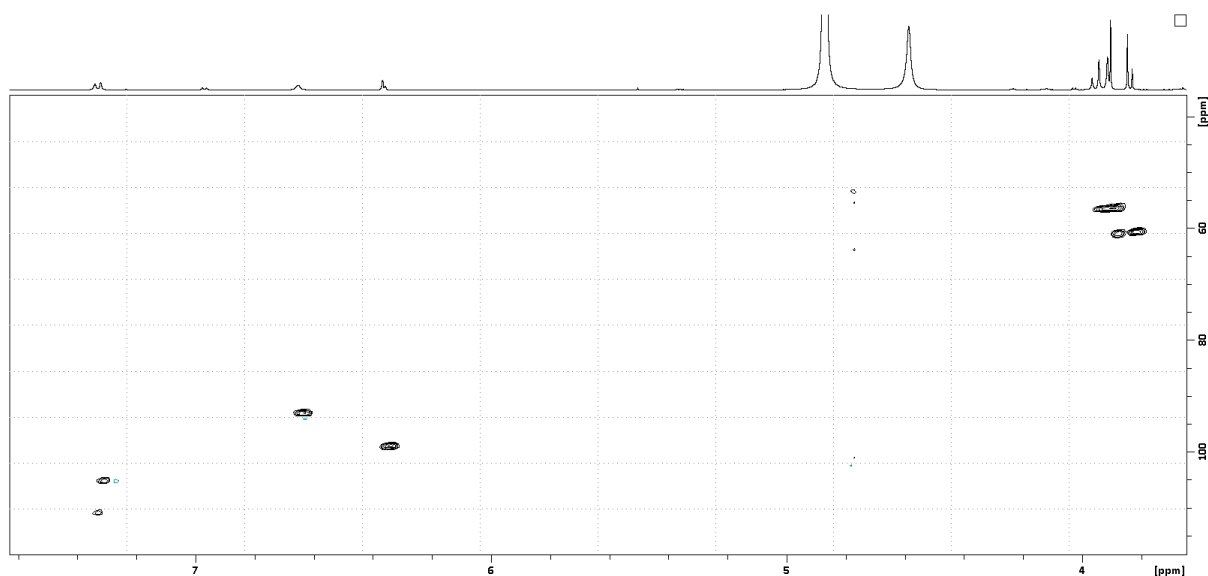
cm1/cm2



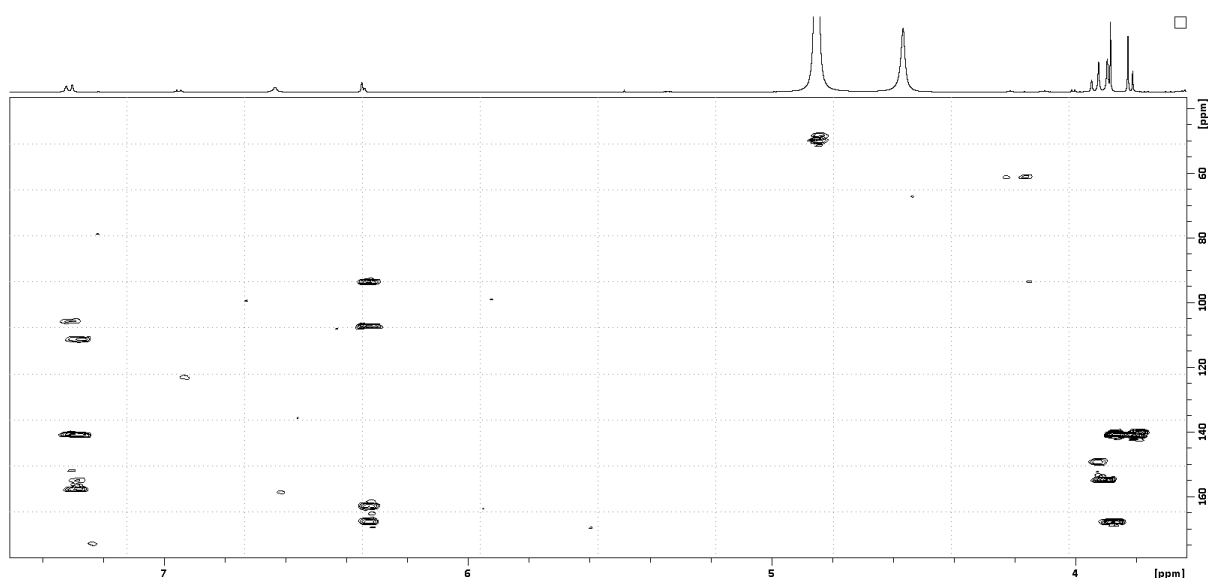
Εικόνα 65 Φάσμα ^1H -NMR στα 600 MHz Διαλύτης: MeOD Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.



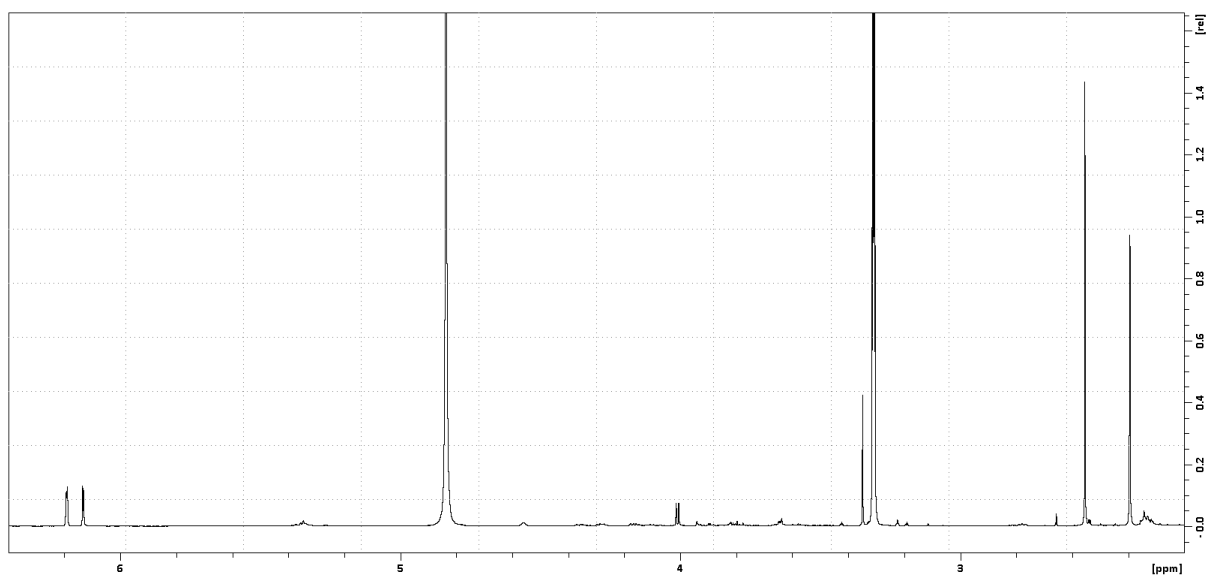
Εικόνα 66 Φάσμα COSY στα 200 MHz Διαλύτης: MeOD Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.



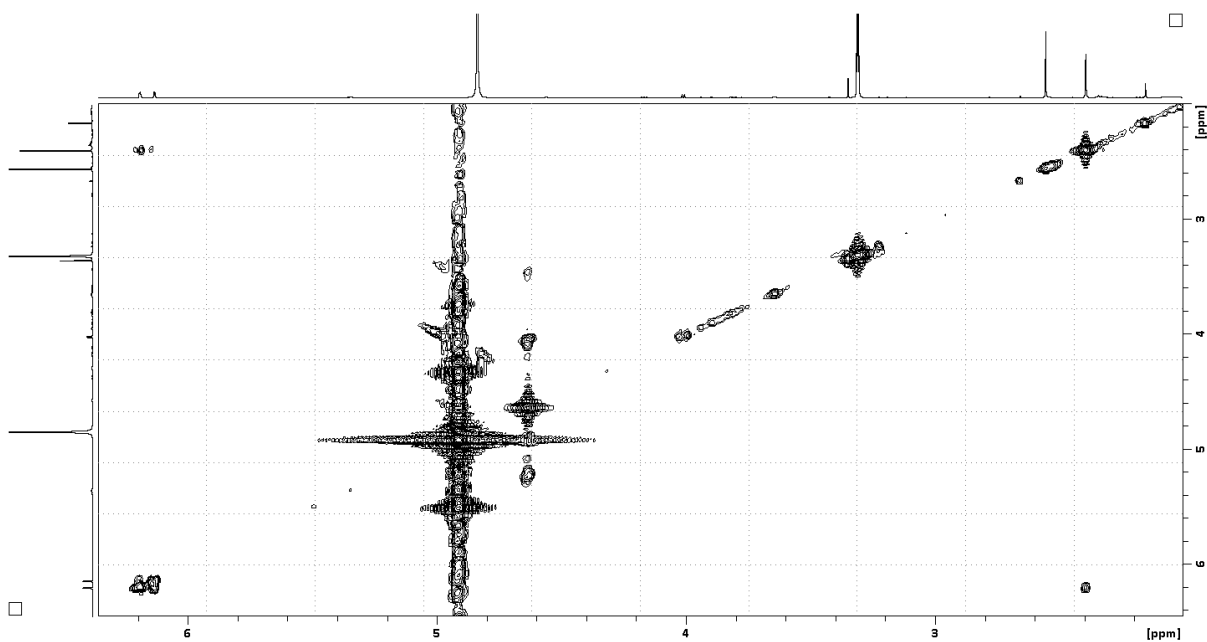
Εικόνα 67 Φάσμα HSQC στα 200 MHz Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.



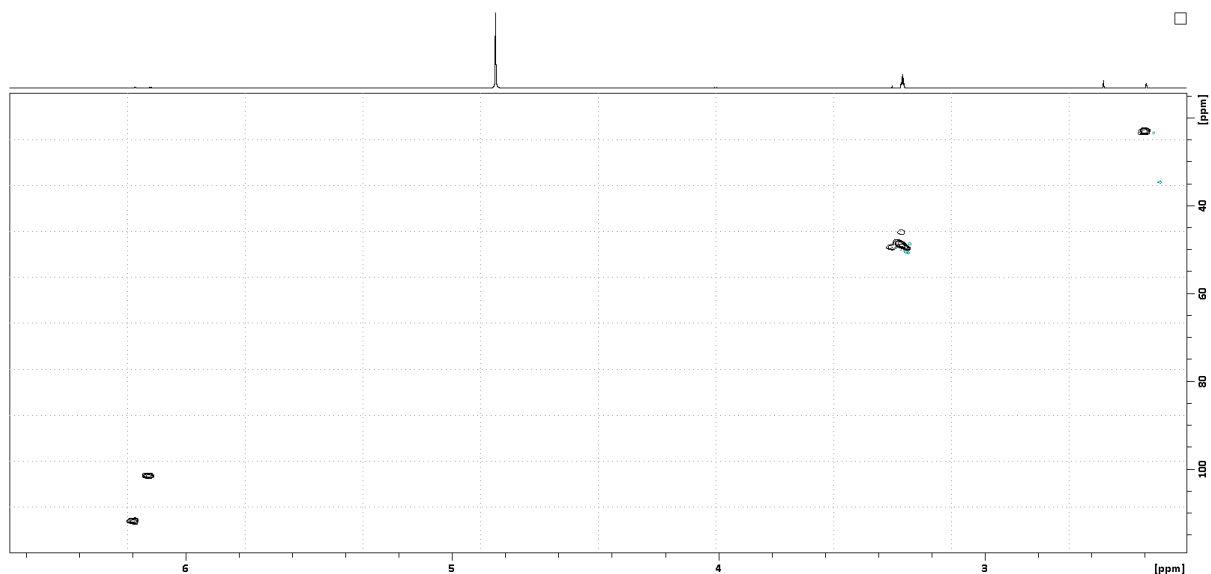
Εικόνα 68 Φάσμα HMBC στα 200 MHz Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.



