



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ  
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**Διευθυντής Καθ Α. Σκαλτσούνης**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΚΑΘ. Ι. ΧΗΝΟΥ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ  
ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ**

**Χημική μελέτη γύρης *Cistus creticus* L. Βιολογικές δράσεις**



**ΑΤΣΑΛΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ**

**ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2017**

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Απομόνωση, ανάπτυξη, παραγωγή και έλεγχος βιοδραστικών προϊόντων» του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Ευχαριστώ θερμά,

- Την Καθηγήτρια κα Ιωάννα Χήνου για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εργαστώ στην ερευνητική της ομάδα, την επιλογή του θέματος, καθώς και τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξή της, καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.
- Τις Καθ. Του ΕΚΠΑ κες Ε. Σκαλτσά, Π. Μουτσάτσου και Ι. Χήνου (Επιβλέπουσα) που ως μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, στην κατεύθυνση μεταπτυχιακών σπουδών «Απομόνωση, ανάπτυξη, παραγωγή και έλεγχος βιοδραστικών προϊόντων», του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, έκριναν την εργασία αυτή.
- Τη Δρα κα Κωσταντία Γκράικου για την βοήθεια που μου προσέφερε με προθυμία, σε κάθε στάδιο αυτής της εργασίας.
- Την δρα Σ. Καραμπουρνιώτη, Διευθύντρια του τμήματος διασφάλισης ποιότητας της Αττικής μελισσοκομικής-Αλεξ. Πίττας ΑΕΒΕ, για τους γυρεολογικούς ελέγχους των δειγμάτων γύρης.
- Τους συναδέλφους Φαρμακοποιούς κους Παναγιώτη Παλαρά και τον κ. Νίκο Κουτσιανά (Διευθυνοντα σύμβουλο Arivita A.E.) για τη προμήθεια των δειγμάτων της γύρης που μελετήθηκαν.
- Τον αναπληρωτή καθηγητή Tomasz Mroczek (dept. of Pharmacognosy with Medicinal Plants Unit, Medical Univeristy of Lublin, Poland) για τον έλεγχο αντιχολινεστερασικής δράσης των εκχυλισμάτων γύρης.

Τους συμφοιτητές μου, με τους οποίους συνεργαστήκαμε τα τελευταία δύο χρόνια, για το ευχάριστο κλίμα που δημιουργήθηκε στο εργαστήριο.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αποτέλεσε η μελέτη τριών ελληνικών δειγμάτων γύρης που σε μεγάλο ποσοστό προέρχονται από γύρη του φυτού *Cistus creticus* L.

Το θεωρητικό μέρος αποτελείται από δύο ξεχωριστές ενότητες. Η πρώτη εστιάζει στην μέλισσα και τα προϊόντα που παράγει, και ειδικότερα στη γύρη. Γίνεται αναφορά στις βιολογικές της δράσεις, τις χρήσεις της, ιστορικά και εμπορικά στοιχεία όπως και βιβλιογραφική ανασκόπηση. Η δεύτερη ενότητα αναφέρεται στο *Cistus creticus* L., το φυτό από όπου προέρχεται η γύρη στην οποία επικεντρώνεται η παρούσα εργασία.

Το πειραματικό μέρος ξεκινά με τη γυρεολογική μελέτη των τριών δειγμάτων γύρης (I, II, III). Σε βουτανολικά και μεθανολικά εκχυλίσματα από τα τρία δείγματα γύρης πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, με πρότυπο τόσο το καφεϊκό όσο και το γαλλικό οξύ, όπως και προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών ανά γραμμάριο εκχυλίσματος. Επιπρόσθετα έγινε έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης τους με αναστολή της ελεύθερης ρίζας ABTS<sup>•+</sup> και DPPH<sup>•</sup>.

Αφού διαπιστώθηκε ότι το δείγμα γύρης I που περιείχε σχεδόν αποκλειστικά γύρη *Cistus creticus* L.(98%), εμφανίζει την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και το υψηλότερο ποσοστό φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων, αποφασίστηκε η περαιτέρω χημική μελέτη του με κύριο στόχο την ανίχνευση και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών με πιθανό βιολογικό ενδιαφέρον.

Ακολουθούν οι διαδικασίες εκχύλισης, απομόνωσης και καθορισμού της δομής φυσικών προϊόντων από την γύρη I που έγιναν μέσω χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών μεθόδων. Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία του βουτανολικού και του υδατικού εκχυλίσματος της γύρης I. Από αυτά τα εκχυλίσματα απομονώθηκαν 10 συνολικά δευτερογενείς μεταβολίτες. Επίσης πραγματοποιήθηκε χρωματογραφικός έλεγχος με αέριο χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μάζας (GC-MS) στο κυκλοεξανικό και διχλωρομεθανικό εκχύλισμα από αυτή τη γύρη.

Αναλυτικότερα, από το βουτανολικό εκχύλισμα της γύρης I απομονώθηκαν 3 φαινολικοί δισακχαρίτες:

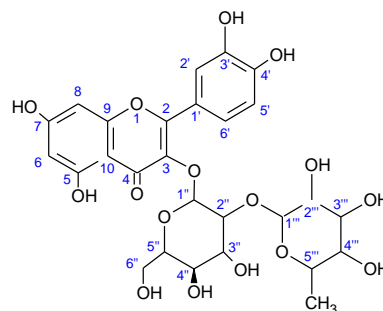
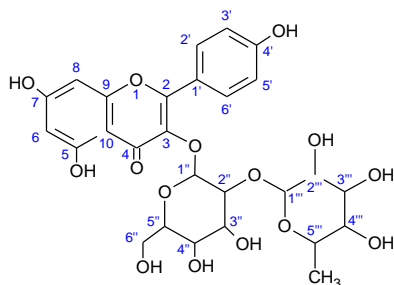
- καιμπφέρολο -3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης (καιμπφέρολο-νεοεσπεριδοσίδης) (1)
- κερκέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης (κερκέτινο-νεοεσπεριδοσίδης) (2)
- μυρικέτινο- 3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης (μυρικέτινο-νεοεσπεριδοσίδης) (3)

και 7 φαινολικοί μονοσακχαρίτες:

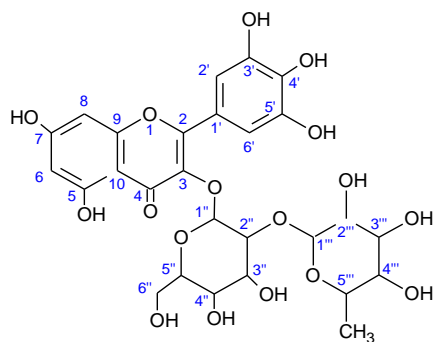
- καιμπφέρολο -7-O-ραμνοσίδης (4)
- καιμπφέρολο-3-O-γαλακτοσίδης (τριφολίνη) (5)
- καιμπφέρολο-3-O-γλυκοσίδης (αστραγαλίνη) (6)
- κερκετινο-7-O-ραμνοσίδης (7)
- κερκέτινο-3-O-γαλακτοσίδης (υπεροσίδης) (8)
- κερκέτινο 3-O-γλυκοσίδης (ισοκερκετίνη) (9).
- ισοραμνέτινο-3-O-γλυκοσίδης (10)

και από το υδατικό εκχύλισμα απομονώθηκε ο φαινολικός μονοσακχαρίτης:

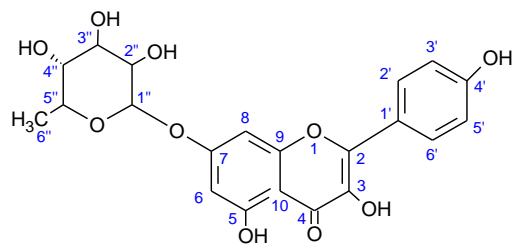
- κερκέτινο 3-O-β-γλυκοσίδης (ισοκερκετίνη) (9).



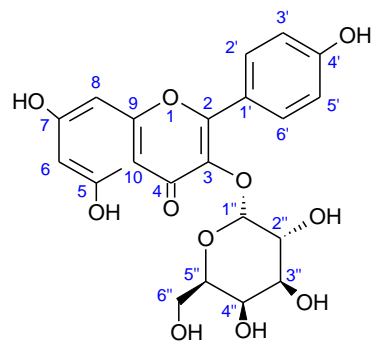
καιμπφέρολο -3-O-β-(1→2) ραμνογλυκοσίδης (1) κερκέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνογλυκοσίδης (2)



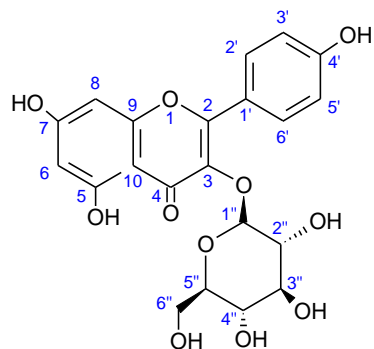
μυρικήτινο- 3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης (3)



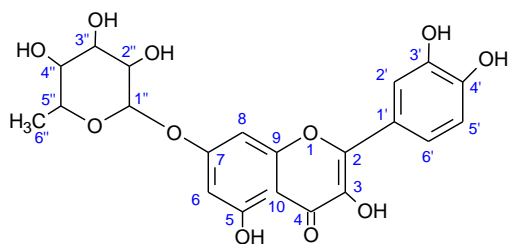
καμπφέρολο -7-O-β-D-ραμνοσίδης (4)



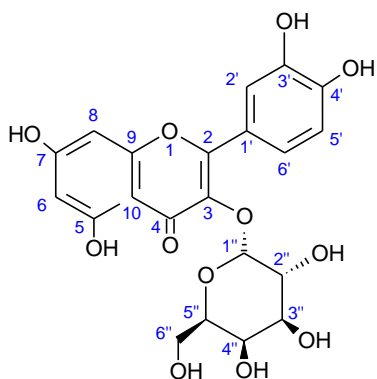
καμπφέρολο-3-O-γαλακτοσίδης (5)



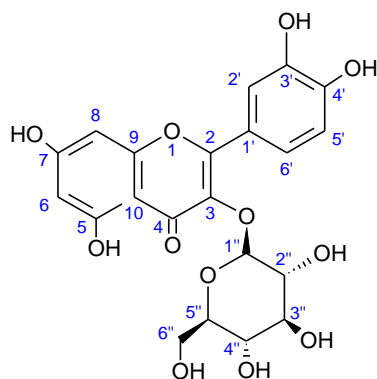
καμπφέρολο-3-O-γλυκοσίδης (6)



κερκετινο-7-O-ραμνοσίδης (7)



κερκέτινο3-O-γαλακτοσίδης (8)



κερκέτινο-3-O-γλυκοσίδης (9)



## ABSTRACT

Bee pollen is a raw material produced by the honey-bees from flowering plants pollen, mixed with nectar and bee's secretions. *Cistus creticus* is a Mediterranean evergreen shrub. Its dried leaves have been traditionally used as infusion and/or decoction and have shown gastroprotective effect, while *per os* administration was used to treat cough and cold, as well as against mouth and throat irritations. This study was carried out to evaluate the antimicrobial and antioxidant properties of Greek *Cistus* (rock rose) bee pollen and to define its phenolic compounds, as well as to assay it for its anticholinesterase potential activities.

The theoretical part of this study consists of two separate sections. The first focuses on the bee and its products, especially pollen. Reference is made to pollen's biological activities, commercial uses as well as with historical and chemical data. Bibliographic review is also cited in this part. The second section refers to *Cistus creticus* L., the plant that the pollen of the present work comes from.

Experimental part starts with the examination of the pollinic spectra of the three Greek bee pollen samples (**I**, **II**, **III**) from *Cistus*. It was obtained by Louveaux's quantitative microscopical analysis and it showed that one of them (**I**) had *Cistus* sp. (Cistaceae) as abundant pollen (together with low percentage of *Brassica* sp., Cruciferae). Throughout the chemical analysis of the extracts, several secondary metabolites of flavonoid structure have been isolated and identified: kaempferol-3-neohesperidoside (**1**), quercetin-3-neohesperidoside (**2**), myricetin-3-neohesperidoside (**3**), kaempferol-7-rhamnoside (**4**), trifolin (**5**), astragalin (**6**), quercetin-7-rhamnoside (**7**), hyperoside (**8**), isoquercetin (**9**) and isorhamnetin-3-glycoside (**10**). Moreover, the total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method, total flavonoid content was estimated by the aluminium chloride colorimetric assay and the free radical scavenging activity was determined by DPPH and ABTS assays. The antimicrobial activity of the extracts was tested against six Gram-positive and -negative bacteria and three human pathogenic fungi, showing an interesting antibacterial profile.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	7
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	11
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>1. ΜΕΛΙΣΣΑ.....</b>	<b>13</b>
1.1 Είδη μέλισσας.....	13
1.2 Φυσιολογία της μέλισσας.....	15
1.3 Στάδια εξέλιξης της μέλισσας.....	15
1.4 Βιολογία της μέλισσας.....	16
1.5 Προϊόντα μέλισσας.....	17
<b>2. ΓΥΡΗ ΦΥΤΩΝ.....</b>	<b>19</b>
2.1 Ορισμός.....	19
2.2 Δομή γυρεόκοκκου.....	20
<b>3. ΓΥΡΗ ΜΕΛΙΣΣΩΝ.....</b>	<b>21</b>
3.1 Εισαγωγικά.....	21
3.2 Χημική σύσταση γύρης μελισσών.....	22
3.3 Συλλογή – Φύλαξη – Διάθεση γύρης μελισσών.....	28
3.4 Βιολογικές Δράσεις και Χρήσεις της Γύρης.....	31
<b>4. CISTUS CRETICUS SBSP. CRETICUS (ΑΛΛΑΔΑΝΙΑ).....</b>	<b>45</b>
4.1 Οικογένεια Cistaceae.....	45
4.2 Γένος <i>Cistus</i> .....	46
4.3 Είδος <i>Cistus creticus</i> L.....	47
4.4 Ιστορικά στοιχεία για το λάδανο .....	50
4.5 Δρογοϊστορία – Χρήσεις – Βιολογικές δράσεις.....	52
4.6 Επιστημονικές μελέτες για βιολογική δράση του <i>cistus creticus</i> .....	53
4.7 Δρογομηχεία του είδους <i>Cistus</i> .....	53
<b>5. ΓΥΡΗ ΑΠΟ CISTUS SP.....</b>	<b>54</b>



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ - ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΟΥΣΙΩΝ –

<b>ΥΛΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ.....</b>	<b>56</b>
1.1 Τεχνικές ανίχνευσης, διαχωρισμού και απομόνωσης των φυσικών προϊόντων.....	56
1.2 Όργανα και τεχνικές προσδιορισμού δομής και ανίχνευσης των φυσικών προϊόντων.....	57

### 2. ΓΥΡΕΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....60

### 3. ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ, ΟΛΙΚΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ,

### ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ.....68

3.1 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-ciocalteu.....	68
3.2 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών με τη μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου (AlCl <sub>3</sub> ).....	73
3.3 Αντιοξειδωτικοί έλεγχοι.....	74
3.4 Συμπεράσματα προσδιορισμού ολικών φαινολικών, ολικών φλαβονοειδών και αντιοξειδωτικών ελέγχων.....	76

### 4. ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΥΡΗΣ I.....78

4.1 Μελέτη χρωματογραφημάτων gc-ms κυκλοεξανικού και διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος του δείγματος της γύρης I.....	80
4.2 Μελέτη βουτανολικού εκχυλίσματος της γύρης του <i>Cistus creticus</i> .....	83
1. Φασματοσκοπική μελέτη του μίγματος (cg8) καιμπφόρολο-3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ- γλυκοσίδη, κερκέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδη, μυρικέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδη.....	87
2. Φασματοσκοπική μελέτη του καιμπφόρολο-3-O-γλυκοσίδη (αστραγαλίνη) (d5.6).....	91
3. Μελέτη του μίγματος D19.22 με LC-MS.....	93
4. Φασματοσκοπική μελέτη του καιμπφόρολο-7-O-β-D-ραμνοσίδη (cg14).....	97
5. Φασματοσκοπική μελέτη του κερκέτινο-7-O-ραμνοσίδη (cg18).....	99
4.3 Υδατικό εκχύλισμα γύρης I.....	101
1. Φασματοσκοπική μελέτη του κερκέτινο 3-O- β- γλυκοσίδη( Ισοκερκετίνη) (G129).....	102

<b>5.ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ</b> .....	105
5.1 Αντιβακτηριακοί έλεγχοι.....	105
5.2 Αντιμυκητιασικοί έλεγχοι.....	106
5.3 Συμπεράσματα αντιμικροβιακών ελέγχων.....	107
5.4 Βιοαυτογραφική δοκιμασία αναστολής ακετυλοχολινεστεράσης σε TLC.....	107
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ</b> .....	109
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	113

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία έχει ως αντικείμενο τη μελέτη της γύρης, στα πλαίσια της έρευνας σε μελισσοκομικά προϊόντα που διεξάγεται στο Φαρμακευτικό Τμήμα του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων από την ερευνητική ομάδα της Καθ κ. Ιωάννας Χήνου. Ειδικότερα μελετήθηκαν τρία ελληνικά δείγματα γύρης μελισσών που συλλέχτηκαν από την Κρήτη, την Πελοπόννησο και την Αττική (**I, II, III**). Για την επιλογή της μελέτης της γύρης συνετέλεσαν τα ακόλουθα κριτήρια:

-το αυξανόμενο ενδιαφέρον που παρατηρείται σε παγκόσμιο επίπεδο για τα μελισσοκομικά προϊόντα και ειδικότερα για τη γύρη, καθώς νέες μελέτες δημοσιεύονται για την επωφελή δράση της στον ανθρώπινο οργανισμό.