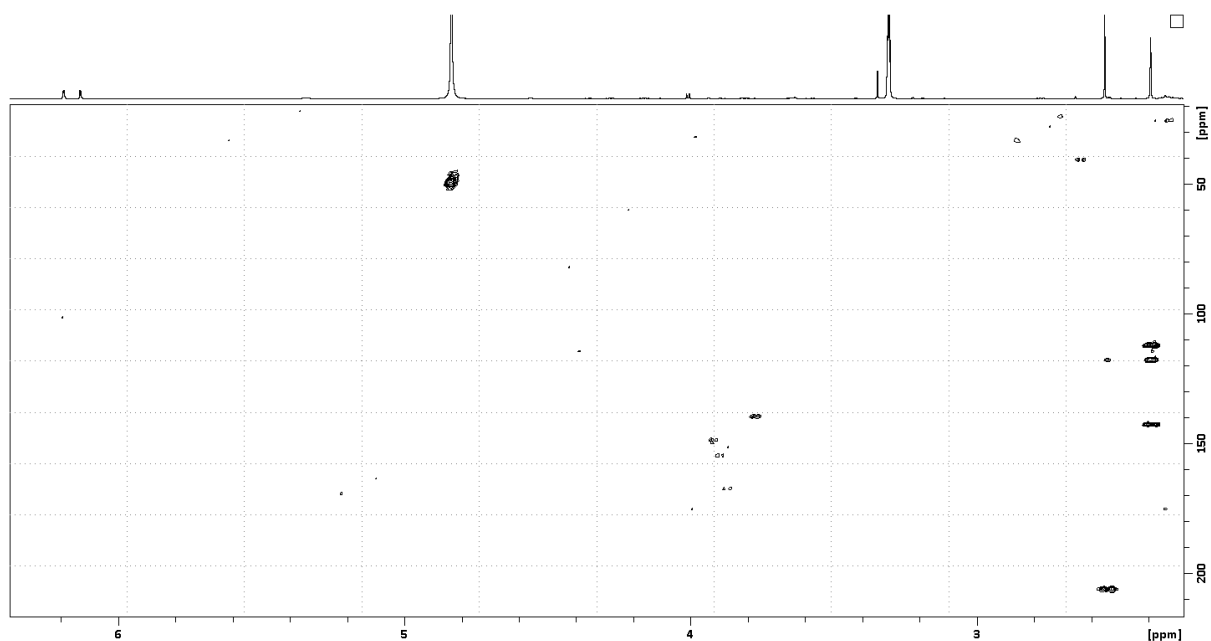
Εικόνα 69 Φάσμα ^1H -NMR στα 600 MHz Διαλύτης: MeOD Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.



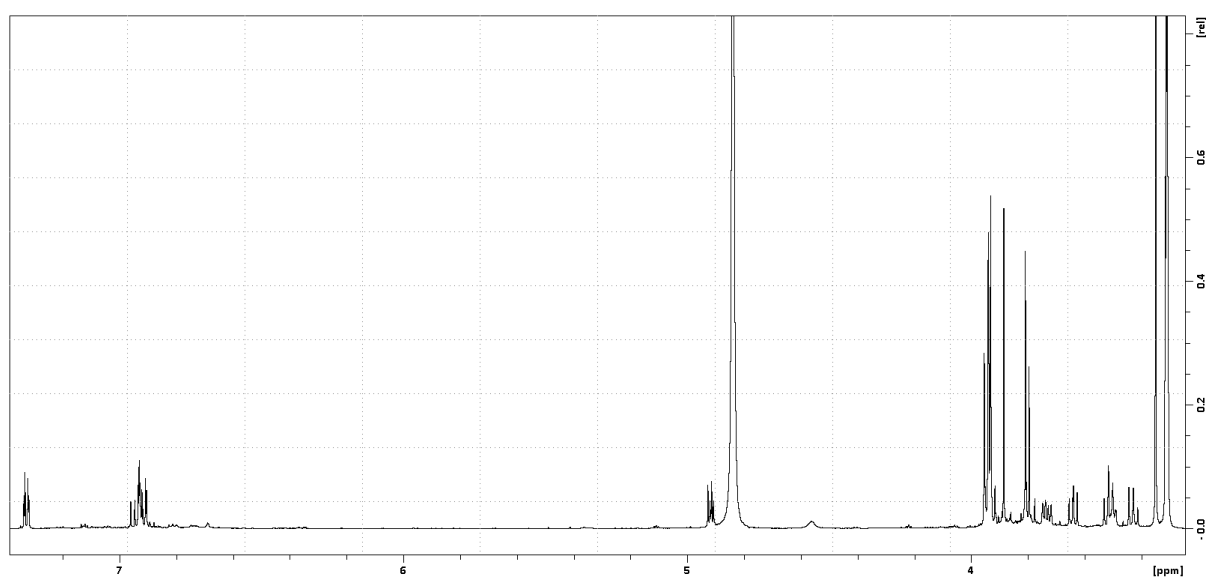
Εικόνα 70 Φάσμα COSY στα 200 MHz Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.



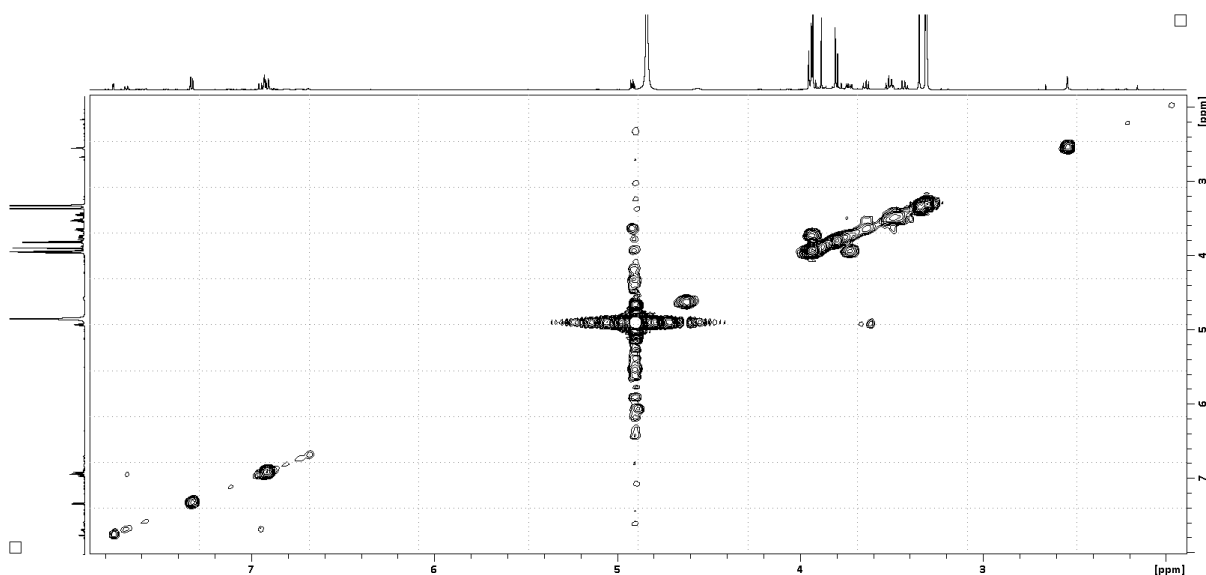
Εικόνα 71 Φάσμα HSQC στα 200 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.



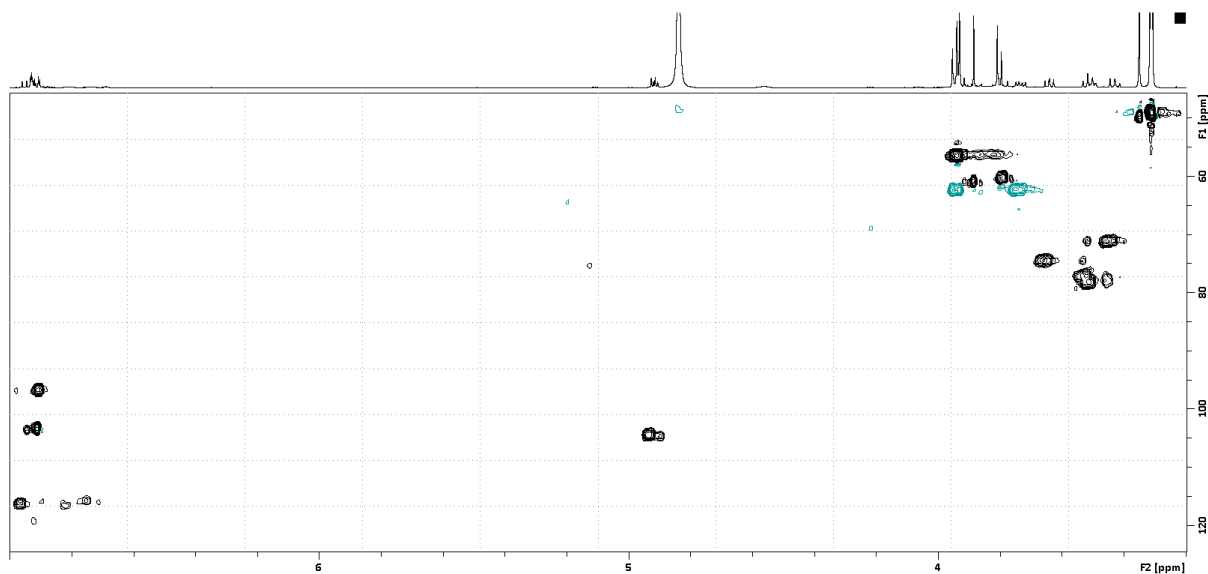
Εικόνα 72 Φάσμα HMBC στα 200 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.



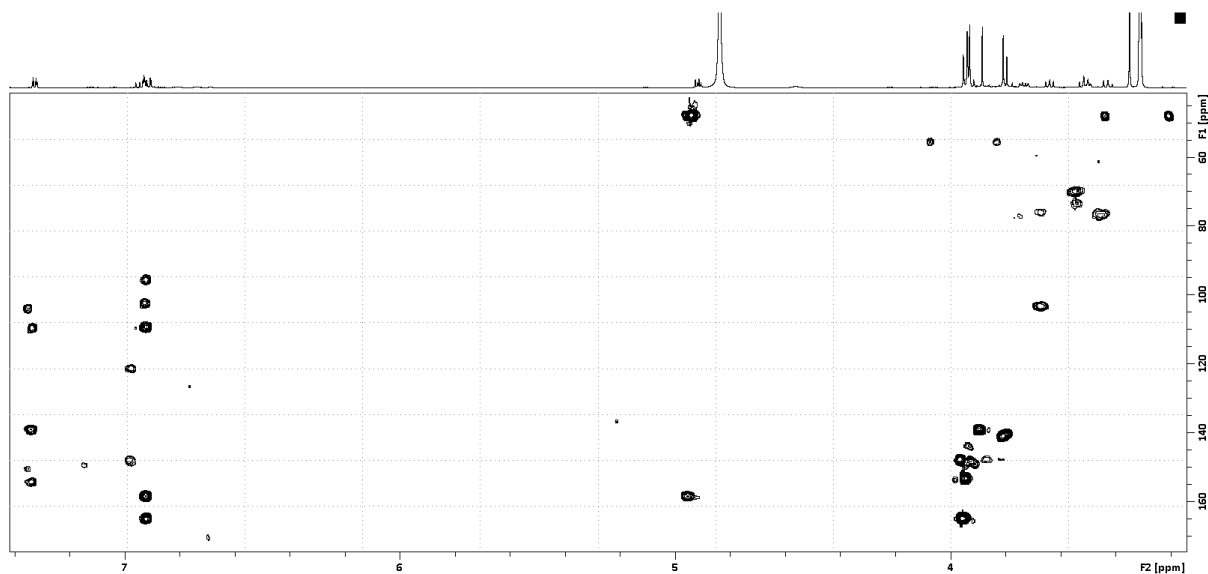
Εικόνα 73 Φάσμα ^1H -NMR στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του υπολειμματικού διαλύτη σε δ 3.31.



Εικόνα 74 Φάσμα COSY στα 600 MHz Διαλύτης: MeOD Θερμοκρασία: 300 K Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του υπολειμματικού διαλύτη σε δ 3.31

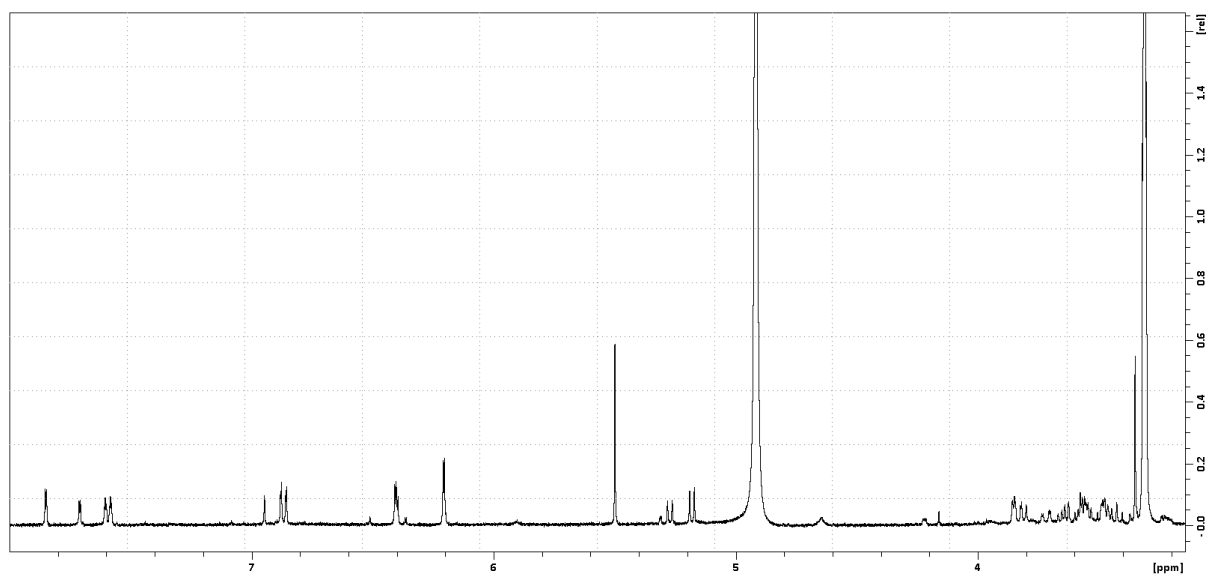


Εικόνα 75 Φάσμα HSQC στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.