Η Καθ. Ι.Χήνου και η ερευνητική της ομάδα μελετά επισταμένα τους δευτερογενείς μεταβολίτες μελισσοκομικών προϊόντων σε επίπεδο πτυχιακών, μεταπτυχιακών και διδακτορικών εργασιών, συμμετέχοντας με δημοσιεύσεις και ανακοινώσεις σε περιοδικά και διεθνή συνέδρια (Stratis et al., 2002, Chinou 2004, 2007, Melliou, 2004, Dania et al., 2008, Graikou et al., 2010 2012, Parachroni et al.,2013, 2014, Skreki, 2016, Varsani,2016).

-τα αποτελέσματα μελέτης αναφορικά με τη χημική σύνθεση και τις βιολογικές δράσεις διαφόρων δειγμάτων γύρης, που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων (Graikou et al, 2011), όπου η γύρη που μελετήθηκε παρουσίασε ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιγηραντικές ιδιότητες.

-Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, μονοποικιλιακή ισπανική γύρη από *Cistus* sp. παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Maguyama et al.,2010). Η μελέτη αυτή απέδωσε την δραστηριότητά της στην ύπαρξη φλαβονοειδών και των γλυκοσιδών τους.

-Το *Cistus creticus* είναι ένα φυτό με έντονο φαρμακευτικό ενδιαφέρον, καθώς παρουσιάζει αντιμικροβιακές, κυτταροτοξικές και αντιϊκές ιδιότητες. Τα φυτά του γένους *Cistus* L. γνωρίζουν ευρεία εξάπλωση στον ελλαδικό χώρο και αποτελούν εξαιρετικά μελισσοτροφικά φυτά, γεγονός που επιτρέπει τη συλλογή δειγμάτων γύρης μελισσών αποτελούμενη σε μεγάλο ποσοστό από τη γύρη των φυτών αυτών. Συνεπώς, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα μια μελέτη με δείγματα του είδους, ελληνικής προέλευσης . καθώς και σύγκριση των αποτελεσμάτων τους με δημοσιευμένες μελέτες γύρης από το γένος *Cistus* L.

Με σκοπό την αξιολόγηση των δειγμάτων και προκειμένου να αποφασιστεί ποιο δείγμα άπτεται του ενδιαφέροντος της παρούσας μελέτης, έγινε γυρεολογικός έλεγχος και αποτίμηση του ολικού φαινολικού φορτίου των δειγμάτων και των ολικών φλαβονοειδών καθώς και έλεγχοι αντιοξειδωτικής δράσης. Από τα τρία δείγματα που εξετάστηκαν (**I, II, III**) το δείγμα με

προέλευση την Κρήτη (I), το οποίο αποτελείται από γύρη προερχόμενη από το φυτό *Cistus creticus* L. σε ποσοστό που προσεγγίζει το 98%, παρουσίασε τις πιο ισχυρές αντιοξειδωτικές και βιολογικές δράσεις σε σύγκριση με τα άλλα δυο. Στην συνέχεια το επιλεγμένο δείγμα υποβλήθηκε σε περαιτέρω χημική μελέτη, με σκοπό την απομόνωση και προσδιορισμό της δομής των δευτερογενών μεταβολιτών του. Επίσης έγινε έλεγχος της αντιμικροβιακής, αντιοξειδωτικής και αντιχολινεστερασικής δράσης των εκχυλισμάτων του.

## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# 1. ΜΕΛΙΣΣΑ

## 1.1 Είδη μέλισσας

Οι κοινές δυτικές μέλισσες είναι έντομα του είδους *Apis mellifera* L. (μέλισσα η μελιτοφόρος). Απαντώνται στην Ευρώπη, Μέση Ανατολή και Αφρική, ωστόσο τον τελευταίο αιώνα, λόγω της οικονομικής σπουδαιότητας των μελισσοκομικών προϊόντων, έχουν ανθρωπογενώς εξαπλωθεί σε ολόκληρο τον κόσμο. Υπάρχουν τουλάχιστον 20 υποείδη αυτού του είδους. Συγκροτούν κοινωνίες (κυψέλες) χιλιάδων ατόμων (σμήνος). Η δομή μίας κυψέλης αποτελείται από μια βασίλισσα, πάνω από 60.000 εργάτριες μέλισσες (μη αναπαραγωγικά θηλυκά) και γύρω στους 1.000 κηφήνες (αρσενικές μέλισσες) (Δερματόπουλος, 1984).

Πίνακας 1: συστηματική κατάταξη της μέλισσας

<b>Βασίλειο</b>	<b>Animalia</b>
<b>Φύλλο</b>	Arthropoda
<b>Κλάση (Classis)</b>	Insecta
<b>Τάξη ( Ordo)</b>	Hymenoptera
<b>Οικογένεια (Familia)</b>	Apiidae
<b>Γένος (Genus)</b>	<i>Apis</i>
<b>Είδος (Species)</b>	<i>Apis mellifera</i>



Εικόνα 1: σύγκριση μεγέθους εργάτριας, κηφήνα και βασίλισσας

### ***Εργάτρια μέλισσα***

Είναι τα μη αναπαραγωγικά θηλυκά (ατελή) της κυψέλης. Είναι υπεύθυνες για όλες τις εργασίες μέσα και έξω από την κυψέλη, εκτός της αναπαραγωγής. Αναλόγως της ηλικίας τους, διακρίνονται σε νεαρές εργάτριες (1 έως 12 ημερών), στις μέσης ηλικίας (12-20 ημερών) και

στις μεγαλύτερης ηλικίας εργάτριες (περισσότερο από 20 ημερών). Κάθε εργάτρια μέλισσα εκτελεί συγκεκριμένο έργο που καθορίζεται από την ηλικία της. Οι νεαρές εργάτριες είναι επιφορτισμένες με το βασικό έργο της παραγωγής του βασιλικού πολτού. Ο βασιλικός πολτός παράγεται από την 5<sup>η</sup> ως την 12<sup>η</sup> ημέρα της ζωής τους όπου και έχουν ανεπτυγμένους τους υποφαρυγγικούς και σιαγονικούς αδένες, οι οποίοι αργότερα ατροφούν. Επιπρόσθετα ταΐζουν τις προνύμφες του γόνου με βασιλικό πολτό και φροντίζουν την βασίλισσα. Οι εργάτριες 12-20 ημερών παράγουν κερί έχοντας πιο ανεπτυγμένους τους αντίστοιχους αδένες. Γι αυτό το λόγο ασχολούνται με εργασίες εντός της κυψέλης όπως: κτίζουν τις κερήθρες με το κερί που παράγουν, φράζουν τις χαραμάδες με πρόπολη, αποθηκεύουν τη γύρη και το νέκταρ που φέρνουν οι συλλέκτριες, αερίζουν κουνώντας τα φτερά τους το εσωτερικό της κυψέλης και προστατεύουν την είσοδο της κυψέλης από ξενιστές. Οι μεγαλύτερης ηλικίας εργάτριες (20-30 ημερών ή περισσότερο) καλούνται συλλέκτριες και κάνουν εξωτερικές εργασίες, όπως ο εφοδιασμός της κυψέλης με νέκταρ, γύρη, πρόπολη και νερό. Επιπρόσθετα, παράγουν ένζυμα χρήσιμα για τη μετατροπή του νέκταρος σε μέλι, και της γύρης των φυτών σε γύρη μελισσών και ψωμί μελισσών (beebread).

### ***Κηφήνας***

Είναι οι αρσενικές μέλισσες της κυψέλης. Η κατασκευή τους δεν τους επιτρέπει τη συλλογή νέκταρος, καθώς δεν διαθέτουν αρκετά μακριά προβοσκίδα. Επίσης δεν μπορούν να συλλέξουν γύρη, καθώς τα πόδια τους δεν έχουν την κατασκευή των εργατριών με τους υποδοχείς γύρης (corbiculae). Τέλος οι κηφήνες δεν έχουν κεντρί και κηροποιούς αδένες.

Γεννιούνται την Άνοιξη 24 ημέρες μετά την ωοτοκία και πεθαίνουν πριν το Χειμώνα. Οι κηφήνες τρέφονται από τις εργάτριες στην αρχή της ζωής τους κι ενώ έχουν την ικανότητα στην ηλικία των 4 ημερών να παίρνουν μόνοι τους την τροφή, προτιμούν να τρέφονται από τις εργάτριες (Lieselotte, 1998). Τρέφονται με νέκταρ (όχι με μέλι) που μόλις μάζεψαν οι μέλισσες και το εναπόθεσαν στα κελιά της κερήθρας. Αυτό εξηγεί γιατί οι κηφήνες εμφανίζονται την εποχή της ανθοφορίας και εξαφανίζονται την εποχή που σταματά η ανθοφορία ανεξάρτητα κι αν είναι η κυψέλη γεμάτη με μέλι (Δερματόπουλος Β., 1984). Επιπρόσθετες εργασίες που συμμετέχουν οι κηφήνες είναι η αντικατάσταση των εργατριών κατά την επώαση του γόνου, έτσι εκείνες γίνονται διαθέσιμες για άλλες δουλειές, και ο διαμοιράσμός του νέκταρος (Lieselotte, 1998).

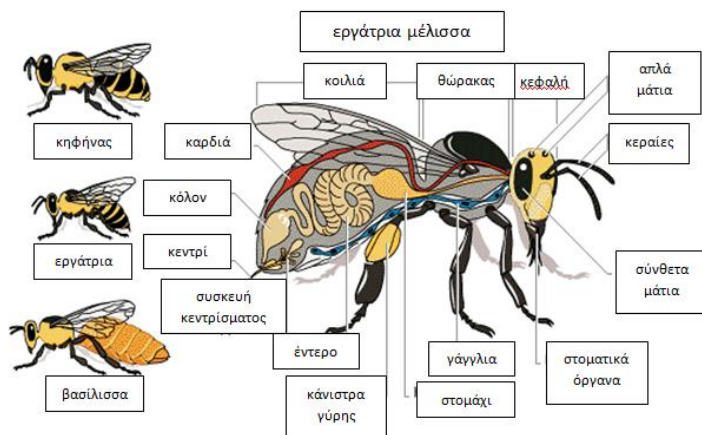
### ***Βασίλισσα***

Είναι το μόνο τέλειο θηλυκό, ικανό για τη λειτουργία της αναπαραγωγής. Δεν έχει συλλεκτήρες γύρης στα πόδια της, ούτε αδένες παραγωγής κεριού στην κοιλιά της. Το κεντρί της είναι γυριστό και σχεδόν ποτέ δεν το χρησιμοποιεί εναντίον ανθρώπων αλλά μόνο εναντίον άλλης βασίλισσας. Η γονιμοποίηση της βασίλισσας γίνεται μια φορά από έναν κηφήνα για όλη τη διάρκεια της ζωής της. Η ωοτοκία αρχίζει 2-5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Η γόνιμη

Βασίλισσα γεννά περίπου 2.500 αυγά κάθε μέρα και αποθέτει ένα αυγό στο βάθος κάθε κελιού. Από τα αυγά αυτά θα προκύψουν αρσενικές μέλισσες ή θηλυκές μέλισσες. Οι αρσενικές μέλισσες δηλαδή οι κηφήνες προκύπτουν από αυγά τα οποία δεν περιέχουν σπερματοζώαρια οπότε δεν γίνεται γονιμοποίηση των ωαρίων (παρθενογένεση). Οι θηλυκές μέλισσες προκύπτουν από αυγά που φέρουν σπερματοζώαρια, από τα οποία το ένα θα εισχωρήσει από τη μικροπύλη και θα επέλθει η γονιμοποίηση του αυγού. Οι θηλυκές μέλισσες διακρίνονται σε τέλεια θηλυκά (βασίλισσες) ή ατελή (εργάτριες), ανάλογα με την τροφή που θα δεχθούν οι νεαρές προνύμφες και το είδος του κελιού που θα μεγαλώσουν.

## 1.2 Φυσιολογία της μέλισσας

Το σώμα της μέλισσας αποτελείται από τρία διακριτά μέρη, το κεφάλι, το θώρακα και τη κοιλιά. Στο κεφάλι υπάρχουν οι οφθαλμοί, οι κεραίες και οι γνάθοι. Η θέση των δύο μεγάλων σύνθετων



Εικόνα 2: ανατομία μιας εργάτριας μέλισσας

οφθαλμών που αποτελούνται από 13000 περίπου έδρες είναι στα πλάγια, ενώ οι τρεις ομαλοί οφθαλμοί βρίσκονται στην κορυφή σε τρίγωνο. Οι κεραίες που είναι δύο ευκίνητα αρθρωτά όργανα, είναι υπεύθυνες για την ακοή και την όσφρηση. Η γλώσσα μοιάζει με προβοσκίδα, όταν ηρεμεί είναι περιστρεμμένη σπειροειδώς, ανελίσσεται δε όταν πρόκειται να ρουφήξει το νέκταρ των ανθέων. Ο θώρακας

σηματίζεται με την ένωση τριών δακτυλίων. Τα πόδια που είναι τοποθετημένα επί του θώρακος, σχηματίζονται από αρθρωτά, ανθεκτικά ευκίνητα τεμάχια τα οποία καταλήγουν σε αγκιστροειδή νύχια. Επίσης στο θώρακα είναι τοποθετημένα και τα δύο ζεύγη των πτερύγων. Η κοιλιά, αποτελείται από δακτυλίους και περιλαμβάνει τα όργανα της πέψης, του τραχειακού και αναπνευστικού συστήματος. Η κάτω επιφάνεια των τεσσάρων τελευταίων δακτυλίων φέρει τους κηρογόνους αδένες, εκ των οποίων εξέρχεται το κερί που χρησιμοποιείται για τη κατασκευή των κυψελών. Σε επόμενο κεφάλαιο γίνεται ειδική αναφορά στα ανατομικά της μέλισσας που τη καθιστούν εξαιρετική μεταφορέα γύρης.

## 1.3 Στάδια εξέλιξης της μέλισσας

Όλες οι μελιτοφόρες μέλισσες υφίστανται ολοκληρωτική μεταμόρφωση, περνώντας από 4 στάδια, αυτό του αυγού, της προνύμφης, της νύμφης και της ενήλικης μέλισσας. Το μεγαλύτερο χρόνο για τη μετάβαση αυτών των σταδίων απαιτεί ο κηφήνας (24 μέρες), ακολουθούμενο από τις εργάτριες (21 μέρες), ενώ η βασίλισσες έχουν τη γρηγορότερη εξέλιξη (15-16 μέρες). Η βασίλισσα μέλισσα από την εργάτρια διαφέρουν και στην συνολική διάρκεια ζωής τους.

Συγκεκριμένα οι εργάτριες ζουν 1-2 μήνες, ενώ η βασίλισσα ζει 4-5 χρόνια (35 φορές περισσότερο από τις εργάτριες).



Εικόνες 3-5: τα στάδια ζωής μια μέλισσας, προνύμφη, νύμφη ενήλικας

#### 1.4 Βιολογία της μέλισσας

Η συνοχή της κυψέλης εξαρτάται από την αποτελεσματική επικοινωνία των μελών της. Οι μέλισσες επικοινωνούν εντός της κυψέλης κυρίως μέσω χημικών σημάτων που ονομάζονται φερομόνες. Οι εργαζόμενοι, οι κηφήνες και οι βασίλισσες έχουν διάφορους αδένες που παράγουν φερομόνες. Μια από αυτές είναι η φερομόνη που παράγει η βασίλισσα από τον υπογονάθιο αδένα της και πιστοποιεί την παρουσία της βασίλισσας. Επίσης, η φερομόνη που εκκρίνεται κατά την περίοδο της γέννησης, σηματοδοτεί τον τύπο φροντίδας που απαιτείται από τις εργάτριες μέλισσες στην κυψέλη.



Εικόνα 6: εργάτρια μέλισσα του είδους *Apis mellifera* L., εκθέτει τον αδένα που βρίσκεται στην άκρη της κοιλίας της, καθώς εκκρίνει την φερομόνη *Nasanon* ενώ ταυτόχρονα ανεμίζει τα φτερά της, καθώς η κυψέλη έχει διαταραχθεί από το άνοιγμα του καλύμματός της

Σημαντική είναι και η φερομόνη *Nasanon* (Εικόνα 6) την οποία εκκρίνουν οι εργάτριες και επιτρέπει τον εντοπισμό της κυψέλης από άλλες εργάτριες που έχουν απομακρυνθεί κατά τη διάρκεια κάποιας ενόχλησης.