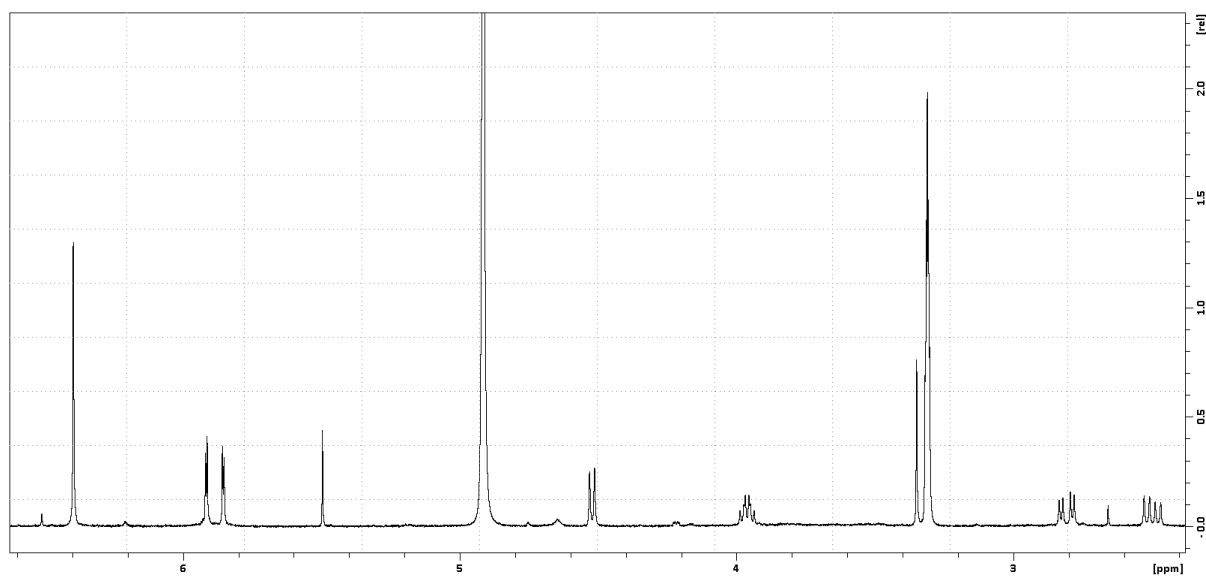
Εικόνα 76 Φάσμα HMBC στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.

cm6/cm7

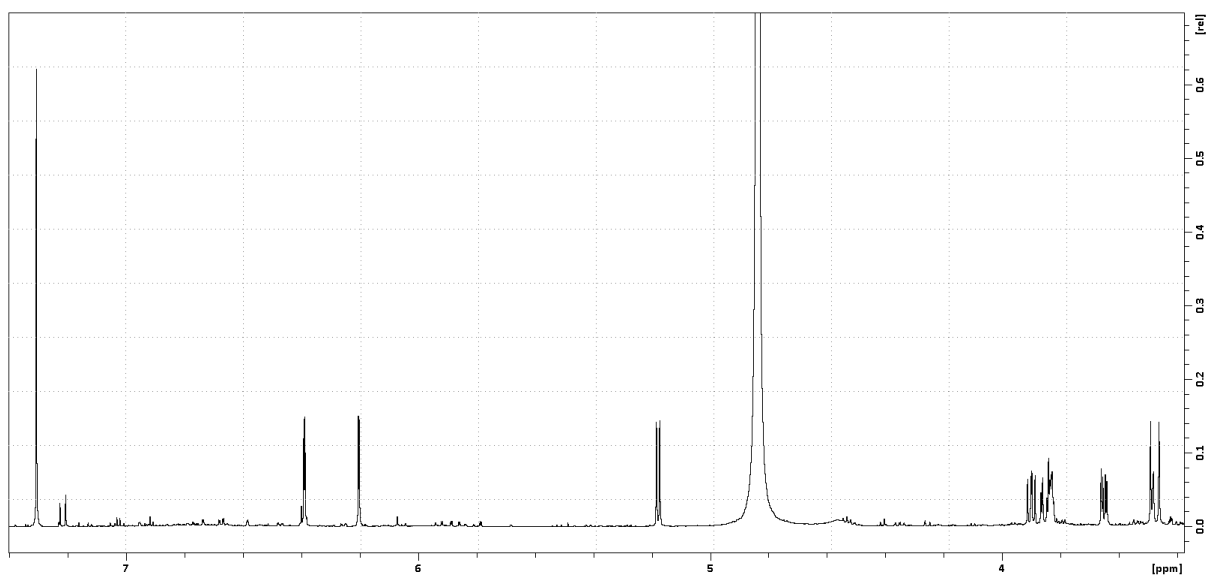


Εικόνα 77 Φάσμα ^1H -NMR στα 400 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.

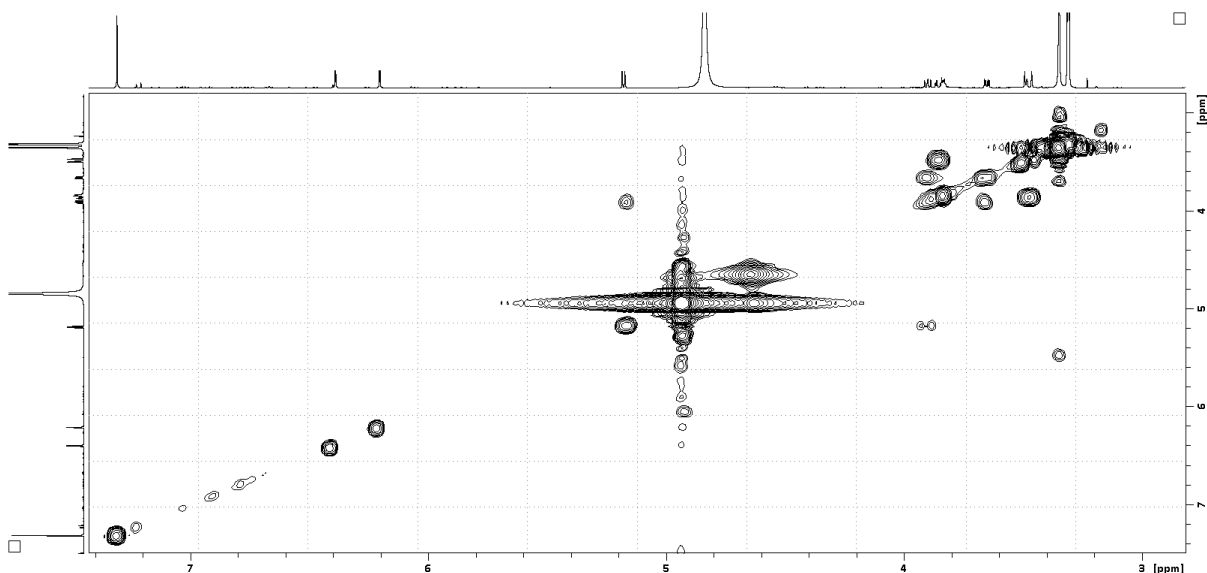
cm8



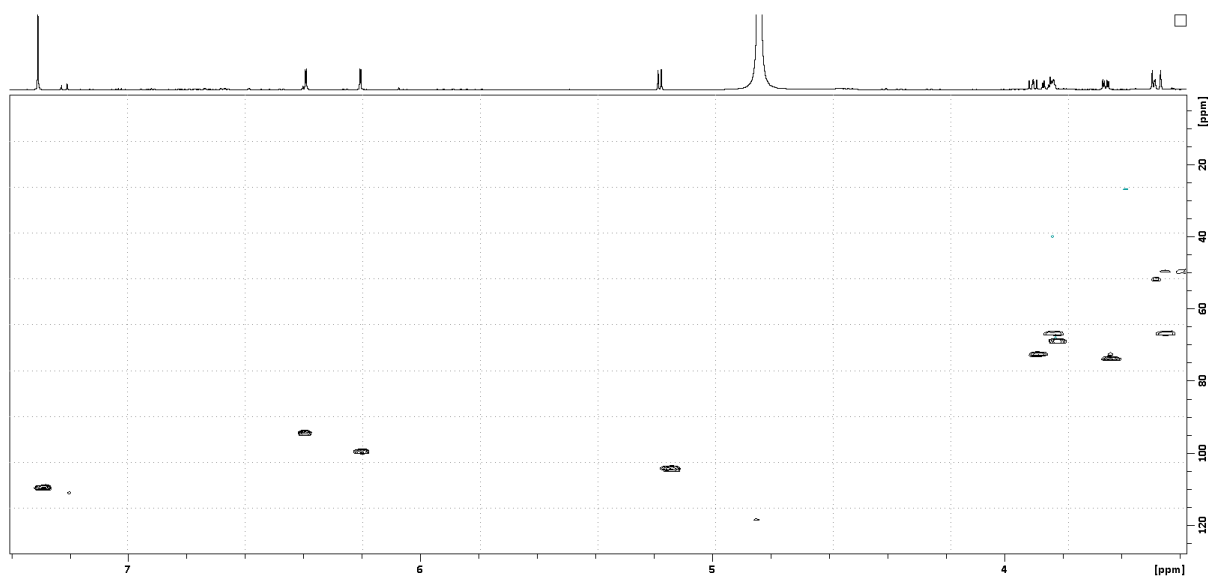
Εικόνα 78 Φάσμα ^1H -NMR στα 400 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.



Εικόνα 79 Φάσμα ^1H -NMR στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.

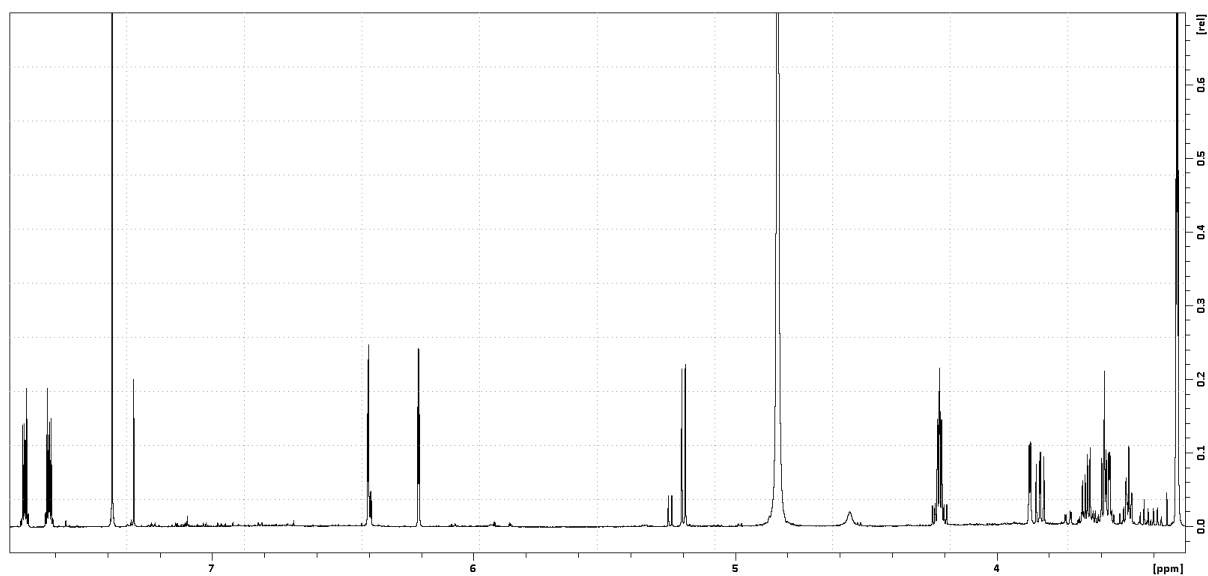


Εικόνα 80 Φάσμα COSY στα 400 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.

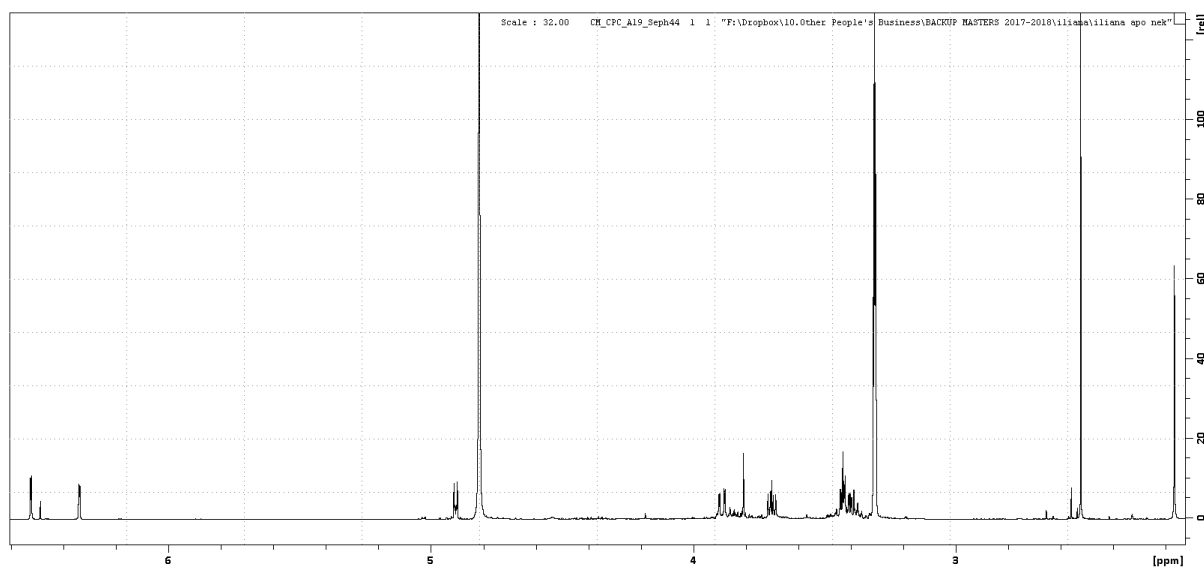


Εικόνα 81 Φάσμα HSQC στα 400 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.

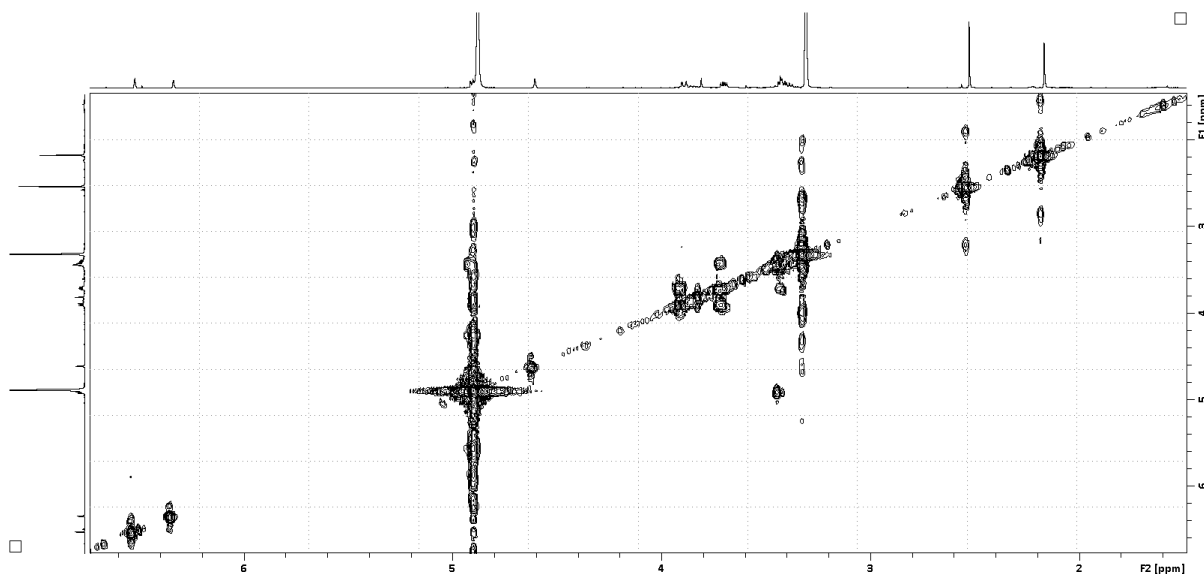
cm10/cm11



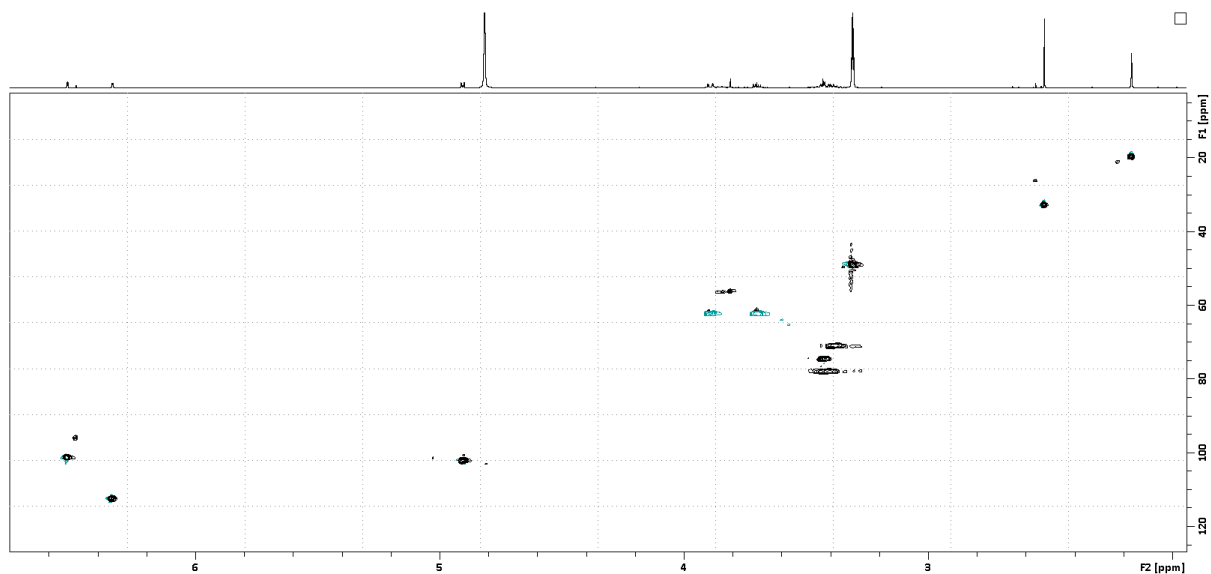
Εικόνα 82 Φάσμα ^1H -NMR στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.



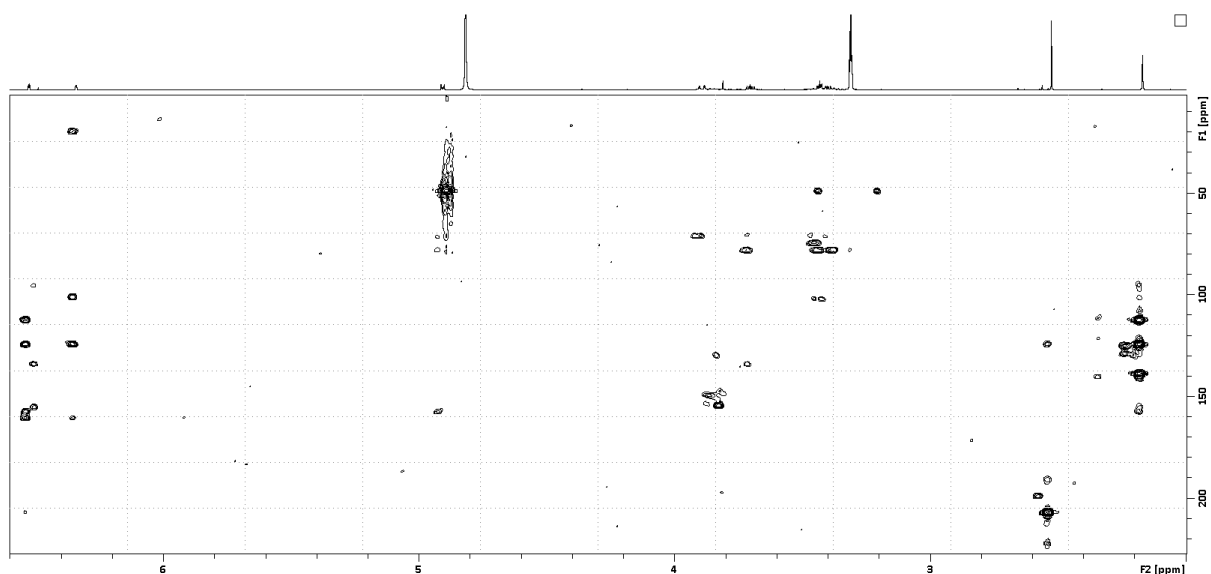
Εικόνα 83 Φάσμα ^1H -NMR στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.



Εικόνα 84 Φάσμα COSY στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του υπολειμματικού διαλύτη σε δ 3.31.

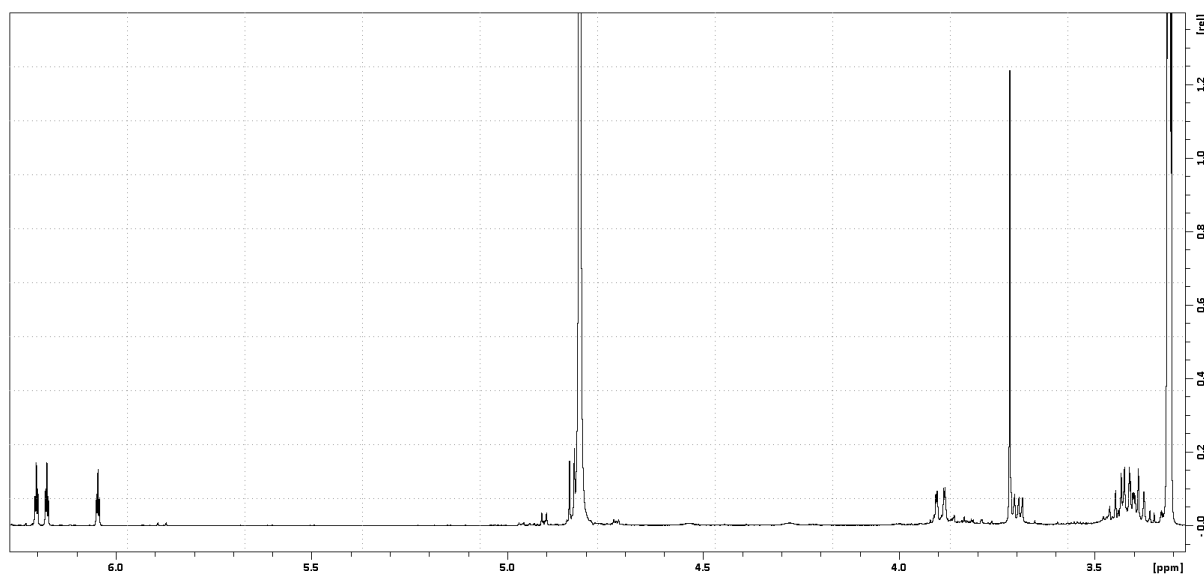


Εικόνα 85 Φάσμα HSQC στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.



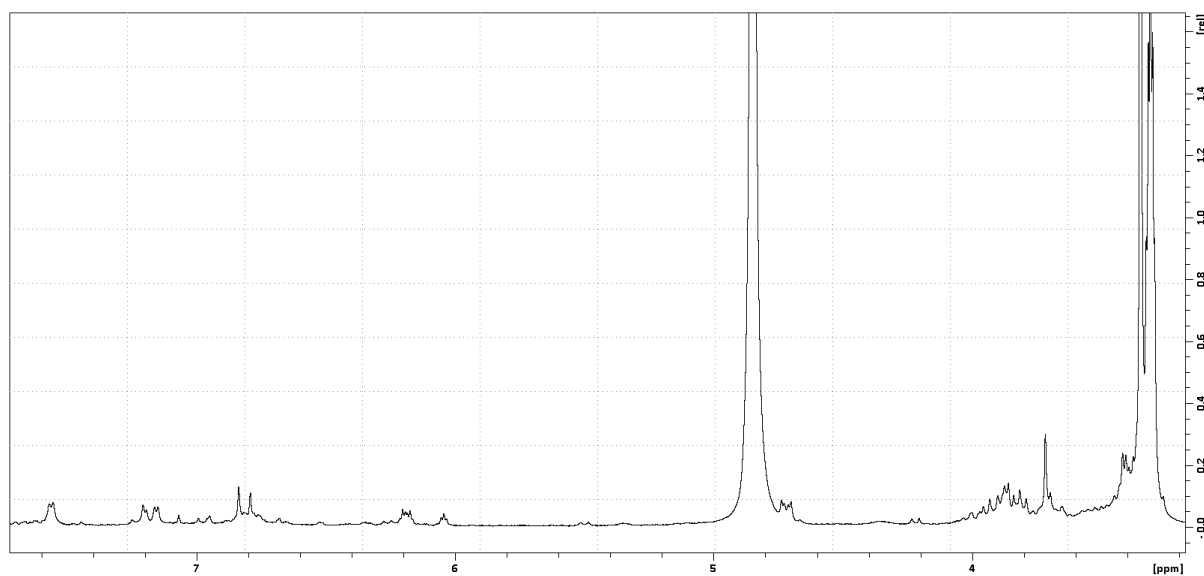
Εικόνα 86 Φάσμα HMBC στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05 για το πρωτόνιο και τον άνθρακα αντίστοιχα.