Μία από τις πιο αξιοσημείωτες δράσεις της μέλισσας είναι το κέντρισμα (τσίμπημα). Το κέντρισμα είναι ένας αμυντικός μηχανισμός που χρησιμοποιούν οι μέλισσες για να προστατεύσουν την κυψέλη. Όταν εντοπιστεί ένας εισβολέας, οι μέλισσες φρουροί απελευθερώνουν μια φερομόνη συναγερμού για ολοκληρή τη κυψέλη. Επιπλέον, όταν μια μέλισσα χρησιμοποιήσει το κεντρί της, απελευθερώνει φερομόνη για να προσελκύσει περισσότερες μέλισσες να επιτεθούν στο ίδιο σημείο. Όλες οι εργάτριες μέλισσες πεθαίνουν μετά από το κέντρισμα, γιατί και οι ευρωπαϊκές μέλισσες σπάνια τσιμπάνε χωρίς πρόκληση.



Το φυσικό φαινόμενο κατά το οποίο ένα μελίσι χωρίζεται σε δύο μέρη, ονομάζεται σμηνουργία. Ένα μέρος του πληθυσμού εγκαταλείπει οριστικά την κυψέλη μαζί με τη βασίλισσα προκειμένου να δημιουργήσει νέα κυψέλη. Στην παλιά κυψέλη, ο πληθυσμός που μένει πίσω φτιάχνει νέα βασίλισσα. Η σμηνουργία είναι ο φυσικός τρόπος πολλαπλασιασμού του μελισσιού. Είναι για τις μέλισσες απαραίτητη για την επιβίωση και διαίωσή τους. Το φαινόμενο της σμηνουργίας διαρκεί περίπου 10-20 λεπτά. Οι ευρωπαϊκές μέλισσες τυπικά σμηνουργούν την άνοιξη και τις αρχές του καλοκαιριού, όταν η γύρη και το νέκταρ είναι άφθονα. Το υπόλοιπο διάστημα της άνοιξης και του καλοκαιριού είναι αφιερωμένο στη συλλογή και την αποθήκευση προμηθειών από νέκταρ και γύρη που απαιτούνται για την επιβίωση κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου και του χειμώνα.

## **1.5 Προϊόντα μέλισσας**

### ***Μέλι***

Το μέλι είναι ένα βιολογικό προϊόν το οποίο παρασκευάζουν οι μέλισσες από τα άνθη των φυτών. Είναι ένα αρωματικό, υψηλού ιξώδους, γλυκό υγρό με πρώτη ύλη κυρίως το νέκταρ των ανθών το οποίο οι μέλισσες επεξεργάζονται και εμπλουτίζουν με άλλες ουσίες και ένζυμα. Έτσι, μεταβάλλεται σε ένα πυκνότερο υγρό πριν το αποθηκεύουν στις κηρήθρες τους. Ο σκοπός της παραγωγής του μελιού από την μέλισσα είναι για την τροφή της. Το μέλι είναι το βασικότερο των προϊόντων της κυψέλης. Θεωρείται μια μακροβιοτική τροφή με εξαιρετικές θρεπτικές και θεραπευτικές ιδιότητες σε σωματικό και πνευματικό επίπεδο. Αποτελείται από περισσότερα από 180 συστατικά. Το μέλι ήταν γνωστό από την αρχαιότητα και μέχρι σχετικά πρόσφατα αποτελούσε τη μοναδική γλυκαντική ουσία. Κατά το μεσαίωνα η ζάχαρη ήταν διαδεδομένη μονάχα στις υψηλότερες κοινωνικές τάξεις, όντας εισαγόμενη από τη Βεγγάλη και τη νότια Αμερική και ακριβή. Μόνο αφότου ο Ναπολέων απέκλεισε την Ευρώπη το 1806 υπήρξε ενδιαφέρον για τη βιομηχανική παραγωγή της ζάχαρης.

### ***Πρόπολη***

Η πρόπολη προέρχεται από μια ρητινώδη ουσία που εκκρίνουν τα δέντρα προκειμένου να προστατεύσουν τους βλαστούς τους, την οποία η μέλισσα την επεξεργάζεται προσθέτοντας γύρη, κερί και ένζυμα. Η κύρια χρήση της είναι η σφράγιση των κενών της κυψέλης και η δημιουργία των κατάλληλων συνθηκών στα κελιά ώστε η βασίλισσα να μπορεί να εναποθέσει εκεί τα αυγά της, προστατευμένα από μικρόβια και παράσιτα. Έχει ισχυρές αντιϊκές και αντιμικροβιακές ιδιότητες.

### ***Κερί***

Το κερί μελισσών είναι ένας φυσικός κήρος που παράγεται από τους κηρογόνους αδένες της μέλισσας που βρίσκονται στην κάτω κοιλιακή της χώρα και το εκκρίνει σε λεπτές νιφάδες εναποθέτοντας το στην κυψέλη. Εκεί οι εργάτριες μέλισσες το χρησιμοποιούν για τη κατασκευή των εξαγωνικών κελιών, στα οποία αποθηκεύεται το μέλι, η γύρη και ο βασιλικός πολτός.

Επίσης, μαζί με την πρόπολη χρησιμεύει για την επιδιόρθωση ρωγμών και οπών που ενδεχομένως έχει η κυψέλη.



**Εικόνα 7:** δημιουργία κήρου στους κηρογόνους αδένες της μέλισσας

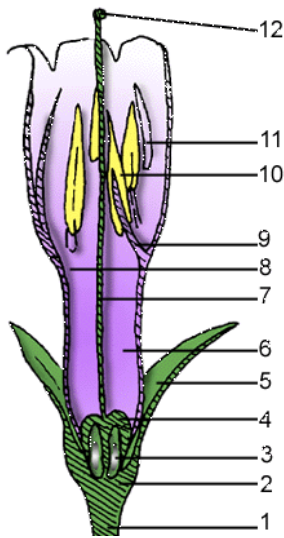
### ***Βασιλικός πολτός***

Ο βασιλικός πολτός είναι κρεμώδης ουσία που παράγεται από τους υποφαρυγγικούς αδένες των εργατριών μελισσών. Αποτελεί τη κύρια τροφή της μέλισσας που προορίζεται να γίνει βασίλισσα. Είναι πλούσια πηγή βιταμινών, αμινοξέων και ανόργανων στοιχείων, ενώ χρησιμοποιείται κυρίως ως τονωτικό.

## 2. ΓΥΡΗ ΦΥΤΩΝ

### 2.1 Ορισμός

Τα αρσενικά κύτταρα αναπαραγωγής των σπερματοφύτων είναι γνωστά ως γυρεόκοκκοι. Το σύνολο των γυρεόκοκκων ενός άνθους αποτελούν τη γύρη. Οι γυρεόκοκκοι απαντώνται στους στήμονες των φυτών που έχουν άνθη, οι οποίοι είναι τα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα, ενώ τα καρπόφυλλα είναι τα θηλυκά. Στους στήμονες υπάρχει μια διόγκωση, η οποία ονομάζεται ανθήρας και περιέχει τους γυρεόσακους, εντός των οποίων αποθηκεύονται οι γυρεόκοκκοι. Η γύρη έχει δυο κύριες λειτουργίες, η μια είναι να δώσει τον πυρήνα του αρσενικού κυττάρου για το σχηματισμό του εμβρύου, και η δεύτερη να ξεκινήσει μια σειρά από φυσικές διεργασίες.



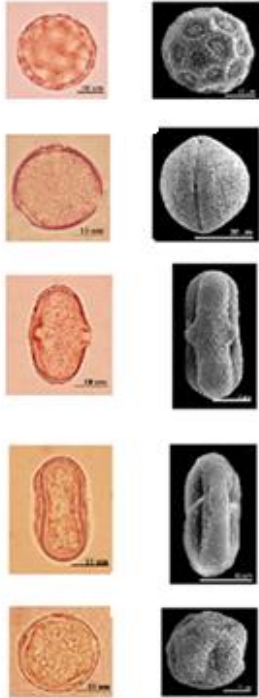
**Εικόνα 8:** 1. Ποδίσκος  
2.Κάλυκας. 3.Ωοθήκη.  
4.Υπερος. 5. Στέπαλα.  
6.Πέταλα.7. Στύλος.  
8.Στεφάνη. 9. Νήμα  
(Στήμονας). 10. Ανθήρας.  
11.Γυρεόσακος.12. Στίγμα

Με την επικονίαση (pollination), δηλαδή την διαδικασία μεταφοράς των ώριμων γυρεόκοκκων από τους στήμονες στα ώριμα στίγματα των υπέρων, γίνεται η γονιμοποίηση των ανθών. Η επικονίαση δύναται να γίνει με τη βοήθεια του ανέμου (ανεμόφιλα φυτά), του νερού (υδρόφιλα φυτά) ή με τη βοήθεια των ζώων (ζωόφιλα φυτά). Τα άνθη των ανεμόφιλων φυτών όπως τα αγρωστώδη στερούνται οσμής και νέκταρος, ωστόσο παράγουν μεγάλες ποσότητες γυρεόκοκκων, με ευνοϊκά για τη μεταφορά τους χαρακτηριστικά. Συνήθως χαρακτηρίζονται από πρόωμη άνθηση και έχουν κατάλληλη δομή ώστε να απελευθερώνουν αλλά και να συγκρατούν τους γυρεόκοκκους που μεταφέρονται με τον άνεμο. Στα υδρόφιλα φυτά, η επικονίαση γίνεται με τη βοήθεια του νερού και μπορεί να γίνει στην επιφάνεια του, όσο και κάτω από αυτή. Ωστόσο, στα περισσότερα αγγειόσπερμα, η επικονίαση γίνεται με τη βοήθεια των ζώων. Στις εύκρατες περιοχές τα έντομα είναι οι συνήθεις επικονιαστές, ενώ στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές σημαντικό ρόλο έχουν επίσης τα πτηνά και οι νυχτερίδες.

Τα ζωόφιλα άνθη έχουν δομή που διευκολύνει την επαφή του επικονιαστή με τον ανθήρα και το στίγμα, προκειμένου να προσκολληθούν στο σώμα του οι γυρεόκοκκοι από τον ανθήρα και στη συνέχεια να μεταφερθούν στο στίγμα ενός άλλου άνθους. Για τη διευκόλυνση της επικονίασης, τα άνθη πρέπει να έχουν χαρακτηριστικά τα οποία να προσελκύουν τα κατάλληλα ζώα, όπως έντονα χρώματα, χαρακτηριστική οσμή, συμμετρικά άνθη και ορισμένο μέγεθος. Ανάλογα με την όραση του επικονιαστή είναι τα χρώματα του άνθους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, η αδυναμία της μέλισσας να διακρίνει το κόκκινο χρώμα, έτσι κόκκινα άνθη δεν απαντώνται συχνά στην ευρωπαϊκή χλωρίδα. Αντιθέτως, διακρίνουν το υπεριώδες, το κίτρινο και το κυανό. Παράδειγμα άνθους το οποίο προσελκύει τις μέλισσες μέσω της αντανάκλασης υπεριώδους ακτινοβολίας, είναι το κόκκινο άνθος των φυτών *Papaver*.

## 2.2 Δομη γυρεόκοκκου

Το μέγεθος ενός γυρεόκοκκου είναι συνήθως 2,5-250μm. Περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα δύο στιβάδων, με την εξωτερική στοιβάδα να ονομάζεται εξίνη και να αποτελείται από την εκτοεξίνη και την ενδοεξίνη, ενώ η εσωτερική στοιβάδα ονομάζεται εντίνη. Η εξίνη η οποία αποτελείται κυρίως από σπορογυρίνη, είναι ιδιαίτερα ανθεκτική έναντι χημικών και φυσικών παραγόντων. Η εσωτερική στοιβάδα της εντίνης αποτελείται κυρίως από ένα λεπτό στρώμα κυτταρίνης – πηκτίνης.



**Εικόνα 9:** εικόνες γυρεόκοκκων σε οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Τα χαρακτηριστικά του τοιχώματος των γυρεόκοκκων ποικίλουν σε κάθε φυτό, καθιστώντας τα σε ένα σημαντικό ταξινομικό κριτήριο. Καθώς τα τοιχώματα είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά ,διατηρούνται σε παλαιά γεωλογικά στρώματα. Η μελέτη των απολιθωμένων γυρεόκοκκων ονομάζεται παλαιοπαλυνολογία (paleopalynology) και εντάσσεται στα πλαίσια της επιστήμης της παλαιοβοτανικής. Αυτή η γνώση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στους αρχαιολόγους, ιδιαίτερα στις ανασκαφές, για τον προσδιορισμό φυτικών ειδών που έχουν εξαφανιστεί ή έχουν χρησιμοποιηθεί σε παλιότερες εποχές ή έχουν βρεθεί σε τρόφιμα και αμφορείς. Μια πρόσφατη σχετική μελέτη αναφέρεται στους γυρεόκοκκους που βρέθηκαν στη ιερά σινδόνη του Τορίνο (Boi, 2016).

Το τοίχωμα ενός γυρεόκοκκου οφείλει να προστατεύει το πρωτόπλασμα από αφυδάτωση κατά τη μεταφορά, ενώ είναι υπεύθυνο για τις αντιδράσεις αναγνώρισης του γυρεόκοκκου από το στίγμα δεκτικού άνθους, μέσω μεταφοράς χημικών ενώσεων στην επιφάνεια του. Το τοίχωμα πρέπει να επιτρέπει τη χαλαρή προσκόλληση του γυρεόκοκκου στους επικονιαστές ώστε να μεταφέρεται ευκολότερα ,όπως και να δύναται να προσκολληθεί ακολούθως στο στίγμα. Αυτό επιτυγχάνεται με μια επίστρωση κολλώδους ουσίας, καθώς και με την ύπαρξη πόρων και αύλακων στην επιφάνεια των γυρεόκοκκων (Couto et al, 2006).

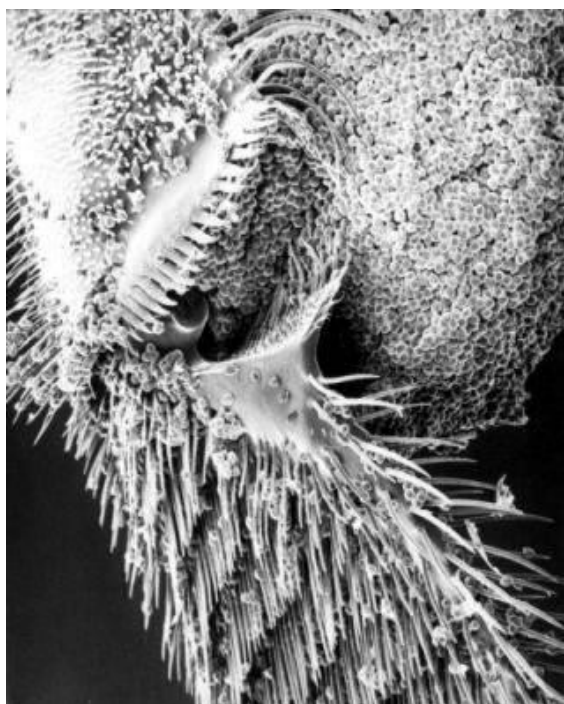
Αναλόγως της φυτικής προέλευσης, οι γυρεόκοκκοι μπορεί να διαφέρουν ως προς το χρώμα και το σχήμα. Συνήθως το σχήμα είναι κυκλικό, κυλινδρικό, τριγωνικό ή αγκαθωτό (Shubharani et al, 2013).

Εντός του γυρεόκοκκου απαντάται πλήθος αποταμιευτικών ουσιών όπως άμυλο, σάκχαρα ή έλαια, που υποβοηθούν τη βλάστηση του γυρεόκοκκου. Περισσότερο άμυλο (έως και 18%) έχουν οι γυρεόκοκκοι που μεταφέρονται με τον άνεμο (Schmidt and Buchmann,1992), ενώ όταν χρησιμοποιούνται επικονιαστές που τρώνε γύρη, υπάρχουν έλαια ή σάκχαρα. Όταν για την επικονίαση απαιτούνται μεγάλες αποστάσεις ως την σπερματική βλάστη ή όταν είναι αναγκαίο ένα μεγάλο χρονικό διάστημα επιβίωσης του γυρεόκοκκου στο περιβάλλον, τότε παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση ελαίων σε αυτούς (Γαλάτης et al, 1998).

### 3. ΓΥΡΗ ΜΕΛΙΣΣΩΝ

#### 3.1 Εισαγωγικά

Οι μέλισσες συλλέγουν τους γυρεόκοκκους από τα άνθη με τη βοήθεια του τριχώματος τους, που καλύπτει μεγάλο μέρος του σώματός τους. Στη συνέχεια, η ευρηματική κατασκευή των οπίσθιων ποδιών τους επιτρέπει τη γρήγορη συγκέντρωση της γύρης στα ειδικά κάμιστρα γύρης (corbiculae). Αυτά βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια των πίσω ποδιών τους. Συνήθως, προκειμένου οι κόκκοι γύρης να συγκρατηθούν καλύτερα μεταξύ τους αλλά και πάνω στο τριχωτό της μέλισσας, αναμιγνύονται με νέκταρ από τα λουλούδια ή μέλι που έχουν αναμασήσει. Με αυτό τον τρόπο εκατοντάδες γυρεόκοκκοι πακετάρονται σε δύο σφαιρίδια γύρης. Μια μέλισσα σπάνια επισκέπτεται πάνω από ένα είδος λουλουδιού στη διάρκεια ενός ταξιδιού, και, καθώς σε κάθε ταξίδι μπορεί να μεταφέρει μόνο δυο σφαιρίδια γύρης, συνήθως τα σφαιρίδια αποτελούνται από ένα ή λίγα διαφορετικά είδη γύρης (Winston, 1991).