cm13

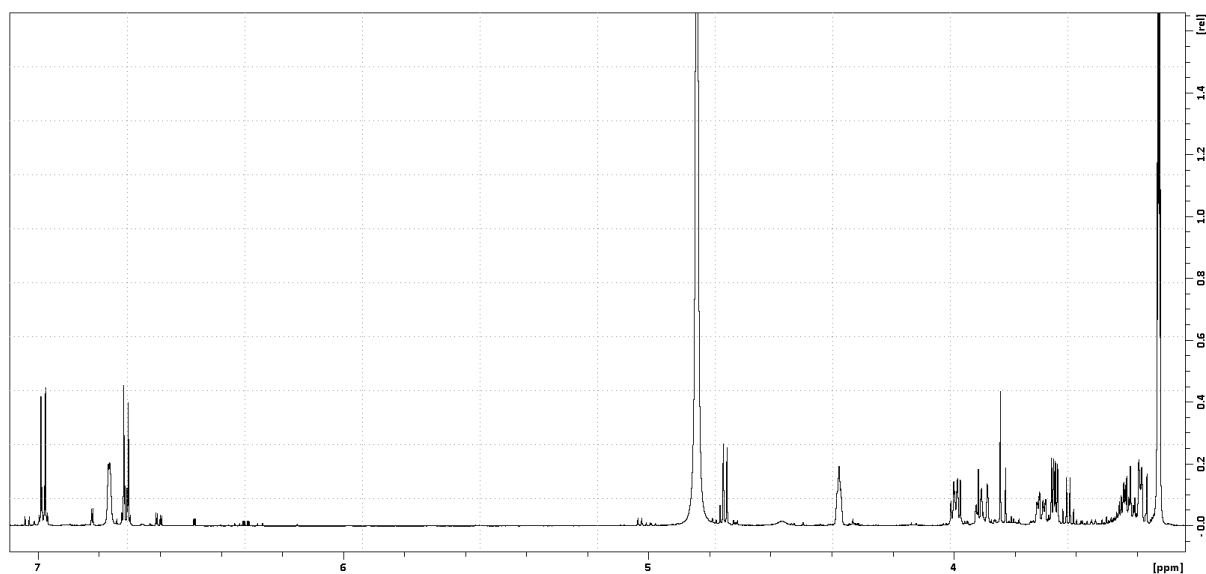


Εικόνα 87 Φάσμα ^1H -NMR στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD . Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.

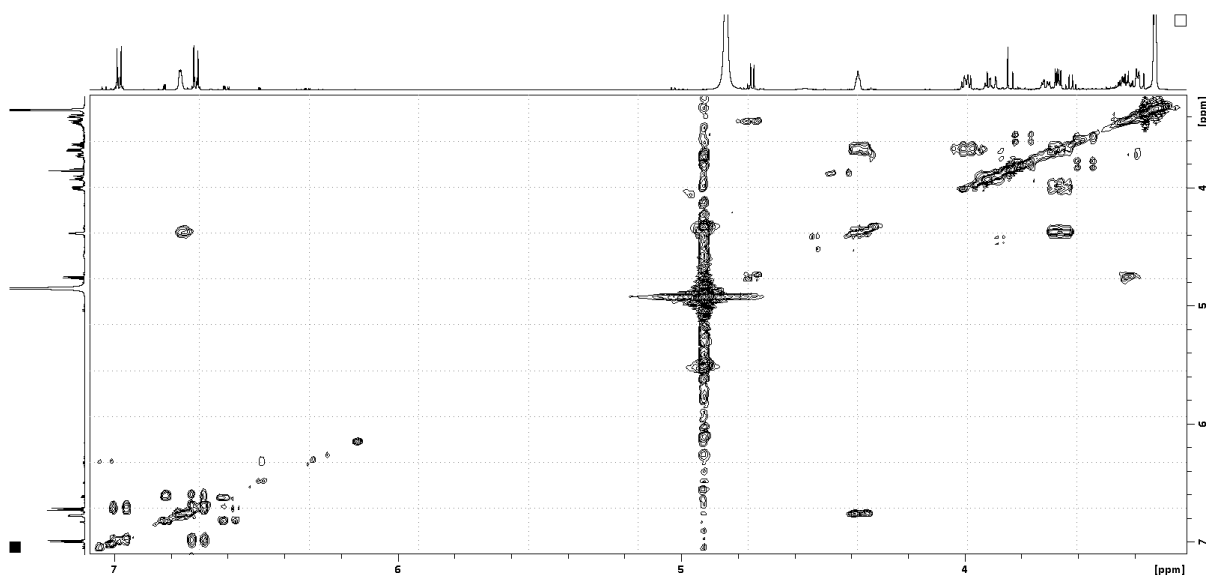
cm14



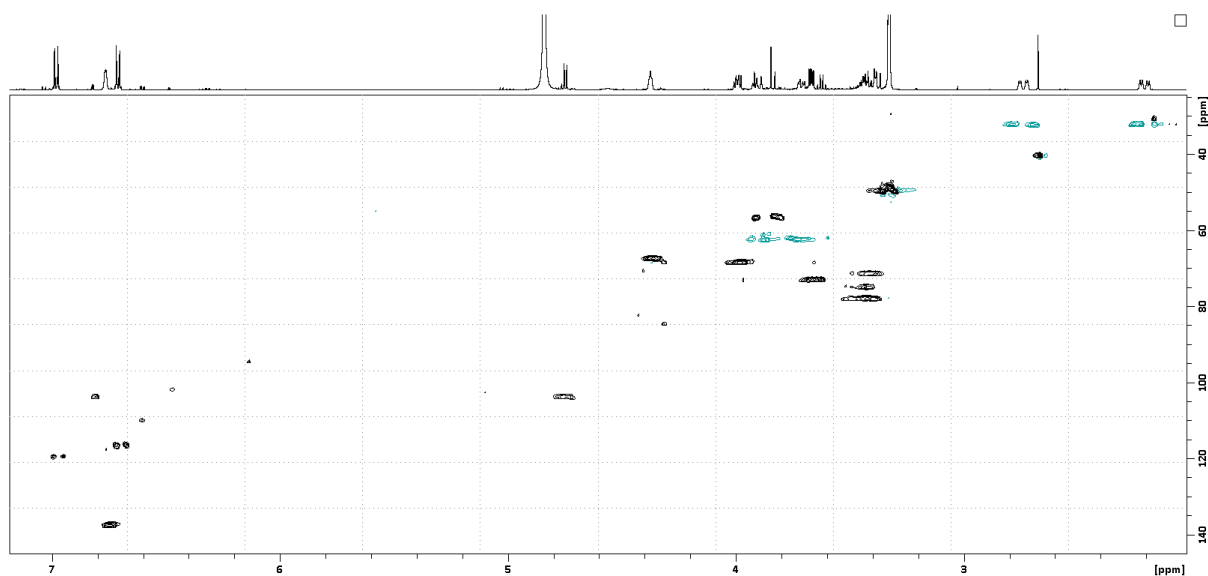
Εικόνα 88 Φάσμα ^1H -NMR στα 200 MHz. Διαλύτης: MeOD . Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.



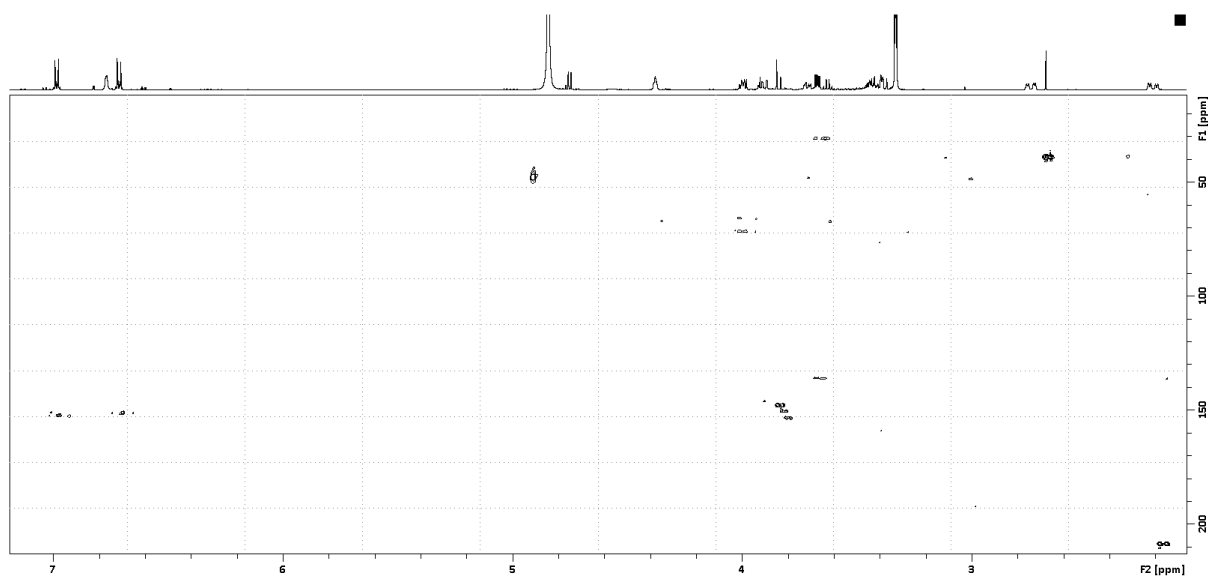
Εικόνα 89 Φάσμα ^1H -NMR στα 600 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του υπολειμματικού διαλύτη σε δ 3.31



Εικόνα 90 Φάσμα COSY στα 200 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του διαλύτη σε δ 3.31.



Εικόνα 91 Φάσμα HSQC στα 200 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του υπολειμματικού διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05.



Εικόνα 92 Φάσμα HMBC στα 200 MHz. Διαλύτης: MeOD. Θερμοκρασία: 300 K. Το φάσμα έχει ως σήμα αναφοράς το σήμα του υπολειμματικού διαλύτη σε δ 3.31 και δ 49.05.

16. Βιβλιογραφία

- Ahmad, F., Rashid, S., Bingol, F., Sener, B., 1993. Screening of some Turkish medicinal plants for their analgesic activity. *Pak. J. Pharm. Sci.* 6, 29–36.
- Akkol, E.K., Orhan, I.E., Yeilada, E., 2012. Anticholinesterase and antioxidant effects of the ethanol extract, ethanol fractions and isolated flavonoids from *Cistus laurifolius* L. leaves. *Food Chem.* 131, 626–631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.041>
- Al-khalil, S., 1995. A survey of plants used in Jordanian traditional medicine. *Int. J. Pharmacogn.* 33, 317–323.
- Ali, H., Chowdhury, A.K.A., Rahman, A.K.M., Borkowski, T., Nahar, L., Sarker, S.D., 2008. Pachypodol , a Flavonol from the Leaves of *Calycopteris floribunda* , Inhibits the Growth of CaCo 2 Colon Cancer Cell Line in vitro 1687, 1684–1687. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Alías, J.C., Sosa, T., Valares, C., Escudero, J.C., Chaves, N., 2012. Seasonal Variation of *Cistus ladanifer* L. Diterpenes. *Plants* 1, 6–15. <https://doi.org/10.3390/plants1010006>
- Anastasaki, T., Demetzos, C., Perdetzoglou, D., Gazouli, M., Loukis, A., Harvala, C., 1999. Analysis of Labdane-Type Diterpenes from *Cistus creticus* (subsp. *creticus* and subsp. *eriocephalus*), by GC and GC-MS 65, 735–739.
- Angelopoulou, D., Demetzos, C., Dimas, C., Perdetzoglou, D., Loukis, A., 2001. Essential Oils and Hexane Extracts from leaves and Fruits of *Cistus monspeliensis*. Cytotoxic Activity of ent-13-epi-Manoyl Oxide and its Isomers 67, 168–171.
- Angelopoulou, D., Demetzos, C., Perdetzoglou, D., 2001. An interpopulation study of the essential oils of *Cistus parviflorus* L. growing in Crete (Greece). *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 405–415. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(00\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(00)00071-5)
- Aronne, G., De Micco, V., 2001. Seasonal dimorphism in theMediterranean *Cistus incanus* L. subsp. *incanus*. *Ann. Bot.* 87, 789–794. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1407>
- Arts, I.C.W., Putte, B. Van De, Hollman, P.C.H., 2000. Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands . 1 . Fruits , Vegetables , Staple Foods , and Processed Foods. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1746–1751.
- Attaguile, G., Perticone, G., Mania, G., Savoca, F., Pennisi, G., Salomone, S., 2004. *Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle. *J. Ethnopharmacol.* 92, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.020>

- Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N., Vanella, A., 2000. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. *Cell Biol. Toxicol.* 16, 83–90. <https://doi.org/10.1023/A:1007633824948>
- Attimarad, M., Mueen Ahmed, K.K., Aldhubaib, B.E., Harsha, S., 2011. High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery. *Pharm. Methods* 2, 71–75. <https://doi.org/10.4103/2229-4708.84436>
- Auger, C., Teissedre, P.-L., Gerain, P., Lequeux, N., Bornet, A., Serisier, S., Besancon, P., Caporiccio, B., Criston, J.-P., Rouanet, J.-M., 2015. Dietary Wine Phenolics Catechin , Quercetin , and Resveratrol Efficiently Protect Hypercholesterolemic Hamsters against Aortic Fatty Streak Accumulation. *J. Agric. Food Chem.* 11–15.
- Azevedo, A. de O., Campos, J.J., Souza, G.G. de, Veloso, C. de C., Duarte, I.D.G., Braga, F.C., Perez, A. de C., 2015. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of myricetin 3- O - b -galactoside isolated from *Davilla elliptica* : involvement of the nitrenergic system. *J. Nat. Med.* <https://doi.org/10.1007/s11418-015-0913-9>
- Azevedo, M.M., Pinheiro, C., Dias, A.C.P., Pinto-Ribeiro, F., Baltazar, F., 2015. Impact of an educational hands-on project on the antimicrobial, antitumor and anti-inflammatory properties of plants on portuguese students??? awareness, knowledge, and competences. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 2437–2453. <https://doi.org/10.3390/ijerph120302437>
- Bag, G.C., Devi, P.G., Bhaigyabati, T., 2015. Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three *Hedychium* Species of Manipur Valley 30, 154–159.
- Bahtiar, A., Han, J., 2017. Leguminous plants in the Indonesian archipelago: Traditional uses and secondary metabolites. *Nat. Prod. Commun.* 12, 461–472.
- Bakkalbasi, E., Menten, O., Artik, N., 2009. Food ellagitannins-occurrence, effects of processing and storage. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49, 283–298. <https://doi.org/10.1080/10408390802064404>
- Baldursdóttir, V., 2011. Occurrence of different persistent organic pollutants in Atlantic cod (*Gadus morhua* L .) in Icelandic waters Occurrence of different persistent organic pollutants in Atlantic cod (*Gadus morhua* L .) in Icelandic waters.
- Balentine, D.A., Wiseman, S.A., Bouwens, L.C.M., Balentine, D.A., Wiseman, S.A., Bouwens,

- L.C.M., 1997. The chemistry of tea flavonoids *The Chemistry of Tea Flavonoids*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 37, 693–704.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibensouda, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Roldán, C., Guillén, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2011a. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship. *Phytochem. Anal.* 22, 303–312. <https://doi.org/10.1002/pca.1281>
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Roldán, C., Guillén, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2011b. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: Evolutionary relationship. *Phytochem. Anal.* 22, 303–312. <https://doi.org/10.1002/pca.1281>
- Barrajón-Catalán, E., Fernández-Arroyo, S., Saura, D., Guillén, E., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2010. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2273–2282. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.060>
- Barrajón-Catalán, E., Tomás-Menor, L., Morales-Soto, A., Bruñá, N.M., López, D.S., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2015. Rockroses (*Cistus* sp.) oils. *Essent. Oils Food Preserv. Flavor Saf.* 649–658. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00074-2>
- Bedoya, L., Bermejo, P., Abad, M., 2009. Anti-Infectious Activity in the Cistaceae Family in the Iberian Peninsula. *Mini-Reviews Med. Chem.* 9, 519–525. <https://doi.org/10.2174/138955709788167600>
- Ben-Jemia, M., Kchouk, M.E., Senatore, F., Autore, G., Marzocco, S., De Feo, V., Bruno, M., 2013a. Antiproliferative activity of hexane extract from Tunisian *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus villosus*. *Chem. Cent. J.* 7, 47. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-47>
- Ben-Jemia, M., Kchouk, M.E., Senatore, F., Autore, G., Marzocco, S., De Feo, V., Bruno, M., 2013b. Antiproliferative activity of hexane extract from Tunisian *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus villosus*. *Chem. Cent. J.* 7, 47. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-47>
- Blainski, A., Lopes, G.C., De Mello, J.C.P., 2013. Application and analysis of the folin ciocalteu

- method for the determination of the total phenolic content from *limonium brasiliense* L. *Molecules* 18, 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Bourdat-Deschamps, M., Herrenknecht, C., Akendengue, B., Laurens, A., Hocquemiller, R., 2004. Separation of protoberberine quaternary alkaloids from a crude extract of *Enantia chlorantha* by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 1041, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.035>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Butt, M.S., Sultan, M.T., Aziz, M., Naz, A., Ahmed, W., Kumar, N., Imran, M., 2015. PERSIMMON (DIOSPYROS KAKI) FRUIT : HIDDEN PHYTOCHEMICALS AND HEALTH CLAIMS. *EXCLI J.* 14, 542–561.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74, 2157–2184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>
- Caruso, A., Pennisi, G., Attaguile, G., Savoca, F., 1995. Gastroprotective effect of aqueous extract of *Cistus incanus* L. in rats. *Pharmacol. Res.* 31, 29–32.
- Castillo-Munoz, N., Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., Gomez, M.V., Velders, A.H., Hermosin-Gutierrez, I., 2009. Flavonol 3- O -Glycosides Series of *Vitis vinifera* Cv . Petit Verdot Red Wine Grapes. *J. Agric. Food Chem.* 57, 209–219.
- Chinou, I., Demetzos, C., Harvala, C., Roussakis, C., Verbist, J.F., 1994. Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Planta Med.* 60, 34–36. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959403>
- Chon, H., 2012. Medicinal herbs and plant extracts for influenza: Bioactivity, mechanism of anti-influenza effects, and modulation of immune responses, 1st ed, *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59530-0.00011-3>
- Cincotta, F., Verzera, A., Tripodi, G., Condurso, C., 2015. Determination of Sesquiterpenes in Wines by HS-SPME Coupled with GC-MS 410–421. <https://doi.org/10.3390/chromatography2030410>
- Comandini, O., Contu, M., Rinaldi, A.C., 2006. An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 16, 381–395. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0047-8>

- Dallas, M.S.J., 1965. Reproducible Rf Values in Thin-layer Adsorption Chromatography. *J. Chromatogr.* 7, 267–277.
- Danne, A., Petereit, F., Nahrstedt, A., 1994. Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from *Cistus salvifolius*. *Phytochemistry* 37, 533–538. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)85094-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)85094-1)
- Darwish, A.G.G., Samy, M.N., Sugimoto, S., Otsuka, H., Abdel-salam, H., Matsunami, K., 2016. Effects of Hepatoprotective Compounds from the Leaves of *Lumnitzera racemosa* on Acetaminophen-Induced Liver Damage in Vitro. *Chem. Pharm. Bull.* 64, 360–365.
- De Andrés, A.I., Gómez-Serranillos, M.P., Iglesias, I., Villar, A.M., 1999. Effects of extract of *Cistus populifolius* L. on the central nervous system. *Phyther. Res.* 13, 575–579. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199911\)13:7<575::AID-PTR506>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199911)13:7<575::AID-PTR506>3.0.CO;2-W)
- de Dato, G.D., De Angelis, P., Sirca, C., Beier, C., 2010. Impact of drought and increasing temperatures on soil CO₂ emissions in a Mediterranean shrubland (gariga). *Plant Soil* 327, 153–166. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0041-y>
- de Rojas, V.R.S., Ortega, T., Villar, A., 1995. Inhibitory effects of *Cistus populifolius* on contractile responses in the isolated rat duodenum. *J. Ethnopharmacol.* 46, 59–62. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01229-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01229-7)
- Deforce, K., 2006. The historical use of ladanum. Palynological evidence from 15th and 16th century cesspits in northern Belgium. *Veg. Hist. Archaeobot.* 15, 145–148. <https://doi.org/10.1007/s00334-005-0021-y>
- Demetzos, C., Anastasaki, T., Perdetzoglou, D., 2002a. A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. Growing in Crete (Greece). *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 57, 89–94.
- Demetzos, C., Angelopoulou, D., Kolocouris, A., Daliani, I., Mavromoustakos, T., 2001. Structure elucidation, conformational analysis and thermal effects on membrane bilayers of an antimicrobial myricetin ether derivative. *J. Heterocycl. Chem.* 38, 703–710. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570380327>
- Demetzos, C., Angelopoulou, D., Perdetzoglou, D., 2002b. A comparative study of the essential oils of *Cistus salvifolius* in several populations of Crete (Greece). *Biochem. Syst. Ecol.* 30, 651–665. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00145-4)
- Demetzos, C., Dimas, K.S., 2001. Labdane-type diterpenes: Chemistry and biological activity. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 25, 235–292. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(01\)80009-0](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(01)80009-0)

- Demetzos, C., Harvala, C., Philianos, S.M., Skaltsounis, A.L., 1990. A new labdane-type diterpene and other compounds from the leaves of *cistus incanus* ssp. *Creticus*. *J. Nat. Prod.* 53, 1365–1368. <https://doi.org/10.1021/np50071a039>
- Demetzos, C., Loukis, A., Spiliotis, V., Zoakis, N., Stratigakis, N., Katerinopoulos, H., 1995. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential oil of *Cistus creticus* L. *J. Essent. Oil Res.* 7, 407–410.
- Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A.L., Catherine Harvala, M.C., Libot, F., 1994. Diterpene esters of malonic acid from the resin “Ladano” of *Cistus creticus*. *Phytochemistry* 35, 979–981. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90651-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90651-4)
- Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Agati, G., Tattini, M., 2014. Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environ. Exp. Bot.* 103, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.012>
- Dimas, K., Demetzos, C., Angelopoulou, D., Kolokouris, A., Mavromoustakos, T., 2000. Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines in vitro. *Pharmacol. Res.* 42, 475–478. <https://doi.org/10.1006/phrs.2000.0716>
- Dimas, K., Demetzos, C., Marsellos, M., Sotiriadou, R., Malamas, M., Kokkinopoulos, D., 1998. Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines in vitro. *Planta Med.* 64, 208–211. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957410>
- Dimas, K., Demetzos, C., Vaos, V., Ioannidis, P., Trangas, T., 2001. Labdane type diterpenes down-regulate the expression of c-myc protein, but not of bcl-2, in human leukemia T-cells undergoing apoptosis. *Leuk. Res.* 25, 449–454. [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(00\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(00)00150-8)
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97, 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Dorman, D., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R., 2004. Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Lamiaceae Species Grown in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 52, 762–770. <https://doi.org/10.1021/jf034908v>
- Droebner, K., Ehrhardt, C., Poetter, A., Ludwig, S., Planz, O., 2007. CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Res.* 76, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.04.001>

- Ehrhardt, C., Hrincius, E.R., Korte, V., Mazur, I., Droebner, K., Poetter, A., Dreschers, S., Schmolke, M., Planz, O., Ludwig, S., 2007. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antiviral Res.* 76, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.05.002>
- El Euch, S.K., Bouajila, J., Bouzouita, N., 2015. Chemical composition, biological and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts. *Ind. Crops Prod.* 76, 1100–1105. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.033>
- Ellul, P., Boscaiu, M., Vicente, O., Moreno, V., Rosselló, J.A., 2002. Intra- and interspecific variation in DNA content in *Cistus* (Cistaceae). *Ann. Bot.* 90, 345–351. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf194>
- Falara, V., Pichersky, E., Kanellis, A.K., 2010. A Copal-8-ol Diphosphate Synthase from the Angiosperm *Cistus creticus* subsp. *creticus* Is a Putative Key Enzyme for the Formation of Pharmacologically Active, Oxygen-Containing Labdane-Type Diterpenes. *Plant Physiol.* 154, 301–310. <https://doi.org/10.1104/pp.110.159566>
- Falchi, A., Paolini, J., Desjobert, J.M., Melis, A., Costa, J., Varesi, L., 2009. Phylogeography of *Cistus creticus* L. on Corsica and Sardinia inferred by the TRNL-F and RPL32-TRNL sequences of cpDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 538–543. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.04.002>
- Fanouriou, E., Kalivas, D., Daferera, D., Tarantilis, P., Trigas, P., Vahamidis, P., Economou, G., 2018. Hippocratic medicinal flora on the Greek Island of Kos: Spatial distribution, assessment of soil conditions, essential oil content and chemotype analysis. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 9, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.03.003>
- Ferrandis, P., Herranz, J.M., Martínez-Sánchez, J.J., 1999. Effect of fire on hard-coated Cistaceae seed banks and its influence on techniques for quantifying seed banks. *Plant Ecol.* 144, 103–114. <https://doi.org/10.1023/A:1009816309061>
- Fokialakis, N., Kalpoutzakis, E., Tekwani, B.L., Skaltsounis, A.L., Duke, S.O., 2006. Antileishmanial activity of natural diterpenes from *Cistus* sp. and semisynthetic derivatives thereof. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1775–1778. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1775>
- Friesen, J.B., McAlpine, J.B., Chen, S.N., Pauli, G.F., 2015. Countercurrent Separation of Natural Products: An Update. *J. Nat. Prod.* 78, 1765–1796.