**Εικόνα 10:** μεγέθυνση από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των οπίσθιων ποδιών μιας μέλισσας. Το κάτω τμήμα του ποδιού αποτελείται από τη βούρτσα γύρης. Η άρθρωση μεταξύ των τμημάτων των ποδιών χρησιμεύει για το πακετάρισμα της γύρης και την ώθηση προς τα έξω, σχηματίζοντας έτσι το τυπικό σφαιρίδιο γύρης

Τα σφαιρίδια γύρης στη συνέχεια μεταφέρονται στη κυψέλη όπου, αφού αναμιχθούν με μέλι, άλλες ουσίες και ένζυμα που εκκρίνουν οι μέλισσες, αποθηκεύονται στα κελία της κυψέλης.

Η γύρη η οποία είναι αποθηκευμένη στη κυψέλη καλείται **ψωμί μέλισσας (bee bread)** και υφίσταται γαλακτική ζύμωση αμέσως μετά την τοποθέτηση της εκεί προκειμένου να διατηρηθεί αναλλοίωτη. Η ζύμωση αυτή εμπλουτίζει τη γύρη με νέα συστατικά και ταυτόχρονα τη καθιστά πιο εύπεπτη. Γύρη η οποία δεν έχει υποστεί αυτή τη διαδικασία, χάνει πολύ γρήγορα τα θρεπτικά συστατικά της. Αντίθετα, το ψωμί γύρης είναι πολύ ανθεκτικό και μπορεί να αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς σημαντική αλλοίωση των ιδιοτήτων του. Το ψωμί μέλισσας είναι η τροφή που δίνεται στις προνύμφες των μελισσών και στις εργάτριες μέλισσες που παράγουν το βασιλικό πολτό. Εμπορικά, συχνά, ως bee bread κυκλοφορεί η κερήθρα με μέλι και γυρεόκοκκους μαζί. (Kaplan et al., 2016, Pascoal et al., 2014).



**Εικόνες 11-12:** γυρεόκοκκοι πάνω στο τρίχωμα της μέλισσας. Μέλισσα μεταφέρει 2 σφαιρίδια γύρης.

Ο κλάδος της γυρεολογίας που μελετά τη βοτανική και γεωγραφική προέλευση του μελιού και άλλων προϊόντων της μελισσοκομίας (πρόπολη, βασιλικός πολτός), ονομάζεται μελισσογυρεολογία (melissopalynology) και βασίζεται στη μικροσκοπική ανάλυση των γυρεοκόκκων που εντοπίζονται μέσα σε αυτά τα προϊόντα.



**Εικόνα 13:** γύρη μελισσών διαφορετικής φυτικής προέλευσης. Το χρώμα μπορεί να διαφέρει από ανοιχτό κίτρινο έως μαύρο (Dutsova, 2009)

### 3.2 Χημική σύσταση γύρης μελισσών

Περισσότερες από 200 ουσίες έχουν ανιχνευτεί στη γύρη. Τα κύρια συστατικά της είναι πρωτεΐνες, αμινοξέα, υδατάνθρακες, σάκχαρα, λιπίδια, λιπαρά οξέα φαινολικά παράγωγα, ένζυμα, συνένζυμα και βιταμίνες, όπως και άλλα βιοδραστικά μόρια (Campos, 2008). Καθώς η γύρη μπορεί να προέρχεται από διαφορετικά φυτικά είδη, είναι επόμενο να υπάρχει μεγάλη διακύμανση στη συγκέντρωση κάποιων συστατικών της. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, όπου ενώ έχουν αναφερθεί δείγματα με συγκέντρωση 40%, ενώ οι τυπικές τιμές είναι από 7.5-35%. Ένας πίνακας με μέσες τιμές περιεκτικότητας των συστατικών

της γύρης μελισσών (αποξηραμένης), καθώς και της διατροφικής τους σημασίας, είναι ο Πίνακας 2 (Campos et al., 2010)

**Πίνακας 2:** κύρια συστατικά γύρης

<b>Κύρια συστατικά</b>	<b>Περιεκτικότητα(γρ/100γρ)</b>	<b>ΣΗΔ(γρ/μέρα)</b>
Υδατάνθρακες(γλυκόζη, φρουκτόζη,σουκρόζη, κλπ)	13-55	320
φυτικές ίνες	0,3-20	30
Πρωτεΐνες	10-40	50
λίπη	1-13	80

Όπως είναι λογικό, διαφορές στη συγκέντρωση υπάρχουν και μεταξύ της γύρης μελισσών και της γύρης που έχει συλλεχθεί από τα φυτά, όπως φαίνεται στον πίνακα 3 (Tabio et al.,1988, Crane, 1990)

**Πίνακας 3:** σύγκριση σύστασης μεταξύ γύρης μελισσών και γύρης φυτών

<b>Κύρια Συστατικά</b>	<b>Γύρη μελισσών</b>	<b>Γύρη φυτών</b>
Νερό (ξηράνση με αέρα)	10%	10%
Ακατέργαστες πρωτεΐνες	20%	20%
Στάχτη	3%	4%
Εκχύλισμα αιθέρα (ακατέργαστα λίπη)	5%	5%
Ανηγμένα σάκχαρα	26-36%	3%
Μη ανηγμένα σάκχαρα	1-3%	8%
άμυλο	0-3%	8%
Μη προσδιορισμένα συστατικά	28%	43%

**Πίνακας 4:** χημική σύσταση γύρης μελισσών

<b>Συστατικά</b>	
Φλαβονοειδή	Τουλάχιστον 8, αναλόγως της γύρης
Καροτενοειδή	Τουλάχιστον 11
Τερπένια	Τριτερπένια(ολεανολικά οξέα, ουρσολικό οξύ)
Βιταμίνες	C,E, σύμπλεγμα B (νιασίνη, ριβοφλαβίνη, βιοτίνη, παντοθενικό οξύ, πυριδοξίνη)
Μέταλλα και ιχνοστοιχεία	Κυρίως K, Na, Ca, Mg, P,S. Σε ίχνη Al, B, Cl, Cu, I, Fe, Mn, Ni, Si, Ti, Zn.
Ελεύθερα αμινοξέα	όλα
Νουκλεϊκά οξέα και νουκλεοσίδες	DNA, RNA και άλλα
Ένζυμα	Περισσότερα από 100
Αυξητικοί παράγοντες	Αυξίνες, γιββερελλίνες, κυτοκίνες, αναστολείς ανάπτυξης

### **Υδατάνθρακες**

Είναι κυρίως πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο, καλλόζη, πηκτίνη, κελλουλόση, λιγνίνη, σποροπολλενίνη και άλλα δομικά στοιχεία του κυτταρικού τοιχώματος των γυρεόκοκκων (Stanley,1974; Crane, 1990)

### **Σάκχαρα**

Τα σάκχαρα φρουκτόζη, γλυκόζη και σουκρόζη αντιπροσωπεύουν το 90% των μονοσακχαριτών που βρίσκονται στη γύρη.(Bonvehí,1986).Ενδιαφέρον παρουσιάζει μελέτη που αναλύει δείγματα γύρης από τη Βραζιλία, της οποίας η συλλογή έχει γίνει από μέλισσες του είδους *Melipona subnitida*, και στα οποία κυρίαρχο σάκχαρο είναι η μαννιτόλη, κατάλληλο γλυκαντικό για διαβητικούς (Silva et al.,2006,2014). Δεν είναι δυνατή η ταξινόμηση της γύρης με βάση τις διαφοροποιήσεις της περιεκτικότητας σε κάθε σάκχαρο, αν και γενικά, η φρουκτόζη ανευρίσκεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από την γλυκόζη (Saa-Oterro et al., 2000).

### **Φυτικές ίνες**

Το περιεχόμενο της γύρης σε φυτικές ίνες μπορεί να διαφέρει αρκετά, τόσο λόγω της μεθόδου που χρησιμοποιείται για το προσδιορισμό του, όσο και λόγω της βοτανικής προέλευσής της. Ο μέσος όρος εμπορικών δειγμάτων από την Ελβετία και τη Γαλλία κυμαίνεται μεταξύ 9 και 15 gr/100gr.

### **Πρωτεΐνες**

Η γύρη περιέχει περισσότερο από 20% κατά μέσο όρο πρωτεϊνικό φορτίο, συμπεριλαμβανομένων των βασικών αμινοξέων (περίπου 10%) όπως μεθειονίνη, λυσίνη, θρεονίνη, κιστιδίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, βαλλίνη, φανυλαλλανίνη και τρυπτοφάνη. Αυτά είναι βασικά αμινοξέα, τα οποία ο ανθρώπινος οργανισμός δε μπορεί να παράγει και από τα οποία το πιο σύνηθες ανιχνεύσιμο στη γύρη είναι η προλίνη, ακιλουθούμενο από τη σερίνη. Το άθροισμά τους συνήθως υπερβαίνει το 50% των συνολικών αμινοξέων που υπάρχουν στη γύρη. Δείγματα από την Πολωνία, νότια Κορέα και Κίνα έδειξαν υψηλή συγκέντρωση σε γλουταμικό οξύ, προλίνη, ασπαρτικό οξύ, λευκίνη και λυσίνη (Szczena, 2006). Επίσης, πολλά πρωτεϊνικής φύσεως ένζυμα έχουν ανιχνευτεί στη γύρη, όπως η οξειδάση της γλυκόζης, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση του μελιού. Αυτό το ένζυμο προστίθεται στη γύρη από τις μέλισσες κατά τη συλλογή της γύρης, γι αυτό βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο ψωμί μελισσών παρά στα σφαιρίδια γύρης. Οι μέλισσες δείχνουν προτίμηση στη συλλογή γύρης πλούσιας σε πρωτεΐνες (Rasheen & Harden,1997). Έχει παρατηρηθεί συσχέτιση του πρωτεϊνικού περιεχομένου της γύρης με την ανάπτυξη των υποφαρυγγικών αδένων στις προνύμφες της μέλισσας (Standifer,1967).



### **Λιπίδια-λιπαρά οξέα**

Σε δείγματα γύρης από την Πολωνία, το λιπιδικό κλάσμα (επί ξηρού βάρους) κυμαινόταν από 6.74 - 10.99 %, ενώ αντίστοιχα δείγματα από την Κορέα είχαν περιεκτικότητα 5.5% κατά μέσο όρο. Δείγματα από την Κίνα περιείχαν 6.2%. Σε γύρη έχουν ανευρεθεί μυριστικό οξύ(C14), παλμιτικό, στεατικό, ελαϊκό, α-λινολενικό, αραχιδονικό, βεχενικό και λιγνοσερικό οξύ. Στα περισσότερα δείγματα, το κυριότερο λιπαρό οξύ είναι το α-λινολενικό (43%)(Ω-3), ακολουθούμενο από το παλμιτικό(28%) και το λινελαϊκό (14%) (Muniategui et al., 1989, Szczesna, 2006).

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν συνήθως το 50 – 67 % των συνολικών λιπαρών οξέων σε ένα δείγμα γύρης.. Καθώς η παρουσία ακόρεστων λιπαρών οξέων, τόσο Ω-3 όσο και Ω-6 είναι πολύ σημαντική για τη βιολογική δράση του δείγματος (Rutkova, 1981; Wolski et al., 2004), έχει προταθεί η χρήση του δείκτη ακόρεστων/κορεσμένων λιπαρών οξέων (UFA/SFA) ως καθοριστικού δείκτη ποιότητας ενός δείγματος γύρης. Η σχέση αυτή επηρεάζεται όχι μόνο από το φυτικό είδος προέλευσης της γύρης και τη γεωγραφική του προέλευση, αλλά και από τις συνθήκες ξήρανσης και αποθήκευσης του δείγματος. Δείγματα γύρης μελισσών από τη Πορτογαλία, τα οποία προέρχονταν κυρίως από το γένος *Cistus*, έδειξαν υψηλότερη συγκέντρωση σε λινελαϊκό και εικοσανοϊκό οξύ σε σχέση με γύρη άλλης φυτικής προέλευσης (Feas et al, 2012). Τα φωσφολιπίδια αντιπροσωπεύουν το 1,5% του βάρους της γύρης (Szczesna, 2006).

### **Στερόλες**

Η γύρη περιέχει 0.1-0.4% στερόλες, κυρίως β-σιτοστερόλη, στιγμαστερόλη και φουκοστερόλη, καθώς και 0.1-0.2 % μονοτερπένια (Stanley,1974). Μια ανάλυση δείγματος γύρης κατέδειξε την ύπαρξη 7 στερολών, συμπεριλαμβανομένης της χοληστερόλης, καθώς και μόνο- δι- και τριγλυκερίδιων( Simal et al.,1988).

### **Τερπένια**

Έχει αναφερθεί η ύπαρξη τριτερπενίων όπως ολεανολικά οξέα και 3-ουρσολικό οξύ (Kedzia, 2005).

### **Καροτενοειδή**

Γύρη από τη Βραζιλία είχε σαν κύριο καροτενοειδές το β-καροτένιο (προβιταμίνη Α),σε ποσοστό 17% του συνόλου των καροτενοειδών (Almeida et al.,2005). Ωστόσο, διαφορετικά δείγματα γύρης δύναται να αποκλίνουν σημαντικά στις συγκεντρώσεις των καροτενοειδών. Γαλλικό δείγμα γύρης από *Cistus sp.* είχε εικοσαπλάσια περιεκτικότητα σε καροτενοειδή από δείγμα γύρης καστανιάς (Percie du sept, 2009).

## **Βιταμίνες**

Οι βιταμίνες που περιέχονται στη γύρη συμβάλουν στην υψηλή διατροφική της αξία. Προβιταμίνη Α, βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη), νιασίνη (βιταμίνη Β3) , θειαμίνη, φολικό οξύ και βιοτίνη έχουν ανιχνευτεί σε δείγματα γύρης Σε σύγκριση με φρούτα και λαχανικά, η γύρη έχει εικοσαπλάσια περιεκτικότητα σε βιταμίνη Α, και σημαντικά μεγαλύτερη σε παντοθενικό οξύ, βιοτίνη και φολικό οξύ (Oliveira et al., 2009).

Ίχνη βιταμίνης D καθώς και μεταβολιτών της έχουν βρεθεί σε γύρη από *Pinus nigra* και *Pinus sylvestris* L. (Saden-Krehulia, 1987).

Δείγματα γύρης από την Κίνα είχαν συγκέντρωση συνένζυμου Q από 0-193 mg/kg (Xue et al., 2012). Η συνιστώμενη ημερήσια δόση συνένζυμου Q είναι 50-100mg/μέρα.

## **Πολυφαινολικοί δευτερογενείς μεταβολίτες**

Οι πολυφαινόλες είναι από τα συστατικά που καθορίζουν κυρίως την αντιοξειδωτική δράση της γύρης (Carpes, 2005; Graikou, 2011; Almaraz-Abarca, 2007). Στη γύρη, η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες κυμαίνεται από 3-5% και αποτελεί δείκτη ποιότητας της γύρης (Arraez-Roman, 2007). Με βάση τη δομή τους, οι πολυφαινόλες χωρίζονται δε δυο βασικές κατηγορίες, τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή.

### **α) Φαινολικά οξέα**

Από την κατηγορία των φαινολικών οξέων, τα συνηθέστερα απαντώμενα στη γύρη είναι το χλωρογενικό, το γαλλικό, το φερούλικό, το κινναμωμικό και το καφεϊκό οξύ(Almaraz-Abarca, 2004; Kedzia, 2008). Με δομή φαίνυλοπροπανοειδών έχουν βρεθεί σε γύρη 3,4-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ, 4-υδρόξυ-βενζοϊκό, όπως και 4-υδρόξυ-βενζοϊκος αιθυλεστέρας (Leja, 2007). Επίσης έχει αναφερθεί η παρουσία *ortho* και *para* κουμαρικών οξέων (Almaraz-Abarca, 2004; 2007).

### **β) Φλαβονοειδή**

Οι σημαντικότεροι δευτερογενείς μεταβολίτες της γύρης. Σε αυτούς οφείλει η γύρη τόσο το χρώμα της όσο και τη πικρή της γεύση (Stanley,1974). Η βασική τους δομή αποτελείται από ένα σκελετό βενζο-γ- πυρόνης που δημιουργεί ένα σύστημα δακτυλίων διφαινυλ-προπανίου.

Αναλόγως της δομής, τα φλαβονοειδή που έχουν βρεθεί στη γύρη χωρίζονται σε φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, ανθοκυάνες, ισοφλαβόνες και χαλκόνες.

Η παρουσία διπλού δεσμού C2 και C3 στον C δακτύλιο αυξάνει την αντιοξειδωτική δράση, όπως και η παρουσία καρβονυλίου στη θέση 4 επιτρέπει στο μόριο να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες αυξάνονται με το τη παρουσία υδροξυλίων στο μόριο του φλαβονοειδούς. Η ιδιότητα αυτή των φλαβονοειδών τα καθιστά εξαιρετικά μόρια κατά της οξείδωσης των λιπιδίων (Robak, 1993, Bonvehi, 2001; Evans,1996).

Τα περισσότερα φλαβονοειδή στη γύρη βρίσκονται σε μορφή γλυκοσιδών, δηλαδή ενωμένα με σάκχαρα, με συχνότερα τα παράγωγα φλαβονόλης. Η ύπαρξη γλυκοσιδικού δεσμού μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του μορίου (Cook, 1996).

Τόσο το είδος όσο και η συγκέντρωση των φλαβονοειδών είναι από τα κύρια ταξινομικά κριτήρια ενός δείγματος γύρης, εξαρτώνται κυρίως από το φυτικό είδος προέλευσης και δύναται να υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση αναλόγως του δείγματος. Έχει στηριχθεί η υπόθεση ότι τα ελεύθερα φλαβονοειδή είναι καλύτερος δείκτης ποιότητας ενός δείγματος γύρης, σε σχέση με το περιεχόμενό της σε ελεύθερα αμινοξέα (Bonvehi et al., 2001).

Από τη κατηγορία των φλαβονολών, έχουν ανιχνευθεί: κερκετίνη, καιμπφερόλη και πολλοί γλυκοσίδες τους (Graïkou & Chinou, 2011; Almaraz-Abarca, 2004, 2007; Arraez-Roman, 2007; Bonvehi, 2001; Ceksteryte, 2006). Συνήθως η ρουτίνη είναι το κύριο γλυκοζυλιωμένο φλαβονοειδές (Sierra et al., 2001). Η ρουτίνη είναι ένα μόριο κερκετίνης, ενωμένο στο θέση 3 με γλυκοσιδικό δεσμό, με ένα δισακχαρίτη γλυκόζης-ραμνόςης σε μορφή ρουτινοσίδης. Άλλοι γλυκοσίδες της κερκετίνης που έχουν βρεθεί στη γύρη είναι ο υπεροσίδης (κερκέτινο-3-Ο-γαλακτοσίδης) (Ceksteryte, 2006), η κερκετρίνη (κερκέτινο-3-Ο-ραμνοσίδης) (Almaraz-Abarca, 2007), η ισοκερκετρίνη (κερκέτινο-3-Ο-γλυκοσίδης), ο κερκέτινο-3,7-Ο-διγλυκοσίδης και ο κερκέτινο- 3,7- σοφοροσίδης (Kedzia, 2008, Graïkou, Chinou, 2011).

Άλλα φλαβονοειδή που έχουν βρεθεί σε γύρη είναι η μυρικετίνη και οι γλυκοσίδες της (Bonvehi, 2001), όπως και τρικετίνη (Campos, 2003), ισοραμνετίνη και γαλαντζίνη (Saric, 2009; Almaraz-Abarca, 2007; Ceksteryte, 2006).

Σε δείγμα γύρης από *Rhaphanus raphanistrum* L. ανιχνεύτηκε 8-μεθόξυ-ερμπασετινο-3-Ο-γλυκοσίδης, που θεωρείται χαρακτηριστικό φλαβονοειδές για αυτό το είδος γύρης (Markham, 1996).

Σε δείγμα γύρης από *Crataegus monogyna* Jacq. βρέθηκε 8-μεθόξυ-καιμπφέρολο-3- γλυκοσίδης και καιμπφέρολο-3- νεοεσπεριδοσίδης (Daugnet et al., 1993).

Από τη κατηγορία των φλαβονών έχει βρεθεί ο δευτερογενής μεταβολίτης βιτεξίνη που αποτελεί C-γλυκοσίδης της απιγενίνης, όπως και ο βιτέξινο-Ο-ραμνοσίδης. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν το φλαβονοειδές χρυσίνη αλλά και γλυκοσίδες της λουτεολίνης (Saric, 2009; Arraez-Roman, 2007; Almaraz-Abarca, 2007; Ceksteryte, 2006).

Σε δείγματα γύρης έχουν ταυτοποιηθεί επίσης οι φλαβανόνες νარიγεννίνη και πινοσεμπρίνη (Silva, 2006; Saric, 2009).

Σε πολύ μικρότερες ποσότητες έχουν βρεθεί λευκοανθοκυανιδίνες και κατεχίνες. Συνήθως ανευρίσκονται σε ποσοστό μικρότερο του 0.3%. (Kedzia, 2008). Το συνολικό ποσοστό των φλαβονοειδών κυμαίνεται από 0.25-3% σύμφωνα με τον Bogdanov (2004).

### 3.3 Συλλογή – Φύλαξη – Διάθεση γύρης μελισσών

#### Συλλογή

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην προσεκτική επιλογή της γύρης που θα συλλεχτεί, ώστε να αποφευχθεί μολυσμένη γύρη με φυτοφάρμακα. Για εβδομάδες μετά από ψεκάσμο με φυτοφάρμακα και για μια περιοχή τουλάχιστον 4 χιλιομέτρων περιμετρικά από αυτή, δεν πρέπει να συλλεχθεί γύρη. Έχει αποδειχτεί ότι τα συστηματικά φυτοφάρμακα συγκεντρώνονται αθροιστικά σε γύρη, όπως για παράδειγμα της καρύδας (Rai et al., 1977). Καθώς η γύρη προέρχεται από πολλά φυτά, ακόμα και η ύπαρξη μικρής ποσότητας φυτοφαρμάκου ανά άνθος, μπορεί να οδηγήσει πολύ γρήγορα σε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσής τους στη γύρη. Τα σφαιρίδια γύρης, ακόμα και αν δεν εισέλθουν στην κυψέλη, μπορούν να επιμολυνθούν από φάρμακα που χρησιμοποιούνται για κάποιες ασθένειες της κυψέλης.

Τα σφαιρίδια γύρης απομακρύνονται από τις μέλισσες κατά την είσοδό τους στην κυψέλη, προκειμένου να συλλεχθούν από το μελισσοτρόφο. Υπάρχουν πολλά είδη παγίδων συλλογής γύρης (Εικόνες 14-15). Κάποιες είναι πιο εύκολες στον καθαρισμό και τη συλλογή της γύρης ενώ άλλες είναι πιο αποδοτικές ή



**Εικόνες 14-15:** κλασική γυρεοπαγίδα τοποθετημένη στην είσοδο της κυψέλης. Το προπέτασμα διαμέσω του οποίου πρέπει να περάσουν οι μέλισσες συνήθως είναι από χοντρό πλαστικό φύλλο (τουλάχιστον 3 mm) με οπές διαμέτρου 4,7 mm για ευρωπαϊκές μελισσές και διαμέτρου 4,2 mm για μικρότερες μέλισσες όπως οι αφρικανικές.

ευκολότερες στην εγκατάσταση. Η απόδοση, δηλαδή το ποσοστό της γύρης που αποσπάται από τις μέλισσες σπάνια ξεπερνά

το 50%. Οι μέλισσες βρίσκουν ευρηματικούς τρόπους για να αποφύγουν αυτή την απώλεια, όπως είσοδος στην κυψέλη από μικρές τρύπες ή ακόμα και επανασυλλογή της γύρης από την παγίδα γύρης. Σε μερικές περιπτώσεις η συλλογή γύρης, αναλόγως της μεθόδου συλλογής, μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη της αποικίας των μελισσών αλλά και της παραγωγής μελιού.

Ένα κανονικό σμήνος μελισσών μπορεί να συγκεντρώσει είκοσι κιλά γύρης το χρόνο. Από αυτή την ποσότητα μπορούμε να πάρουμε το 10% περίπου χωρίς επιπτώσεις στο μελίσι.



**Εικόνα 16:** τροποποιημένη γυρεοπαγίδα που επιτρέπει καλύτερο αερισμό και απομάκρυνση της γύρης χωρίς ζημιά για τη κυψέλη.

Η γύρη πρέπει να συλλέγεται καθημερινά σε υγρά κλίματα, αλλά λιγότερο συχνά σε ξηρότερα κλίματα. Για να αποφευχθεί η υποβάθμιση της γύρης και η ανάπτυξη βακτηρίων, μυκήτων και προνυμφών εντόμων, η γύρη πρέπει να ξηραίνεται γρήγορα. Τα μυρμήγκια μπορούν να αφαιρέσουν σημαντικές ποσότητες γύρης από τις παγίδες.

Η γύρη πρέπει να ξηραίνεται σε λιγότερο από 10% περιεκτικότητα σε υγρασία (κατά προτίμηση 5% ή 8% ) το συντομότερο δυνατό μετά τη συγκομιδή. Μια απλή μέθοδος χρησιμοποιεί έναν κανονικό λαμπτήρα (20W και 220V) αναρτημένο αρκετά ψηλά πάνω από ένα δίσκο γύρης έτσι ώστε η γύρη να μην θερμαίνεται σε περισσότερο από 40 ή 45 °C. Στην περίπτωση που προτιμηθεί η ηλιακή ξήρανση, η γύρη πρέπει να καλύπτεται για να αποφεύγεται το άμεσο ηλιακό φως και η υπερθέρμανση.

Μετά την ξήρανση, η γύρη πρέπει να καθαριστεί από όλες τις ξένες ύλες. Απλές τεχνικές αερισμού είναι συνήθως επαρκείς για αυτό το σκοπό.

### ***Συλλογή Ψωμιού μελισσών***

Το ψωμί μελισσών βρίσκεται συνήθως σε κερήθρες που υπάρχουν κοντά αυγά μελισσών. Οι διαθέσιμες ποσότητες είναι κατά κανόνα πολύ μικρές και κατά λάθος κατά τη συγκομιδή μπορεί να καταστραφεί ολόκληρη η αποικία.

Ορισμένα είδη μελισσών μπορούν να αποθηκεύουν μεγάλες ποσότητες ψωμιού μελισσών όταν οι αποικίες έχουν μείνει χωρίς βασίλισσα ή όταν υπάρχει άφθονος χώρος.. Αυτό είναι πολύ δύσκολο με τις περισσότερες παραδοσιακές κυψέλες μελισσών, αλλά με μερικές τροποποιήσεις είναι δυνατό. Το ψωμί μελισσών μπορεί επίσης να δημιουργηθεί εκ των υστέρων από τη γύρη μελισσών.



**Εικόνα 17:** το ψωμί μελισσών αποθηκεύεται σε ανοιχτά κελιά. Συνήθως είναι κοντά σε κελιά που περιέχουν αυγά και μέλι, γιατί και η συλλογή του συνήθως είναι καταστροφική για τους γόνους.

### **Φύλαξη γύρης**

Η θρεπτική αξία της γύρης όπως και κάθε πρωτεϊνικής τροφής καταστρέφεται εάν δεν συντηρηθεί και διαφυλαχθεί με το σωστό τρόπο. Φρέσκια γύρη, εάν φυλαχθεί σε θερμοκρασία δεωματίου, σε λίγες μέρες χάνει το μεγαλύτερο μέρος της θρεπτικής της αξίας. Εάν φυλαχθεί αμέσως μετά τη συλλογή της σε 5°C ψύξη μπορεί να συντηρηθεί για έναν χρόνο το μέγιστο. ή σε -15°C, για αρκετά χρόνια. (Dietz, 1975)

### **Έλεγχοι ποιότητας γύρης**

Ελάχιστες χώρες όπως η Ελβετία και η Αργεντινή έχουν αναγνωρίσει επίσημα την γύρη ως συμπλήρωμα διατροφής και έχουν θεσπίσει και ελέγχους ποιότητας. Το Αμερικάνικο FDA (Food and Drug Administration) δεν την συμπεριλαμβάνει στον κατάλογο των συμπληρωμάτων διατροφής με αποτέλεσμα να μην έχουν θεσπισθεί ειδικοί έλεγχοι.

Στην Ελβετία και Αργεντινή έχουν τεθεί ανώτερα όρια μικροβιολογικών φορτίων να μην υπερβαίνουν 1 SOx100UFC/g αερόβια μικρόβια, και 100UFC/g μύκητες και μη παθογόνοι μικροοργανισμοί. Η υγρασία δεν μπορεί να υπερβαίνει το 8%, το pH μπορεί να κυμαίνεται από 4-6, το σύνολο των πρωτεϊνών από 15-28% Kjeldahl (N x 6.25) ξηρού βάρους, οι συνολικοί υδατάνθρακες 45-55 % ξηρού βάρους και το μέγιστο τέφρας να μην υπερβαίνει το 4% του ξηρού βάρους.

Η χρήση γύρης σε καλλυντικά σκευάσματα απαιτεί ακόμη καλύτερης ποιότητας πρώτη ύλη μιας και έρχεται κατευθείαν σε επαφή με το δέρμα και μάλιστα του προσώπου. Επίσης θα πρέπει να ελέγχεται και ως προς ξένα σώματα που μπορεί να περιέχει, όπως και για φυτοχημικά ή και

αντιβιοτικά που χορηγούνται στα μελίτσια για προφύλαξη των μελισσών από άλλα έντομα και ασθένειες. (Schmidt and Buchmann, 1992).

### **Προφύλαξη**

Για να αποφεύγονται τα συμπτώματα αλλεργίας που είναι πολύ συνήθη, πρέπει αφενός να αναγράφεται η πιθανότητα εμφάνισης αυτών των συμπτωμάτων καθώς και η κατανάλωση (δοκιμή) αρχικά μικρής ποσότητας, για κατά τον δυνατό περιορισμό των αλλεργικών φαινομένων. (Schmidt and Buchmann, 1992).

### **Εμπορική εκμετάλλευση**

Αυτή την περίοδο, στην Ελλάδα οι τιμές της συσκευασμένης γύρης διαμορφώνονται στα 40-50 ευρώ ανά κιλό. Η τιμή της ξηρής γύρης στις ΗΠΑ παλιότερα ήταν US\$ 11- 30 /kg (American Bee Journal, 1999), ενώ σε μορφή καψακίων ή απλών χαπιών US\$ 900/kg. Οι περισσότεροι από τους διακινητές γύρης ασχολούνται γενικότερα με προϊόντα μελισσοκομίας (Crane,1990).

Ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι ενώ τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια τάση μείωσης των τιμών για τα μελισσοκομικά προϊόντα, εντούτοις αυτή η τάση δεν εφαρμόζεται στη γύρη. Αυτό οφείλεται στο ότι είναι ένα σχετικά νέο μελισσοκομικό προϊόν και υπάρχει έντονο ενδιαφέρον, που αποτυπώνεται και στη πληθώρα νέων μελετών που δημοσιεύονται για αυτή.



**Εικόνες 18-22:** εμπορικά σκευάσματα γύρης

### **3.4 Βιολογικές Δράσεις και Χρήσεις της Γύρης**

Σχεδόν 70% των συστατικών της γύρης εμφανίζουν βιολογικές δράσεις. Συνεπώς, η χρήση της γύρης παρουσιάζει πολύ ενδιαφέρουσες επιδράσεις επί του οργανισμού. Οι κυριότερες είναι αντιοξειδωτική, καρδιοπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική, αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριδιακή, αντινεοπλασματική, ανοσοδιεγερτική και αντιαναιμική δράση. Επιπρόσθετα έχει πολύ υψηλή διατροφική αξία.

## ***Διατροφική αξία***

Ως συμπλήρωμα διατροφής, η γύρη είναι κυρίως μια πλούσια πηγή πρωτεϊνών (Carpes, 2009; Martins, 2011). Κατά μέσο όρο, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της γύρης είναι 23.9% επί του ξηρού βάρους (Kedzia, 2008). Αν και η σύσταση μπορεί να ποικίλει αναλόγως της γεωγραφικής προέλευσης και του φυτικού είδους προέλευσης, ωστόσο φαίνεται ότι παραμένει σχετικά σταθερό αυτό το ποσοστό. Η γύρη θεωρείται κορυφαία πηγή αμινοξέων, καθώς το περιεχόμενο της σε αμινοξέα είναι πολλαπλάσιο σε σύγκριση ακόμα και με ζωικής προέλευσης προϊόντα πλούσια σε πρωτεΐνες. Είναι χαρακτηριστικό ότι η γύρη περιέχει δεκαπλάσια ποσότητα θειαμίνης, νιασίνης και ριβοφλαβίνης από μοσχαρίσιο κρέας ίδιου βάρους (Margaon, 2010).