<https://doi.org/10.1021/np501065h>

- G. Urones, J., Basabe, P., S. Marcos, I., Jiménez, A., M. Lithgow, A., López, M., F. Moro, R., Gómez, A., 1994. Ring a functionalized Neo-clerodane diterpenoids from *Cistus populifolius*. *Tetrahedron* 50, 10791–10802. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)89271-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)89271-1)
- Gabriele, M., Parri, E., Felicioli, A., Sagona, S., Pozzo, L., Biondi, C., Domenici, V., Pucci, L., Unit, P., Unit, T., n.d. Paper Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Tuscan Bee Pollen of Different Botanic Origins 27, 2015.
- Gadetskaya, A. V, Mohamed, S.M., Tarawneh, A.H., Cantrell, C.L., Cutler, S.J., Ross, S.A., 2017. Phytochemical characterization and biological activity of secondary metabolites from three *Limonium* species. *Med. Chem. Res.* 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00044-017-1973-z>
- Gori, A., Ferrini, F., Marzano, M.C., Tattini, M., Centritto, M., Baratto, M.C., Pogni, R., Brunetti, C., 2016. Characterisation and antioxidant activity of crude extract and polyphenolic rich fractions from *C. Incanus* leaves. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms17081344>
- Gulz, P., Herrmann, T., Hangst, K., 1996. Leaf trichomes in the genus *Cistus*. *Flora* 191, 85–104. [https://doi.org/10.1016/S0367-2530\(17\)30692-8](https://doi.org/10.1016/S0367-2530(17)30692-8)
- Gürbüz, P., Koşar, M., Güvenalp, Z., Uz, A.K., 2018. Simultaneous determination of selected flavonoids from different *Cistus* species by HPLC-PDA 22, 405–410.
- Güvenalp, Z., Demirezer, O., 2005. Flavonol Glycosides from *Asperula arvensis* L. 29, 163–169.
- Güvenç, A., Yıldız, S., Özkan, A.M., Erdurak, C.S., Coşkun, M., Yılmaz, G., Okuyama, T., Okada, Y., 2005. Antimicrobiological Studies on Turkish *Cistus* . Species. *Pharm. Biol.* 43, 178–183. <https://doi.org/10.1080/13880200590919537>
- Guzmán, B., Vargas, P., 2010. Unexpected synchronous differentiation in Mediterranean and Canarian *Cistus* (Cistaceae). *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 12, 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2009.09.002>
- Guzmán, B., Vargas, P., 2009. Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid *rbcL* and *trnL-trnF* sequences. *Org. Divers. Evol.* 9, 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.ode.2009.01.001>
- Guzmán, B., Vargas, P., 2005. Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus*

- L. (Cistaceae) based on ITS, trnL-trnF, and matK sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 644–660. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.04.026>
- Hamzaoui, M., Renault, J., Nuzillard, J., Reynaud, R., Hubert, J., 2013. Stepwise Elution of a Three-phase Solvent System in Centrifugal Partition Extraction : A New Strategy for the Fractionation and Phytochemical Screening of a Crude Bark Extract 367–373. <https://doi.org/10.1002/pca.2418>
- Haouat, A.C., Sqalli, H., Farah, A., Haggoud, A., Iraqui, M., 2013. Activité antimycobactérienne des extraits de deux espèces marocaines du genre *Cistus*. *Phytotherapie* 11, 365–372. <https://doi.org/10.1007/s10298-013-0806-6>
- Healthcare, G.E., 2010. Gel filtration: Principles and Methods.
- Hussain, A., Ahmad, M., Saleem, M., Dangroo, N.A., Aga, M.A., Manzoor, A., Ahmad, Z., Jamal, M., 2018. *Streptomyces puniceus* strain AS13 ., Production , characterization and evaluation of bioactive metabolites : A new face of dinactin as an antitumor antibiotic. *Microbiol. Res.* 207, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.004>
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., Yankova, T., 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 96, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.08.033>
- J. B. Peri and A. L. Hensley, J., 1968. The Surface Structure of Silica Gel. *J. Am. Chem. Soc.* 2, 44. <https://doi.org/10.1021/j100854a041>
- Jenis, J., Yoon, J., Zia, K., Yeong, U., Song, H., 2017. Phytochemical profile and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of *Limonium michelsonii* Lincz. *J. Nat. Med.* <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1095-4>
- Johnson Jr., C.S., 1999. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy : principles and applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 34, 203–256.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., 1990. Thin-Layer Chromatography Reagents and Detection Methods. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-01031-0>
- Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Chinou, L., Charvala, C., Skaltsounis, a L., 2001. New hemisynthetic manoyl oxide derivatives with antimicrobial activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 49, 814–817. <https://doi.org/10.1248/cpb.49.814>
- Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, A.L., Mitakou, S., 2003. cis-Clerodane type diterpenes from *Cistus monspeliensis*. *J. Nat. Prod.* 66, 316–319.

<https://doi.org/10.1021/np0204388>

- Kalpoutzakis, E., Chinou, I., Mitaku, S., Skaltsounis, A.L., Harvala, C., 1998. Antibacterial labdane-type diterpenes from the resin “ladano” of *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Nat. Prod. Lett.* 11, 173–179. <https://doi.org/10.1080/10575639808044943>
- Kalus, U., Grigorov, A., Kadecki, O., Jansen, J.P., Kiesewetter, H., Radtke, H., 2009. *Cistus incanus* (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract. A prospective, randomised, placebo-controlled clinical study. *Antiviral Res.* 84, 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.001>
- Karim, H., Boubaker, H., Askarne, L., Talibi, I., Msanda, F., Boudyach, E.H., Saadi, B., Ait Ben Aoumar, A., 2016. Antifungal properties of organic extracts of eight *Cistus* L. species against postharvest citrus sour rot. *Lett. Appl. Microbiol.* 62, 16–22. <https://doi.org/10.1111/lam.12507>
- Kazuma, K., Noda, N., Suzuki, M., 2003. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea* 62, 229–237.
- Kennedy, M.L., Cortés, F., Piñero, J.E., Castanys, S., López-arencibia, A., 2011. Leishmanicidal and Reversal Multidrug Resistance Constituents from *Aeonium lindleyi*. *Planta Med.* 77, 77–80.
- Kühn, C., Arapogianni, N.E., Halabalaki, M., Hempel, J., Hunger, N., Wober, J., Skaltsounis, A.L., Vollmer, G., 2011a. Constituents from *cistus salvifolius* (Cistaceae) activate peroxisome proliferator-activated receptor- γ but not $-\delta$ And stimulate glucose uptake by adipocytes. *Planta Med.* 77, 346–353. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250382>
- Kühn, C., Arapogianni, N.E., Halabalaki, M., Hempel, J., Hunger, N., Wober, J., Skaltsounis, A.L., Vollmer, G., 2011b. Constituents from *cistus salvifolius* (Cistaceae) activate peroxisome proliferator-activated receptor- γ but not $-\delta$ And stimulate glucose uptake by adipocytes. *Planta Med.* 77, 346–353. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250382>
- Küperi, E., Yesilada, E., 2007. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *J. Ethnopharmacol.* 112, 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.04.011>
- Li, R., Morris-Natschke, S.L., Lee, K.H., 2016. Clrodane diterpenes: Sources, structures, and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 33, 1166–1226. <https://doi.org/10.1039/c5np00137d>
- Li, S., Zhang, Z., Cain, A., Wang, B., Long, M., Taylor, J., 2005. Antifungal Activity of

- Camptothecin , Trifolin , and Hyperoside Isolated from *Camptotheca acuminata*. J. Agric. Food Chem. 32–37.
- Llusià, J., Peñuelas, J., Ogaya, R., Alessio, G., 2010. Annual and seasonal changes in foliar terpene content and emission rates in *cistus albidus* L. submitted to soil drought in Prades Forest (Catalonia, NE Spain). Acta Physiol. Plant. 32, 387–394. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0416-y>
- Loizzo, M.R., Ben Jemia, M., Senatore, F., Bruno, M., Menichini, F., Tundis, R., 2013. Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. Food Chem. Toxicol. 59, 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.040>
- Maccioni, S., Baldini, R., Cioni, P.L., Tebano, M., Flamini, and G., 2007. In vivo volatiles emission and essential oils from different organs and pollen of *Cistus albidus* from Caprione (Eastern Liguria, Italy)†. Flavour Fragr. J. 22, 206–213. <https://doi.org/10.1002/ffj>
- Magalhães, L.M., Santos, F., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., 2010. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. Talanta 83, 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.042>
- Maggi, F., Lucarini, D., Papa, F., Peron, G., Dall'Acqua, S., 2016. Phytochemical analysis of the labdanum-poor *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter et Burdet growing in central Italy. Biochem. Syst. Ecol. 66, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.02.030>
- Mann, F.G., Saunders, B.C., 1960. Practical Organic Chemistry.
- Mansoor, K.A., Matalaka, K.Z., Qa'dan, F.S., Awad, R., Schmidt, M., 2015. Two new proanthocyanidin trimers isolated from *Cistus incanus* L. demonstrate potent anti-inflammatory activity and selectivity to cyclooxygenase isoenzymes inhibition. Nat. Prod. Res. 6419, 1–8. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1089242>
- Martínez-Ferri, E., Balaguer, L., Valladares, F., Chico, J.M., Manrique, E., 2000. Energy dissipation in drought-avoiding and drought-tolerant tree species at midday during the Mediterranean summer. Tree Physiol. 20, 131–138. <https://doi.org/10.1093/treephys/20.2.131>
- Matsingou, C., Dimas, K., Demetzos, C., 2006. Design and development of liposomes incorporating a bioactive labdane-type diterpene. In vitro growth inhibiting and cytotoxic activity against human cancer cell lines. Biomed. Pharmacother. =

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.03.007>

- Moreira, H., Ślęzak, A., Szyjka, A., Oszmiański, J., Gasiorowski, K., 2017. Antioxidant and cancer chemopreventive activities of cistus and pomegranate polyphenols. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 74, 688–698.
- Müller, M., Siles, L., Cela, J., Munné-Bosch, S., 2014. Perennially young: Seed production and quality in controlled and natural populations of *Cistus albidus* reveal compensatory mechanisms that prevent senescence in terms of seed yield and viability. *J. Exp. Bot.* 65, 287–297. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert372>
- Nantapap, S., Punyanitya, S., Nuntasaen, N., Pompimon, W., Meepowpan, P., Conservation, P., Mai, C., Industrial, C., Mai, C., 2017. Flavones from aerial parts of *Polyalthia bullata* and cytotoxicity against cancer cell lines. *Chem. Nat. Compd.* 53, 648–649. <https://doi.org/10.1007/s10600-017-2114-0>
- Nassar, M.I., Mohamed, T.K., El-toumy, S.A., Gaara, A.H., El-kashak, W.A., Brouard, I., El-kousy, S.M., 2011. Phenolic metabolites from *Pyrus calleryana* and evaluation of its free radical scavenging activity. *Carbohydr. Res.* 346, 64–67. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.11.007>
- Nicoletti, M., Toniolo, C., Venditti, A., Bruno, M., Ben Jemia, M., 2015. Antioxidant activity and chemical composition of three Tunisian *Cistus*: *Cistus monspeliensis*, *Cistus villosus* and *Cistus libanotis*. *Nat. Prod. Res.* 29, 223–230. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.947486>
- Öğütveren, M., Tetik, S.S., 2004. Composition of the essential oil of *cistus laurifolius* L. from Turkey. *J. Essent. Oil Res.* 16, 24–25. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698641>
- Ormeño, E., Mévy, J.P., Vila, B., Bousquet-Mélou, A., Greff, S., Bonin, G., Fernandez, C., 2007. Water deficit stress induces different monoterpene and sesquiterpene emission changes in Mediterranean species. Relationship between terpene emissions and plant water potential. *Chemosphere* 67, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.029>
- Paolini, J., Falchi, A., Quilichini, Y., Desjobert, J.M., Cian, M.C. De, Varesi, L., Costa, J., 2009. Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*). *Phytochemistry* 70, 1146–1160. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.013>

- Papaefthimiou, D., Papanikolaou, A., Falara, V., Givanoudi, S., Kostas, S., Kanellis, A.K., 2014a. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front. Chem.* 2, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00035>
- Papaefthimiou, D., Papanikolaou, A., Falara, V., Givanoudi, S., Kostas, S., Kanellis, A.K., 2014b. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front. Chem.* 2, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00035>
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C., 2001. A Single Extraction Step in the Quantitative Analysis of Arbutin in Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) Leaves by High-Performance Liquid Chromatography 339, 336–339.
- Petereit, F., Kolodziej, H., Nahrstedt, A., 1991. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* 30, 981–985. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85291-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85291-7)
- Piluzza, G., Bullitta, S., 2011. Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharm. Biol.* 49, 240–247. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.501083>
- Plumb, G.W., Pascual-Teresa, S. de, Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., Williamson, G., 2016. Antioxidant properties of gallocatechin and prodelphinidins from pomegranate peel. *Commun. Free Radic. Res.* 7, 41–46. <https://doi.org/10.1179/135100002125000172>
- Proksch, P., 1984. Methylated Flavonoids from *Cistus ladanifer* and *Cistus palhinhae* and their Taxonomic Implications. *Phytochemistry* 23, 470–471.
- Qa'dan, F., Petereit, F., Nahrstedt, A., 2003. Prodelphinidin trimers and characterization of a proanthocyanidin oligomer from *Cistus albidus*. *Pharmazie* 58, 416–419.
- QaDan, F., Nahrstedt, A., Schmidt, M., 2011. Isolation of two new bioactive proanthocyanidins from *Cistus salvifolius* herb extract 3, 20–23. <https://doi.org/10.1691/ph.2011.0839>
- Raganati, F., Procentese, A., Olivieri, G., Russo, M.E., Salatino, P., Marzocchella, A., 2018. Bio-butanol separation by adsorption on various materials: Assessment of isotherms and effects of other ABE-fermentation compounds. *Sep. Purif. Technol.* 191, 328–339.

<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.09.059>

- Rauwald, H.W., Hutschenreuther, A., Birkemeyer, C., Grötzinger, K., Straubinger, R.K., 2010. Growth inhibiting activity of volatile oil from *Cistus creticus* L. against *Borrelia burgdorferi* s.s. in vitro. *Pharmazie* 65, 290–295. <https://doi.org/10.1691/ph.2010.9762>
- Rebaya, A., Belghith, S.I., Cherif, J.K., Trabelsi-Ayadi, M., 2016a. Total phenolic compounds and antioxidant potential of rokrose (*Cistus salviifolius*) leaves and flowers grown in Tunisia. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 8, 327–331.
- Rebaya, A., Belghith, S.I., Hammrouni, S., Maaroufi, A., Ayadi, M.T., Chérif, J.K., 2016b. Antibacterial and antifungal activities of ethanol extracts of *Halimium halimifolium*, *Cistus salviifolius* and *Cistus monspeliensis*. *Int. J. Pharm. Clin. Res.* 8, 243–247.
- Rebensburg, S., Helfer, M., Schneider, M., Koppensteiner, H., Eberle, J., Schindler, M., Gürtler, L., Brack-Werner, R., 2016. Potent in vitro antiviral activity of *Cistus incanus* extract against HIV and Filoviruses targets viral envelope proteins. *Sci. Rep.* 6, 20394. <https://doi.org/10.1038/srep20394>
- Reuter, J., Wölflé, U., Weckesser, S., Schempp, C., 2010. Which plant for which skin disease? Part 1: Atopic dermatitis, psoriasis, acne, condyloma and herpes simplex. *JDDG J. der Dtsch. Dermatologischen Gesellschaft* 8, 788–796. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2010.07496.x>
- Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C., 1996. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Anal. Chem.* 68, 1033–1039. <https://doi.org/10.1021/ac9508199>
- Riehle, P., Vollmer, M., Rohn, S., 2013a. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions - Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Res. Int.* 53, 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.020>
- Riehle, P., Vollmer, M., Rohn, S., 2013b. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions - Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Res. Int.* 53, 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.020>
- Rivoal, A., Fernandez, C., Lavoit, A. V., Olivier, R., Lecareux, C., Greff, S., Roche, P., Vila, B., 2010. Environmental control of terpene emissions from *Cistus monspeliensis* L. in natural Mediterranean shrublands. *Chemosphere* 78, 942–949. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.047>
- Robles, C., Bousquet-Mélou, A., Garzino, S., Bonin, G., 2003. Comparison of essential oil

- composition of two varieties of *Cistus ladanifer*. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 339–343.
[https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00161-8](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00161-8)
- Robles, C., Garzino, S., 2000. Intraspecific variability in the essential oil composition of *Cistus monspeliensis* leaves. *Phytochemistry* 53, 71–75. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00460-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00460-4)
- Robles, C., Garzino, S., 1998. Essential oil composition of *Cistus albidus* leaves. *Phytochemistry* 48, 1341–1345. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01124-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01124-2)
- Sadhu, S.K., Okuyama, E., Fujimoto, H., Ishibashi, M., Yesilada, E., 2006. Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a Turkish medicinal plant. *J. Ethnopharmacol.* 108, 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.05.024>
- Sakar, M.K., Petered, F., Nahrsted, A., 1993. Two Phloroglucinol Glucosides, Flavan Gallates and Flavonol Glycosides from *Sedum sediforme* flowers 33, 171–174.
- Sayah, K., Marmouzi, I., Naceiri Mrabti, H., Cherrah, Y., Faouzi, M.E.A., 2017. Antioxidant Activity and Inhibitory Potential of *Cistus salviifolius* (L.) and *Cistus monspeliensis* (L.) Aerial Parts Extracts against Key Enzymes Linked to Hyperglycemia. *Biomed Res. Int.* 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/2789482>
- Scharbert, S., Holzmann, N., Hofmann, T., 2004. Identification of the Astringent Taste Compounds in Black Tea Infusions by Combining Instrumental Analysis and Human Bioresponse 3498–3508.
- Scognamiglio, M., Fiumano, V., Abrosca, B.D., Esposito, A., Hae, Y., Verpoorte, R., Fiorentino, A., 2014. Phytochemistry Chemical interactions between plants in Mediterranean vegetation: The influence of selected plant extracts on *Aegilops geniculata* metabolome. *Phytochemistry* 106, 69–85.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.07.006>
- Skorić, M., Todorović, S., Gligorijević, N., Janković, R., Živković, S., Ristić, M., Radulović, S., 2012. Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines. *Ind. Crops Prod.* 38, 153–159.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.017>
- Someya, S., Yoshiki, Y., Okubo, K., 2002. Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). *Food Chem.* 79, 351–354.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat.*

- Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 579, 200–213.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.023>
- Sulaymon, A.H., Ebrahim, S.E., 2010. Saving amberlite XAD4 by using inert material in adsorption process. Desalin. Water Treat. 20, 234–242.
<https://doi.org/10.5004/dwt.2010.1531>
- Surveswaran, S., Cai, Y., Corke, H., Sun, M., 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. Food Chem. 102, 938–953.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.033>
- Teixeira, S., Mendes, A., Alves, A., Santos, L., 2007. Simultaneous distillation-extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladanifer* L. Anal. Chim. Acta 584, 439–446.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.11.054>
- Thanos, C.A., Georghiou, K., Kadis, C., Pantazi, C., 1992. Cistaceae: A plant family with hard seeds. Isr. J. Bot. 41, 251–263. <https://doi.org/10.1080/0021213X.1992.10677232>
- Tomás-Lorente, F., Garcia-Grau, M.M., Nieto, J.L., Tomás-Barberán, F.A., 1992. Flavonoids from *Cistus ladanifer* bee pollen. Phytochemistry 31, 2027–2029.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80355-I](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80355-I)
- Tomás-Menor, L., Barrajon-Catalán, E., Segura-Carretero, A., Martí, N., Saura, D., Menéndez, J.A., Joven, J., Micol, V., 2015. The promiscuous and synergic molecular interaction of polyphenols in bactericidal activity: An opportunity to improve the performance of antibiotics? Phyther. Res. 29, 466–473. <https://doi.org/10.1002/ptr.5296>
- Tomás-Menor, L., Morales-Soto, A., Barrajon-Catalán, E., Roldán-Segura, C., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2013a. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. Food Chem. Toxicol. 55, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.006>
- Tomás-Menor, L., Morales-Soto, A., Barrajon-Catalán, E., Roldán-Segura, C., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2013b. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. Food Chem. Toxicol. 55, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.006>
- Tuvshintulga, B., Igarashi, I., Suganuma, K., Inoue, N., 2017. Flavonoid and Galloyl Glycosides Isolated from *Saxifraga spinulosa* and Their Antioxidative and Inhibitory Activities against Species That Cause Piroplasmosis. J. Nat. Prod. 80, 2416–2423.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00142>

- Ulrich Kalus, H.K. and H.R., 2009. Effect of CYSTUS052" and Green Tea on Subjective Symptoms in Patients with Infection of the Upper Respiratory Tract. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 22, 557–559. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Valares Masa, C., Alías Gallego, J.C., Chaves Lobón, N., Sosa Díaz, T., 2016. Intra-Population Variation of Secondary Metabolites in *Cistus ladanifer* L. *Molecules* 21. <https://doi.org/10.3390/molecules21070945>
- Vega, C. De, Ortiz, P.L., Herrera, C.M., Talavera, S., 2009. The ant-pollination system of *Cytinus hypocistis* (Cytinaceae), a Mediterranean root holoparasite. *Ann. Bot.* 1065–1075. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp049>
- Venditti, A., Bianco, A., Tomassini, L., Nicoletti, M., 2014. A C-methylated resacetophenone from *Cistus monspeliensis* L. *Fitoterapia* 95, 182–185. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.03.011>
- Vitali, F., Pennisi, G., Attaguile, G., Savoca, F., Tita, B., 2011. Antiproliferative and cytotoxic activity of extracts from *Cistus incanus* L. and *Cistus monspeliensis* L. on human prostate cell lines. *Nat. Prod. Res.* 25, 188–202. <https://doi.org/10.1080/14786410802583148>
- Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant* 3, 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Vogt, T., Gulz, P.-G., Wray, V., 1988. Epicuticular 5-O-methyl flavonols from *Cistus laurifolius*. *Phytochemistry* 27, 3712–3713.
- Vogt, T., Proksch, P., Gülz, P.G., Wollenweber, E., 1987. Rare 6- and 8-O-methylated epicuticular flavonols from two *Cistus* species. *Phytochemistry* 26, 1027–1030. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82342-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82342-0)
- Wan, C., Yu, Y., Zhou, S., Liu, W., Tian, S., Cao, S., 2011. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of *Gynura divaricata* leaf extracts at different temperatures. *Pharmacogn. Mag.* 7, 40–45. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.75900>
- Wang, Y., Singh, A.P., Nelson, H.N., Kaiser, A.J., Reker, N.C., Hooks, T.L., Wilson, T., Vorsa, N., 2016. Urinary Clearance of Cranberry Flavonol Glycosides in Humans. *J. Agric. Food Chem.* 64, 7931–7939. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03611>
- Williams, D.H., Stone, M.J., Hauck, P.R., Rahman, S.K., 1989. Why are secondary metabolites (Natural Products) biosynthesized. *J. Nat. Prod.* 52, 1189–1208. <https://doi.org/10.1021/np50066a001>

- Winter, K. De, Renterghem, L. Van, Wuyts, K., Pelantovμ, H., 2015. Chemoenzymatic Synthesis of b - d -Glucosides using Cellobiose Phosphorylase from *Clostridium thermocellum*. Adv. Synth. Catal. 357, 1961–1969. <https://doi.org/10.1002/adsc.201500077>
- Wittpahl, G., Kölling-Speer, I., Basche, S., Herrmann, E., Hannig, M., Speer, K., Hannig, C., 2015. The Polyphenolic Composition of *Cistus incanus* Herbal Tea and Its Antibacterial and Anti-adherent Activity against *Streptococcus mutans*. *Planta Med.* 81, 1727–1735. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1557822>
- Wolffram, S., Block, M., Ader, P., 2018. Quercetin-3-Glucoside Is Transported by the Glucose Carrier SGLT1 across the Brush Border Membrane of Rat Small Intestine. *Biochem. Mol. Action Nutr.* 630–635.
- Yamanaka, M., Shimomura, K., Sasaki, K., Yoshihira, K., Ishimaru, K., 1995. Glucosylation of phenolics by hairy root cultures of *Lobelia Sessilifolia*. *Phytochemistry* 40, 1149–1150.
- Yeşilada, E., Gürbüz, I., Ergun, E., 1997. Effects of *Cistus laurifolius* L. flowers on gastric and duodenal lesions. *J. Ethnopharmacol.* 55, 201–211. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(96\)01502-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(96)01502-4)
- Yeşilada, E., Gürbüz, I., Shibata, H., 1999. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *J. Ethnopharmacol.* 66, 289–293. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00219-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00219-0)
- Yu, T., Shen, Y., Mcdaniel, R., Floss, H.G., Khosla, C., Hopwood, D.A., Moore, B.S., V, S.U., February, R. V, 1998. Engineered Biosynthesis of Novel Polyketides from *Streptomyces* Spore Pigment Polyketide Synthases 7863, 7749–7759.
- Zaiter, L., Bouheroum, M., Hammoud, L., Sarri, D., Benayache, S., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., 2012. PHYTOCHEMICAL STUDY OF *Halimium halimifolium* 47, 889–890.
- Zebec, Z., Wilkes, J., Jervis, A.J., Scrutton, N.S., Takano, E., Breitling, R., 2016. Towards synthesis of monoterpenes and derivatives using synthetic biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 34, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.002>
- Καββαδάς, Δ., 1990. Εικονογραφημένον Βοτανικόν Φυτολογικόν Λεξικόν.