Εκτός του πρωτεϊνικού περιεχομένου, η γύρη είναι πλούσια και σε υδατάνθρακες, λιπίδια, ακόρεστα λιπαρά οξέα, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες και πολυφαινόλες (Kroyer, 2001). Οι υδατάνθρακες που βρίσκονται σε ποσοστό από 13-55%, αποτελούνται κυρίως από σάκχαρα, τόσο ανηγμένα όπως φρουκτόζη γλυκόζη και μαλτόζη, όσο και από μη αναχθέντα όπως σουκρόζη. Τα λιπίδια στη γύρη βρίσκονται σε ποσοστό 0.3-20% και αποτελούνται τόσο από ακόρεστα λιπαρά οξέα, όσο και από κορεσμένα. Το κλάσμα ακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά είναι περίπου 2.5 (Kedzia, 2008). Τα βασικά ακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν το 2.7% της γύρης, γεγονός που αυξάνει τη διατροφική της αξία. Το λινελαϊκό και λινολενικό οξύ είναι βασικά δομικά στοιχεία των κυτταρικών μεμβρανών και διαδραματίζουν ρόλο στην εγκεφαλική λειτουργία και στη διαβίβαση των νευρικών ώσεων. Επίσης βοηθούν τα μεταφορά του οξυγόνου στο πλάσμα, τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και κυτταρική διαίρεση (Youdim, 2000). Άλλωστε τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι πρόδρομες ουσίες των θρομβοξάνιων, λευκοτριένιων και προσταγλανδινών ουσίες που σχετίζονται με τη διαδικασία της φλεγμονής. Η παρουσία φωσφολιπιδίων στη γύρη, όπως φωσφατυδυλχολίνη, φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και φωσφατιδυλινοσιτόλη της προσδίδει την ιδιότητα του ενεργοποιητή του μεταβολισμού, καθώς αυτά θεωρούνται λιποτροπικοί παράγοντες. Πέρα από τα βασικά διατροφικά συστατικά της, η γύρη περιέχει και πλήθος ιχνοστοιχείων όπως νάτριο, κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, φώσφορο, μαγγάνιο, σίδηρο, κοβάλτιο, νικέλιο, χαλκό και ψευδάργυρο. Επιπρόσθετα περιέχει 0.7% βιταμίνες, κυρίως του συμπλέγματος Β, βιοτίνη και ασκορβικό οξύ (Kedzia, 2008). Λιποδιαλυτές βιταμίνες περιέχονται στη γύρη σε ποσοστό 0.1% και είναι κυρίως β-καροτένιο, βιταμίνη Ε και καλσιφερόλη (Komosinska, 2015). Η παρουσία πολυφαινόλων και ο βιολογικός τους ρόλος θα αναλυθεί εκτενέστερα παρακάτω. Λόγω όλων αυτών των συστατικών, η γύρη μαζί με το βασιλικό πολτό και το ψωμί μελισσών θεωρούνται διατροφικά προϊόντα που μπορούν να βελτιώσουν την υγεία, ακόμα και να αντικαταστήσουν άλλα συμπληρώματα διατροφής (Tichonov, 2008).

## ***Αντιοξειδωτική δράση***

Θεωρείται ότι το οξειδωτικό στρες είναι ένας σημαντικός παράγοντας ανάπτυξης χρόνιων και εκφυλιστικών παθήσεων όπως καρκίνος, αυτοάνοσα νοσήματα, γήρας, καταρράκτης, ρευματοειδής αρθρίτιδα και νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Pham-Huy, 2008). Η αύξηση των



ελεύθερων ριζών μπορεί να είναι η αιτία, ο μεσολαβητής ή το αποτέλεσμα αυτών των παθήσεων (Bartosz, 2003).

Αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται ένα μόριο το οποίο είναι ικανό να μειώνει ή και να αποτρέπει την οξείδωση άλλων μορίων, καταστέλλοντας τη δράση των ελεύθερων ριζών.

Η γύρη, επιδεικνύει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, επιβεβαιωμένη από πληθώρα μελετών (Leja, 2007; Carpes, 2009; Nagai, 2005; Graikou, 2011; Almaraz-Abarca, 2007; Morais, 2011; Izuta, 2009; Marghitas, 2009; Eraslan, 2009).

Σε πολλές μελέτες έχει υποστηριχθεί η στενή σχέση μεταξύ της αντιοξειδωτικής δράσης της γύρης και των φαινολικών παραγώγων που περιέχει. (Campos, 1994, 2003.; Le blanca, 2007, 2009). Ωστόσο, η συσχέτιση των δυο αυτών παραμέτρων δεν είναι ξεκάθαρη (Marghitas, 2009). Η αντιοξειδωτική δράση της γύρης εξαρτάται από το βοτανικό είδος προέλευσής της και όχι από τη γεωγραφική προέλευσή της (Almaraz-Abarca, 2004).

Δείγματα γύρης από διαφορετικά φυτά της Ρουμανίας έδειξαν διαφορές στην αντιοξειδωτική ικανότητά τους ακόμα και σε δεκαπλάσιο βαθμό. Παραδείγματος χάρη, η γύρη από πέυκο έδειξε σχετικά μικρή αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τη γύρη ιτιάς ή τη γύρη που προερχόταν από είδη του γένους *Matricaria* (Marghitas, 2009).

### **Αντιγηραντική δράση**

Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια εξακρίβωσης της σχέσης μεταξύ της γήρανσης και παρουσίας οξειδωμένων πρωτεϊνών. Ως γήρανση ορίζεται το σύνολο των χρονικά αθροιζόμενων φυσιολογικών μεταβολών οι οποίες καταλήγουν στη φυσική και λειτουργική κατάρρευση του οργανισμού. Αποτελεί ένα αναπόφευκτο φυσιολογικό φαινόμενο για κάθε οργανισμό, ωστόσο η ταχύτητα και η βαρύτητα της εξέλιξης της επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων που σχετίζονται τόσο με το περιβάλλον, όσο και με γενετικούς παράγοντες. Ένας από τους τρόπους μελέτης της κυτταρικής γήρανσης είναι η χρήση *in vitro* καλλιέργειών. Σε αυτές τις καλλιέργειες, τα κύτταρα παρουσιάζουν ένα πεπερασμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού, οπότε παρατηρείται μείωση της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας, με αποτέλεσμα την κυτταρική γήρανση (Hayflick & Moorhead, 1961). Η γήρανση συνοδεύεται και από μια έντονη μείωση της ικανότητας των κυττάρων να διατηρούν την ομοιόστασή τους, λόγω της υπολειτουργίας πολλών βιολογικών συστημάτων, οδηγώντας σε αδυναμία ανταπόκρισης σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Campisi, 2000).

Τα « γονίδια γήρανσης» είναι τα γονίδια τα οποία εκφράζονται περισσότερο κατά τη γήρανση και αποτελούν περίπου το 0,5% των γονιδίων του ανθρώπου (Lee et al., 1999). Πολλά από αυτά έχουν κλωνοποιηθεί. Ένα από τα σημαντικότερα τέτοια γονίδια είναι η Απολιποπρωτεΐνη J (ApoJ), της οποίας ο ακριβής λειτουργικός ρόλος είναι άγνωστος, αλλά εμπλέκεται σε λειτουργίες όπως η ωρίμανση του σπέρματος, η μεταφορά λιπιδίων, η αναστολή του συμπληρώματος και η σταθεροποίηση αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών. Το γονίδιο της

υπερεκφράζεται σε παθολογικές καταστάσεις όπως καρκίνος και σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις σχετιζόμενες με το γήρας (ανασκόπηση από Trougakos & Gonos, 2002). Υπερέκφρασή του έχει παρατηρηθεί και σε συνθήκες κυτταρικού στρες όπως και σε καρκινικά κύτταρα που παρουσιάζουν χημειοαντοχή (Petropoulou et al., 2001; Dumont et al., 2002, Trougakos, 2002). Αποσιώπησή με την τεχνολογία RNAi οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση (Trougakos et al., 2004). Τα προαναφερθέντα ευρήματα αναδεικνύουν το προστατευτικό ρόλο της ApoJ έναντι κυτταροτοξικών παραγόντων και του γήρατος. Ακόμα ένας μηχανισμός που κατά τη γήρανση επιδρά στην απορύθμιση της κυτταρικής ομοιοστασίας είναι η συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών. Το πρωτεόσωμα είναι ένα πολυενζυμικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση φυσιολογικών και οξειδωμένων πρωτεϊνών. Έχειδειχθεί πως οι πρωτεολυτικές ενεργότητες του πρωτεοσώματος όπως αυτές εκφράζονται μέσω των ενεργοτήτων της χυμοθρυψίνης και της τρυψίνης, μειώνεται κατά τη γήρανση διάφορων ιστών (Gaczynska, 2001). Ακόμα κάποιες υπομονάδες του πρωτεοσώματος υποεκφράζονται σε γερασμένα κύτταρα, τα οποία εκτός των άλλων φέρουν και λιγότερο πρωτεάσωμα (Chondrogianni, 2003). Επιπρόσθετα, η αναστολή του πρωτεοσώματος με τη χρήση ειδικού αναστολέα, οδηγεί νεαρά κύτταρα σε πρόωμη γήρανση (Chondrogianni et al. 2004). Όταν το πρωτεάσωμα υπολειτουργεί λόγω γήρανσης, εμφανίζεται συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών. Ο σημαντικός ρόλος του πρωτεοσώματος στη μακροβιότητα και στη γήρανση φαίνεται και από το γεγονός ότι υπεραιωνόβιοι φέρουν πλήρως λειτουργικό πρωτεάσωμα (Chondrogianni et al. 2000). Παρότι όπως προκύπτει από τα παραπάνω δεδομένα υπάρχει μια βασική κατανόηση των μηχανισμών που διαδραματίζουν ρόλο στη γήρανση και στην μακροβιότητα, δεν υπάρχει ιδιαίτερη επίγνωση της βιολογικής δράσης φυσικών παραγόντων σε αυτούς. Θεωρείται ότι τα δραστικά είδη οξυγόνου όπως οι ελεύθερες ρίζες είναι υπεύθυνες για εκφυλιστικές παθήσεις που σχετίζονται με το γήρας όπως η αθηροσκλήρωση και ο καρκίνος (Sotiroidis et al., 2003, Ames et al., 1993). Για την πρόληψη του γήρατος και αυτών των ασθενειών συνίσταται η πρόσληψη αντιοξειδωτικών, είτε ως φυσικών συστατικών, είτε ως συμπληρώματος διατροφής (Vaya et al., 2001). Χαρακτηριστικό παράδειγμα της ευεργετικής δράσης της πρόσληψης πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών είναι το γαλλικό παράδοξο, όπου επιδημιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν το μειωμένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων και καρκίνου με την αυξημένη πρόσληψη αυτών των ουσιών μέσω του κρασιού και του λαδιού (Renaud et al, 1992).

Μια κατηγορία ουσιών που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη γήρανση είναι οι λιποξυγενάσες (LOX), οι οποίες είναι διοξυγονάσες που καταλύουν τη προσθήκη μοριακού οξυγόνου σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Το ισοένζυμο LOX-1 χρησιμοποιείται σε διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα ως τυπική λιποξυγενάση. Οι κατεχολικές ουσίες και τα υδροξυαμικά οξέα θεωρούνται κλασσικοί αναστολείς του ενζύμου (Galpin et al., 1976). Πρόσφατα, μελετήθηκε και ο μηχανισμός της αναστολής κάποιων ισομορφών της LOX από πολυφαινόλες όπως η κουρκουμίνη και η επιγαλλοκατεχίνη (Skrzypczak-Jankun, 2003).

Ένα ένζυμο που είναι πολύ διαδεδομένο στο φυτικό και ζωικό βασίλειο είναι η τυροσινάση, η οποία είναι γνωστή και ως οξειδάση της πολυφαινόλης. Καταλύει την οξείδωση της L-τυροσίνης

προς μελανίνη, ουσίας ιδιαίτερα σημαντικής για τον οργανισμό. Αναστολείς της μελανίνης είναι χρήσιμοι και στη κοσμητολογία ως λευκαντικά δέρματος, εκτός από τη φαρμακευτική (Maeda et al., 1991).

Η γύρη περιέχει πληθώρα ουσιών που δρουν με διαφορετικό τρόπο κατά της γήρανσης. Πέραν της αντιοξειδωτικής δράσης που αναφέρθηκε νωρίτερα και οφείλεται εν μέρει στα πολυφαινολικά συστατικά, κάποια συστατικά επιδρούν στα προαναφερθέντα ενζυμικά συστήματα που σχετίζονται με το γήρας. Έτσι, λιποδιαλυτά εκχυλίσματα γύρης σικάλης αναστέλλουν τη παραγωγή λευκοτριένιων σε κύτταρα RBL-1 ,γεγονός που υποδηλώνει δόσοεξαρτώμενη αναστολή της 5-λιποξυγενάσης. Πείραμα από το οποίο απομονώθηκαν πέντε νέες μονοτερπενικές ουσίες από γύρη *Crocus sativus L.* απέδειξε τη συγκρίσιμη ικανότητα τους να αναστέλλουν τη καταλυτική δράση της τυροσινάσης σε σχέση με γνωστούς αναστολείς του ενζύμου που χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά (Loschen et al.,1991; Li et al., 2002).

### **Οιστρογόνο δράση**

Οι φυτοστερόλες της γύρης όπως η β-σιτοστερόλη και η καμπεστερόλη, οι οποίες είναι φυτοοιστρογόνα, έχουν επίδραση στις ορμόνες τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων (Szczena, 2006) Ακόμα, γλυκοσίδες της γενιστεΐνης και της σελαγίνης ,που ανήκουν στις ισοφλαβόνες , δίνουν στη γύρη πρόσθετες ιδιότητες φυτοοιστρογόνου, καθώς έχουν τη δυνατότητα να προσδεθούν σε υποδοχείς οιστρογόνων. Αυτή η ιδιότητα σχετίζεται με υπολιπιδαιμική και αντινεοπλασματική δράση της γύρης που θα αναλύσουμε αργότερα (Puzanowska, 2010; Kedzia, 2004).

### **Ακτινοπροστατευτική δράση**

Είναι γνωστό ότι η ακτινοβολία δημιουργεί ελεύθερες ρίζες, οι οποίες δύναται να οξειδώσουν τα λιπίδια ενός οργανισμού. Η γύρη, ως εκκαθαριστής ελεύθερων ριζών, αναμένεται να έχει προστατευτική δράση έναντι αυτής της δράσης. Πράγματι, σε πείραμα όπου μικρές δόσεις ακτίνων-X ενεργοποιούσαν στο ήπαρ των ποντικών τα ενζυμικά συστήματα γλουταθειόνης κατά της υπεροξειδωσης των λιπιδίων του οργανισμού τους, παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη εκχυλίσματος γύρης στη διατροφή τους, μείωσε σε φυσιολογικά επίπεδα τη δράση αυτών των συστημάτων (Benzo,1997).

Σε άλλη μελέτη, χρήση λαδιού β-καροτένιου και γύρης έδειξαν εξίσου καλή προστατευτική δράση έναντι των βλαβερών δράσεων της παρατεταμένης έκθεσης σε ακτινοβολία (25Gy), όχι όμως και έναντι τοξικών χημικών παραγόντων, όπως το χλωριούχο κάδμιο. Αυτή η εκλεκτική δράση θεωρείται ότι σχετίζεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα της γύρης και του β-καροτένιου (Ananeva,1999).

### **Χημειοπροστατευτική και αντικαρκινική δράση**

Σε ηλικιωμένα σκυλιά που έπασχαν από καλοήγη υπερπλασία προστάτη, χορηγήθηκε γύρη μελισσών από το στόμα σε δόση 5-10gr/kg για δυο μήνες. Έγινε παρατήρηση στη συνέχεια των μορφολογικών αλλαγών στον αδένα. Υπήρξε μείωση του μεγέθους του, τόσο στον ένα μήνα, όσο και στον δεύτερο. Η μικροσκοπική εξέταση έδειξε μείωση του ύψους των κυττάρων και λιγότερες πτυχώσεις της θυλώδους στιβάδας του επιθηλίου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης δεν αναφέρθηκε καμία τοξική επίδραση της γύρης, ούτε διαφορά στα επίπεδα τεστοστερόνης και οιστραδιόλης στο πλάσμα (Lin,1990).

Σε άλλο πείραμα, το χλωροφορμιακό κλάσμα της γύρη μελισσών που προήλθε από φυτά *Brassica campestris*, έδειξε δράση επί σειράς καρκινικών κυττάρων PC-3 του ανθρώπινου προστάτη, αυξάνοντας τον ρυθμό απόπτωσής τους (Wu,2007).

Γύρη από *Salix alba L.* και *Cistus creticus L.* όπως και εκχυλίσματα τους δοκιμάστηκαν για την οιστρογονική και γονοτοξική δράση τους. Όλα τα δείγματα έδειξαν να αναστέλλουν τη δράση του φυσικού οιστρογόνου 17-β-οιστραδιόλη, μερικά σε ποσοστό μεγαλύτερο του 90%, χωρίς ταυτόχρονα να έχουν οιστρογόνο δράση ή να προκαλούν χρωμοσωμικές βλάβες. Τουλάχιστον ένα δείγμα από κάθε είδος έδρασε προφυλακτικά έναντι της δράσης των αντικαρκινικών φαρμάκων mytomicin, bleomycin, vincristine. Καθώς η γύρη από αυτά τα δυο φυτά έδειξε ότι είναι αποτελεσματικός αναστολέας οιστρογόνων χωρίς να έχει οιστρογόνο ή γονιδοτοξική δράση, ενώ ταυτόχρονα μειώνει τις χρωμοσωμικές βλάβες από τρία ευρέως χρησιμοποιούμενα αντικαρκινικά φάρμακα, την καθιστούν ένα εξαιρετικό υποψήφιο συμπλήρωμα διατροφής για άτομα που βρίσκονται σε χημειοθεραπεία (Pinto, 2010).

Γύρη μελισσών από την Τουρκία έδειξε δραστικότητα έναντι της K-562 σειράς καρκινικών κυττάρων πνεύμονα (Aliyazicioglu, 2005).

Εκχυλίσματα από γύρη μελισσών ανέστειλαν το πολλαπλασιασμό βλαστικών κυττάρων από ανθρώπινο ομφάλιο λώρο, αν και σε μικρότερο βαθμό από την κινέζικη κόκκινη πρόπολη (Izuta, 2009).

Πολυσακχαρίτες από τη γύρη μελισσών από το φυτό *Rosa rugosa* εκχυλίστηκαν και κλασματοποιήθηκαν. Όλα τα κλάσματα έδειξαν εξαιρετική δράση έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών HT-29 και HCT116. Επιπρόσθετα τα ουδέτερα και όξινα κλάσματα παρουσίαζαν συνεργική αντικαρκινική δράση με τους πολυσακχαρίτες του φυτού, *in vitro* (Wang, 2013).

Πειράματα για αντικαρκινική δράση έχουν γίνει και με γύρη φυτών, κυρίως με το υδατικό εκχύλισμα Cernitin T60. Εννέα συνεχόμενες σειρές ανθρώπινων καρκινικών και μη, κυττάρων δοκιμάστηκαν *in vitro*, με το εκχύλισμα να είναι αποτελεσματικό μόνο στη σειρά που προερχόταν απ κύτταρα προστάτη (Habib, 1990). Σε άλλο πείραμα φάνηκε ότι το cernitin ήταν δραστικό σε ποντίκια με καρκίνο των πνευμόνων (Furosawa, 1995).

Στο υδατικό κλάσμα του προϊόντος Cernilton, το οποίο περιέχει γύρη σίκαλης, βρέθηκε η ουσία 2,4-hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one. Η ουσία αυτή είναι κυκλικό υδροξαμικό οξύ, που παρουσίασε ισχυρή ανασταλτική δράση επί συνεχούς σειράς προστατικών κυττάρων (Zhang, 1995).

### ***Γύρη και καρδιαγγειακό***

Η γύρη μελισσών ασκεί ισχυρή ανασταλτική δράση στο μετατρεπτικό ένζυμο της αγγεοτενσίνης I προς αγγειοτενσίνη II, μέσω των υδρολασσών που περιέχει, μειώνοντας έτσι την πίεση. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η γύρη δρα κατά των αθηρωματικών πλακών (Rzepecka-Stojko, 2015). Επιπρόσθετα, χορήγηση πολυσακχαριτών κινέζικης γύρης μελισσών σε αρουραίους, μείωσε τα τριγλυκερίδια στο αίμα, χωρίς να μειώνει την ολική χοληστερίνη ή την HDL-C (Zeng, 2004). Η ευεργετική δράση της γύρης στο καρδιαγγειακό σχετίζεται με την ύπαρξη ακόρεστων λιπαρών οξέων, φυτοστερολών, φωσφολιπιδίων, βιταμίνης E και φλαβονοειδών.

### ***Ηπατοπροστατευτική δράση***

Σε ηλικιωμένους αρουραίους που τους χορηγήθηκε γύρη μελισσών, μελετήθηκε η ηπατική τους δραστηριότητα. Μετά από ένα μήνα χορήγησης, είχαν μειωθεί τα επίπεδα μανουλαλδεύδης αλλά και σουλφυδρικών ομάδων (SH-G) του ηπατικού ιστού. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα ουρίας και πρωτεϊνών στο πλάσμα είχαν βελτιωθεί σημαντικά (Uzbekova, 2003).

Σε άλλο πείραμα, χορηγήθηκε εκχύλισμα γύρης μελισσών σε αρουραίους που είχαν δηλητηριαστεί με carbaryl (1-naphthyl methylcarbamate), το οποίο είναι ένας καρβαμιδικός εστέρας που χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο. Μετρήθηκαν βιοχημικοί παράμετροι και δείκτες του οξειδωτικού στρες πριν και μετά τη χορήγηση του carbaryl και του εκχυλίσματος γύρης. Ήταν εμφανή τόσο η αρνητική επίδραση του εντομοκτόνου στους οργανισμούς τους, όσο και η αποτοξινωτική δράση της γύρης (Eraslan, 2008). Παρόμοια ενθαρρυντικά προστατευτικά αποτελέσματα είχε η γύρη και έναντι του εντομοκτόνου prochloraz (Eraslan Kanbur, 2008)

Διαφορετικά εκχυλίσματα γύρης μελισσών δόθηκαν σε αρουραίους δηλητηριασμένους με παρακεταμόλη. Ένα από τα εκχυλίσματα μείωσε τη θνησιμότητα αποτρέποντας τις ηπατικές βλάβες. Εκτιμάται ότι η γύρη έδρασε επιδιορθώνοντας τις βλάβες και όχι προφυλακτικά (Juzwiak, 1993).

Μονοποικιλιακή γύρη από τα φυτά *Cardus* και *Castanea* έδειξαν επίσης ηπατοπροστατευτική δράση σε ποντίκια και αρουραίους έναντι τετραχλωράνθρακα (Cristea, 1976; Yildiz, 2013).

Χορήγηση ψωμιού γύρης μελισσών σε ασθενείς που έπασχαν από χρόνια ηπατίτιδα, μετά από 30 μέρες, συνετέλεσε στη βελτίωση στη κλινική εικόνα τους. Αυτό φάνηκε από τη σχέση αλβουμίνης (λευκωματίνης) προς σφαιρίνη στο πλάσμα, όπως και από τη μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων του ήπατος (Ialomiteanu, 1976).

### **Δράση κατά της οστεοπόρωσης**

Ως οστεοπόρωση ορίζεται η απώλεια οστικής μάζας και η διατάραξη της δομής των οστών, γεγονός που οδηγεί σε μείωση της αντοχής τους όπως και σε αυξημένο κίνδυνο κατάγματος.

Υδατικό εκχύλισμα γύρης από *Cistus ladaniferus* έδρασε κατασταλτικά επί της σύνθεσης οστεοκλαστών σε καλλιέργεια κυττάρων από μυελό των οστών ποντικού *in vitro*. Επιπρόσθετα, το ίδιο υδατικό εκχύλισμα αναστέλλει το καταβολισμό των οστών σε καλλιέργεια ιστών μηριαίου οστού από αρουραίο (Hamamoto, 2006). Η ίδια επιστημονική ομάδα ανακάλυψε ότι το υδατικό εκχύλισμα του *Cistus ladaniferus* προκαλεί σημαντική αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης, ενός ενζύμου που εμπλέκεται στο μηχανισμό ασβεστοποίησης των οστών. Σε άλλο πείραμα, αποδείχτηκε και η *in vitro* αναβολική δράση του εκχυλίσματος, επί της σειράς MC3T3-E1 οστεοβλαστικών κυττάρων (Yamaguchi, 2007).

Η χορήγηση *per os* αυτού του υδατικού εκχυλίσματος *in vivo* σε αρουραίους, προκάλεσε αύξηση της περιεκτικότητας σε ασβέστιο και DNA, καθώς και αύξηση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης σε μηριαίους ιστούς διάφυσης και μετάφυσης. Συνεπώς, αυτό το εκχύλισμα επιδεικνύει ισχυρή αναβολική δράση στη δόμηση των οστών *in vivo*, τόσο επί της ζώνης ανάπτυξης του οστού, όσο και στο πλήρως ανεπτυγμένο τμήμα του (Yamaguchi, 2006).

Αντίστοιχη μελέτη του ίδιου υδατικού εκχυλίσματος έγιναν σε διαβητικά ποντίκια. Το εκχύλισμα έδρασε όχι μόνο προστατευτικά, κατά της απώλειας οστικής μάζας, αλλά ταυτόχρονα προκάλεσε και σταδιακή υποχώρηση των υψηλών τιμών γλυκόζης και τριγλυκεριδίων στο αίμα (Yamaguchi, 2007).

### **Αναιμία**

Ως αναιμία ορίζεται η κατάσταση του οργανισμού που χαρακτηρίζεται από μειωμένο αριθμό ερυθρών αιμοσφαιρίων. Σε μελέτη με αρουραίους οι οποίοι προσλάμβαναν μειωμένες ποσότητες σιδήρου στη διατροφή τους, η προσθήκη 10gr/kg βάρους/ μέρα γύρης μελισσών στη διαίτά τους αύξησε το βάρος τους, και τα επίπεδα αιμογλοβίνης στο αίμα, ενώ ταυτόχρονα μειώθηκαν τα αιμοπετάλια. Επίσης παρατηρήθηκαν ευεργετικά αποτελέσματα στο μεταβολισμό του μαγνησίου, του ασβεστίου και του φωσφόρου. Η μελέτη κατέληξε στο ότι αυτό το προϊόν των μελισσών εξομαλύνει σε μεγάλο βαθμό τις συνέπειες της έλλειψης σιδήρου, ενώ ταυτόχρονα βοηθά την καλύτερη απόρροφηση και χρησιμοποίησή του από τον οργανισμό (Harro, 2000).

Πειράματα σε ζώα που έπασχαν από αιμολυτική αναιμία έδειξαν μείωση των λευκών αιμοσφαιρίων και αύξηση των ερυθροκυττάρων μετά από τη λήψη γύρης (Wang, 1993; Chauvin, 1968).

### **Αντιφλεγμονώδης δράση**

Η φλεγμονή είναι η φυσιολογική αντίδραση του οργανισμού σε βλάβες ιστών ή κυττάρων που προκαλούνται από φυσικούς ή βιολογικούς παράγοντες και από ελεύθερες ρίζες. Η αντίδραση

αυτή ενεργοποιεί διάφορους μηχανισμούς που έχουν σκοπό την απομακρύνουν το αίτιο και να επιδιορθώσουν τη βλάβη. Η ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση στοχεύουν στην καταστολή της δράσης της κυκλοξυγενάσης και της λιποξυγενάσης, οι οποίες είναι τα ένζυμα που μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε παράγοντες της φλεγμονής, όπως λευκοτριένια και προσταγλανδίνες, ουσίες υπεύθυνες τόσο για τη χρόνια όσο και για την οξεία φλεγμονή των ιστών.

Η γύρη έχει δείξει ότι κατέχει ιδιαίτερα ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση, συγκρινόμενη με πολλά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, όπως η ναπροξένη, η ινδομεθακίνη ή η φαινυλβουταζόνη (Pascoal, 2014).

Σε μελέτη με γύρη από *Pinus densiflora* σε ποντίκια, δόσεις 100 και 200mg/kg έδειξαν αναλγητική, αντιφλεγμονώδη και ναρκωτική δράση, τόσο στο hot plate test, όσο και σε οίδημα πέλματος προκαλούμενο από φορμαλίνη. Η ίδια γύρη αποδείχτηκε δραστική και σε οίδημα αυτιού προκαλούμενο από έγχυση καραγενίνης (Choi, 2007).

Εκχυλίσματα ισπανικής γύρης από το γένος *Cistus*, μελετήθηκαν για την αντιφλεγμονώδη δράση τους. Το πείραμα έγινε σε οίδημα που προκλήθηκε μετά από ένεση καραγενίνης σε πατούσες αρουραίων (Carrageenan-induced rat paw oedema model). Το ολικό εκχύλισμα γύρης είχε μέτρια δράση, ενώ το υδατικό εκχύλισμα δεν έδειξε να αναστέλλει καθόλου τη φλεγμονή. Ωστόσο, το αιθανολικό εκχύλισμα είχε πολύ ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση. Κατόπιν μελετήθηκε το δραστικό αιθανολικό εκχύλισμα οπότε και απομονώθηκαν τουλάχιστον 5 φλαβονοειδή και οι γλυκοσίδες τους. Επίσης αποδείχτηκε ότι η γύρη αναστέλλει εκλεκτικά τη κυκλοξυγενάση-2 (COX-2), και όχι την COX-1, η αναστολή της οποία συνδέεται με ανεπιθύμητες ενέργειες. Ακόμα, το αιθανολικό εκχύλισμα βρέθηκε ότι αναστέλλει, αναλογικά με τη συγκέντρωσή του, τη παραγωγή του NO και επομένως πιθανολογείται ότι η αναστολή της COX-2 γίνεται μέσω αυτού του μηχανισμού (Maruyama, 2010).

### ***Γύρη στη διατροφή οικόσιτων ζώων***

Εκτεταμένα πειράματα έχουν γίνει σε ζώα προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της γύρης στη διατροφή τους.

Σε ποντίκια που των οποίων το γεύμα αποτελούνταν από 50% καζεΐνη και 50% γύρη, παρατηρήθηκε αύξηση του βάρους τους αναλόγως του φυτικού είδους προέλευσης της γύρης, από 16%-46% (Chauvin, 1968). Στο ίδιο πείραμα αποδείχτηκε ότι η γύρη μπορεί να αποτελέσει μοναδική τροφή των ποντικών αλλά με μειωμένο ρυθμό αύξησης του βάρους.

Σε άλλη μελέτη αποδείχτηκε ότι η γύρη βελτιώνει την μητρική διατροφή των αρουραίων χωρίς να επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου, καθιστώντας την ιδανική τροφή για εγκύους. Ωστόσο δεν πρέπει να αγνοείται η υπεργλυκαιμία που προκαλεί (Xie et al, 1994).

Αύξηση στον αναπαραγωγικό ρυθμό των ποντικών που είχε προστεθεί γύρη στη διατροφή τους, παρατηρήθηκε μετά από έξι μήνες (Slijepcevic, 1978).

Σε κουνέλια Νέας Ζηλανδίας στα οποία χορηγούνταν γύρη 200 mg/kg, παρατηρήθηκε αύξηση του βάρους των θηλυκών, αύξηση του ποσοστού σύλληψης, της παραγωγής γάλακτος, μείωση της θνησιμότητας μέχρι τον απογαλακτισμό καθώς και βελτίωση του βιοχημικής σύστασης του αίματος (Attia, 2011).

Σε πουλερικά που τρέφονταν με καζεΐνη εμπλουτισμένη με 5% γύρη, των οποίων το αρχικό βάρος ήταν 5.8kg, παρατηρήθηκε αύξηση του βάρους τους κατά 4kg, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου που αυξήθηκε κατά 2.7kg. Σε άλλο πείραμα, η ίδια διατροφή αύξησε το ποσοστό επιβίωσης των πουλερικών, το οποίο έγινε ακόμα υψηλότερο όταν το ποσοστό γύρης στη τροφή διπλασιάστηκε (Tikhonov, 2006). Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι η γύρη μελισσών μπορεί να βοηθά την σωστή ανάπτυξη του πεπτικού συστήματος στα κοτόπουλα (Wang, 2007).

Μια μελέτη που έγινε σε άλογα αγώνων στα οποία χορηγήθηκε ένα συμπλήρωμα διατροφής με γύρη, έδειξε μείωση του αριθμού των λευκοκυττάρων στο αίμα τους μετά τη 42η μέρα. Η μελέτη αυτή κατέληξε στο ότι πιθανώς η γύρη να αυξάνει τις επιδόσεις των αλόγων, μέσω της αυξημένης πρόσληψης τροφής και καλύτερης απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών (Turner, 2006).

### ***Γύρη στη διατροφή των αθλητών***

Παλαιότερα η γύρη μελισσών θεωρούνταν η καλύτερη τροφή για αθλητές. Πολλοί αθλητές χρησιμοποιούσαν γύρη μελισσών ή εκχυλίσματά της στο καθημερινό διαιτολόγιό τους με τη πεποίθηση ότι θα τους οδηγήσει σε βελτίωση των επιδόσεών τους. Μελέτη που έγινε σε κολυμβητές δεν έδειξε κάποια ιδιαίτερη βελτίωση στις επιδόσεις. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι οι αθλητές που διατρέφονταν με γύρη, απείχαν σημαντικά λιγότερες μέρες από τη προπόνηση λόγω λοίμωξης του ανώτερου αναπνευστικού -κατά μέσο όρο 4- σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, που απείχε 27 μέρες (Maughan, 1982).

Σε άλλη μελέτη με μαραθωνοδρόμους δε παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση στις επιδόσεις ή στα επίπεδα αιμογλοβίνης στο αίμα (Woodhouse, 1987).

Αρκετές μελέτες με γύρη μελισσών έχουν γίνει με αθλητές στη Ρωσία (Asafona et al.,2001). Το 1977 χορηγούνταν σε μέλη της εθνικής αθλητικής ομάδας 10gr γύρης , δυο φορές τη μέρα. Παρατηρήθηκε βελτίωση των επιδόσεων, καθώς και αύξηση των τιμών αιμοσφαιρίνης στο αίμα. Ανάλογα θετικά αποτελέσματα έδειξαν και πειράματα που έλαβαν χώρα με επαγγελματικές ομάδες πετοσφαίρισης και καλαθοσφαίρισης. Το 1988, έγινε μελέτη από τους Vasilecksy και Maltsev της επίδρασης της γύρης στην απόδοση κατά τις στρατιωτικές ασκήσεις. Οι στρατιώτες έπαιρναν 50gr γύρης πριν το γεύμα, και κατά τη περίοδο ανάπαυσης ανάμεσα στις πορείες άλλα 70 gr. Πλήθος παραμέτρων μετρήθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης, όπως το βάρος, οι παλμοί, οι επιδόσεις, ενώ έγιναν σπιρομετρήσεις και ψυχολογικά τεστ. Τα συμπεράσματα έκλιναν στην άποψη ότι η γύρη μελισσών μπορεί να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική κατά τη διάρκεια ανάνηψης μετά από μια περίοδο έντονου σωματικού στρες, βελτιώνοντας τη



ψυχοκινητική κατάσταση ενός ατόμου. Επιτυχημένα πειράματα έγιναν και με χρήση μίγματος μελιού-γύρης, με ανάμιξη 50gr από μέλι με 20-40gr γύρης.

Δόση 10gr γύρης, δυο φορές τη μέρα για 15 μέρες δόθηκε στις ρωσική αθλητική μαθητική ομάδα κορασίδων. Μετά από μια σειρά απαιτητικών αθλητικών δοκιμασιών, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση στην αντίδραση του οργανισμού στην υποξεία, μετρημένη με το τεστ του Stange στο 19%, καθώς και βελτίωση των αντανακλαστικών (Nechaeva, 2009).

Οι αθλητές διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο λοιμώξεων λόγω της υποβολής του οργανισμού τους σε έντονο σωματικό στρες που οδηγεί σε εξασθένηση της άμυνας του οργανισμού τους. Η πρόσληψη γύρης με μέλι ,μέσα σε 8 εβδομάδες μείωσε στα φυσιολογικά επίπεδα τη δραστηριότητα των T-λεμφοκυττάρων σε αθλητές(Abramov, 1993). Ακόμη μια μελέτη σε κολυμβητές και αθλητές του σκι έδειξε ότι η γύρη αυξάνει τα ποσοστά της αιμοσφαιρίνης αλλά και των πρωτεϊνών στο αίμα (Punyakin, 2001).

### ***Γύρη και προστάτης***

Η πιο γνωστή χρήση της γύρης ως φάρμακο είναι σε προβλήματα του προστάτη. Η προστατίτιδα, που είναι η φλεγμονή του προστάτη, προκαλεί δύσκολη και επώδυνη ούρηση, συνοδευόμενη συχνά από αίσθημα καύσου, έντονη επιθυμία για ούρηση ακόμα και με ελάχιστη ποσότητα ούρων, με ταυτόχρονο πόνο στο οπίσθιο κάτω μέρος της κοιλιακής χώρας. Η καλοήθης υπερπλασία του προστάτη προκαλείται από υπερβολική ανάπτυξη του ιστού του οργάνου, χωρίς όμως την ύπαρξη κακοήθειας. Σε ηλικιωμένα άτομα, πολύ συχνή είναι και η χρόνια προστατίτιδα η οποία δεν ανταποκρίνεται στα αντιβιοτικά, καθώς πιθανότατα οφείλεται σε ορμονικές αλλαγές λόγω ηλικίας.

Εκτεταμένα πειράματα αλλά και κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει την ευεργετική δράση της γύρης φυτών και μελισσών στην καλοήθη υπερπλασία προστάτη. Σε ασθενείς οι οποίοι λάμβαναν συμπλήρωμα διατροφής από γύρη, μετά από ένα χρόνο, παρατηρήθηκε μείωση του όγκου του προστάτη, αυξημένη ροή, πίεση και όγκος ούρων (Murakami,2008).

Εμπορικό σκεύασμα που διατίθεται για το προστάτη και περιέχει γύρη συγκεκριμένων φυτών από τη νότια Σουηδία αναλύθηκε και βρέθηκε πλούσιο σε στερόλες. Σε ασθενείς με προστατικό αδένωμα μείωσε τη νυχτουρία και τη προσθοπίσθια διάμετρο του προστάτη (Bruneton, 1999).

Χρήση του υδατικού εκχυλίσματος Cernitin έδειξε δραστικότητα στη συμπτωματική αντιμετώπιση της καλοήθους υπερπλασίας του προστάτη σε δείγμα 79 ασθενών ηλικίας από 62-89 ετών. Παρατηρήθηκε μείωση του προστατικού όγκου και της ούρησης (Yasumoto, 1995). Η δράση αυτή πιθανότατα οφείλεται σε σε ένα περιεχόμενο υδροξαμικό οξύ με αντικαρκινική *in vitro* δράση (Zhang, 1995).

Εκχύλισμα γύρης με το εμπορικό όνομα Prostat/Polit σε κλινική μελέτη έδειξε να βοηθά ιδιαίτερα ασθενείς με χρόνια μη βακτηριδιακή προστατίτιδα και σύνδρομο χρόνιου πυελικού

άλγους. Μετά από χρήση έξι μηνών μειώθηκε δραστικά ο πόνος, τα συμπτώματα κατακράτησης ούρων και βελτιώθηκε η σεξουαλική δραστηριότητα των ασθενών, σε σχέση με αυτούς που έλαβαν placebo –εικονικό φάρμακο (Elist, 2006).

Σε μια επισκόπηση για τα πλέον υποσχόμενα φαρμακολογικώς δραστικά εκχυλίσματα για την αντιμετώπιση του καρκίνου προστάτου και της υπερπλασίας του προστάτη, το εκχύλισμα γύρης σίκαλης Cernilton θεωρήθηκε από τα καλύτερα, μαζί με το PC-SPEs (εκχύλισμα 8 βοτάνων) και το εκχύλισμα *Prunus africana*. (Thomson, 2001). Το εκχύλισμα Cernitron δοκιμάστηκε σε 15 ασθενείς με χρόνια προστατίτιδα και προσταδυνία (μη φλεγμονώδες σύνδρομο χρόνιου πυελικού άλγους). Σε 13 από τους 15 ασθενείς υπήρξε είτε πλήρη ίση, ή παρατεταμένη περίοδος χωρίς πόνο, ενώ μόνο δυο ασθενείς δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία. Ακόμα μια μελέτη με το συγκεκριμένο εκχύλισμα Cernitron έγινε με 89 ασθενείς που έπασχαν από καλοήγη υπερπλασία προστάτη. Παρατηρήθηκε βελτίωση που έφτανε έως και το 78% επί του αριθμού των ασθενών. Οι κύριες παρατηρήσεις είχαν να κάνουν με βελτιωμένη ροή ούρων, μείωση του όγκου του προστάτη και μείωση του όγκου των υπολειπόμενων ούρων (Dutkiewicz, 1996).

Τα αποτελέσματα χρήσης της γύρης λουλουδιών στο προστάτη αξιολογήθηκαν το 2003, όπου 13 μελέτες απεδείξαν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά της χρήσης της, και κυρίως του εκχυλίσματος Cernilton, σε ελαφρά ή ήπια συμπτώματα του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι υπήρξε δραστική μείωση ή εξαφάνιση των συμπτωμάτων σε ποσοστό υψηλότερο του 75% (Chambliss, 2003).

### **Αντιδιαρροϊκή δράση**

Γύρη φυτών από *Eucalyptus globulus* και *Salix atrocinerea* αποδείχτηκε ότι μειώνουν τις διαρροϊκές εκκρίσεις κατά τουλάχιστον 30%, με τη γύρη ευκαλύπτου να είναι πιο αποτελεσματική στη καθυστέρηση της διάρροιας. Πιθανολογείται ότι η δράση αυτή οφείλεται κυρίως στη περιεχόμενη κερκετίνη (Campos, 1997).

### **Χρήση γύρης στα καλλυντικά**

Περιέχεται συχνά σε σκευάσματα καλλυντικά, επειδή πιστεύεται ότι αναζωογονεί το δέρμα και το τρέφει, με μόνο πιθανό πρόβλημα τον κίνδυνο αλλεργίας. Για να αποφευχθεί το πρόβλημα αυτό της αλλεργίας, συχνά χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά σκευάσματα τα αλκοολικά ή υδατικά εκχυλίσματα γύρης, τα οποία σπάνια έως ποτέ, μπορεί να προκαλέσουν αλλεργικά φαινόμενα. Παρά την συχνή χρήση τέτοιων εκχυλισμάτων, η δραστηριότητά τους δεν έχει εξακριβωθεί (Kaifa, 2002).

### **Χρήση γύρης ως δείκτης ρύπανσης του περιβάλλοντος**

Η γύρη έχει χρησιμοποιηθεί ως ευαίσθητος δείκτης ρύπανσης, ήδη από τη δεκαετία του 1980, για ελέγχους βαρέων μετάλλων και ραδιενέργειας. Γι αυτό και απαγορεύεται η συλλογή της από

μολυσμένες και βιομηχανικές περιοχές (Free et al., 1983; Crane, 1984; Bromenshenk et al., 1985).

### ***Ανεπιθύμητες ενέργειες, αλλεργικές αντιδράσεις και πιθανά τοξικά συστατικά γύρης***

Είναι γνωστό ότι η γύρη που βρίσκεται στον αέρα προκαλεί αλλεργίες. Ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι η κατανάλωση μικρών ποσοτήτων γύρης μπορεί να απευαισθητοποιήσει ένα άτομο και να μειώσει τα συμπτώματα της αλλεργικής ρινίτιδας. Έχει αποδειχτεί ότι το φαινολικό εκχύλισμα γύρης και η μυρικήτίνη που περιέχεται σε αυτό είναι δραστικά έναντι προκλητής αλλεργικής αντίδρασης σε πειραματόζωα (Meideros, 2008). Πιθανότατα η αντιαλλεργική δράση της γύρης οφείλεται στην αναστολή ενεργοποίησης των μαστοκυττάρων που προκαλεί η γύρη (Ishikawa, 2008). Γύρη έχει χορηγηθεί τόσο υποδόρια όσο και από το στόμα για την αντιμετώπιση των αλλεργικών αντιδράσεων από τη γύρη που βρίσκεται στον αέρα όσο και έναντι τσιμπημάτων μελισσών. Η υποδόρια χορήγηση αποδείχτηκε πιο αποτελεσματική. Επίσης αποτελεσματική ήταν και η χορήγηση γύρης σε ταμπλέτες (Wachholz, 2003), (Francis, 2003), (Larsen, 2006). Τελευταία γίνονται προσπάθειες παρασκευαστούν δραστικά εμβόλια από γύρη, από τα οποία έχουν αφαιρεθεί τα αλλεργιογόνα. Εμβόλιο με γύρη από Graminae που χορηγήθηκε υπογλώσσια ήταν δραστικό έναντι της αλλεργικής ρινίτιδας (Moingeon, 2008). Υδατικά εκχυλίσματα γύρης χρησιμοποιούνται χρόνια κατά της αλλεργίας από τη σκόνη (Wortmann, 1977).

Η γύρη μελισσών είναι γενικά αρκετά ανεκτή, αλλά η παρουσία αλλεργιογόνων γυρεόκοκκων δεν μπορεί να αποκλειστεί. Οι αλλεργίες λόγω γύρης οφείλονται κυρίως στην εισπνεόμενη γύρη, ενώ αναφορές για αλλεργικές αντιδράσεις προκαλούμενες από κατάποση γύρης είναι σχετικά σπάνιες. Αναφυλακτικές αντιδράσεις έχουν αναφερθεί μετά τη κατανάλωση γύρης μελισσών, χωρίς ωστόσο να είναι απειλητικές για τη ζωή. Μελέτη έδειξε ότι σε δείγμα 891 ατόμων που έφαγαν γύρη, υπήρξαν αλλεργικές αντιδράσεις στο 1.45% αυτών, ενώ το 10%-25% του πληθυσμού έχει κάποια μορφή αλλεργίας στην εισπνεόμενη γύρη (Smirnova, 2008). Υπάρχει αναφορά περιστατικού αλλεργίας μετά από κατάποση γύρης από την οικογένεια Compositae (Cohen, 1979). Ακόμα ένα περιστατικό αλλεργικής αντίδρασης ήταν με 34χρονη Ισπανίδα η οποία εμφάνισε υοσινόφιλη γαστρεντερίτιδα μετά από κατάποση γύρης, έχοντας ωστόσο ιστορικό εποχικής αλλεργικής ρινίτιδας και δυσανεξίας στο μέλι (Puente, 1997). Συνεπώς, άτομα ασθματικά ή τα οποία έχουν ιστορικό αλλεργιών θα ήταν καλύτερα να αποφεύγουν τη κατανάλωση γύρης.

### ***Τοξικά συστατικά γύρης***

Έχνη από ηπατοτοξικά πυραζολιδινικά παράγωγα (PA) έχουν ανιχνευτεί σε γύρη από *Echium vulgare*, *E. plantagineum*, *Senecio jacobaea*, *S. Ovatus* και *Eupatorium cannabinum* (Murakami et al., 2008). Στην κεντρική και βόρεια Ευρώπη δεν είναι σύννηθες φαινόμενο η συλλογή αυτών των γυρεόκοκκων από τις μέλισσες, αλλά στην νότια Ευρώπη τα δυο φυτά *Echium* είναι αρκετά

διαδεδομένα (Bogdanov, 2004; Koslik, 1979). Οι ποσότητες των PA's στη γύρη από *Echium*, *Senecio*, *Eupatorium* και *Phalaenopsis* κυμαίνεται μεταξύ 0.8 και 14 mg/g (Kempf, 2010).

Προσοχή επίσης απαιτείται για την παρουσία γυρεόκοκκων προερχόμενο από *Persea* (αβοκάντο), καθώς περιέχουν περσίνη, ένα λιποδιαλυτό τοξικό παραπροϊόν των λιπαρών οξέων που υπάρχει στο φυτό. Ακόμα και μικρές ποσότητες αυτής της ουσίας μπορούν να προκαλέσουν γαστρεντερικά και σοβαρά καρδιακά συμπτώματα σε ζώα, ακόμα και το θάνατο. Σε ανθρώπους, σε συνήθεις δόσεις δεν προκαλεί σοβαρά προβλήματα, ωστόσο πολλά άτομα είναι αλλεργικά σε αυτήν.

#### 4. *Cistus creticus* sbsp. *creticus* (Αλαδανιά)

##### 4.1 Οικογένεια Cistaceae

Η οικογένεια των Cistaceae είναι μια μικρή σχετικά οικογένεια που αποτελείται από 170-200 είδη, χωρισμένα σε 9 γένη. Από αυτά, πέντε είναι ενδημικά φυτά της μεσογειακής λεκάνης και των εύκρατων περιοχών της Ευρώπης, (*Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Tuberaria*) ενώ υπάρχουν και στην βόρεια Αμερική (*Crocanthemum*, *Hudsonia*, *Lechea*) (Guzman et al., 2009). Περιορισμένα είδη έχουν βρεθεί και στην νότια αμερικανική ήπειρο. Τα περισσότερα φυτά της οικογένειας είναι ποώδη ή θάμνοι, που παράγουν μεγάλο αριθμό ανθέων κατά την περίοδο της άνθισης (Guzman et al., 2005)

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

Το χρώμα των ανθέων είναι συνήθως κίτρινο, ρόδινο (ρόζ) ή λευκό, με πολύ μικρό χρόνο ζωής. Τα άνθη είναι δίοικα, με πέντε πέταλα, ή, σπανίως, τρία (*Lechea*). Τα πέταλα συχνά φέρουν πτυχώσεις (*Cistus creticus*). Από τα πέταλα, τα εσωτερικά τρία είναι εμφανώς πιο πλατιά, ενώ τα δυο εξωτερικά είναι πιο στενά και συχνά θεωρούνται βράκτια φύλλα. Η διάταξη από τα σέπαλα είναι χαρακτηριστική της οικογένειας. Οι στήμονες είναι πολυάριθμοι και διαφέρουν σε μήκος, ενώ είναι βρίσκονται πάνω σε δίσκο. Η ωοθήκη αποτελείται συνήθως από τρία καρπόφυλλα, με εξαίρεση το γένος *Cistus* όπου έχει 5 ή περισσότερα. Ο καρπός έχει μορφή κάψας.

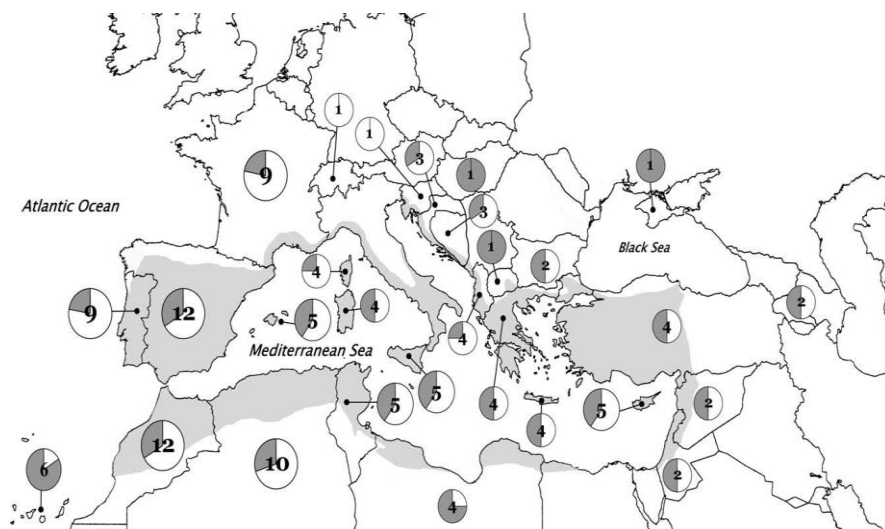
Πίνακας 5: συστηματική κατάταξη αλαδανιάς

Δυο είναι οι βασικοί λόγοι που η οικογένεια αυτή έχει επικρατήσει σε πολλές περιοχές της Μεσογείου. Ο πρώτος λόγος είναι ότι τα φυτά αυτά έχουν χαρακτηριστεί ως **πυρόφυτα**, καθώς αμέσως μετά από μια πυρκαγιά διεγείρεται το φύτρωμα των σπερμάτων τους και η αναβλάστησή τους. Αυτό το ιδιαίτερο φαινόμενο οφείλεται στο γεγονός ότι τα σπέρματα διαθέτουν μια παχιά αδιάβροχη επικάλυψη η οποία μόλις εκτεθεί σε υψηλή θερμοκρασία

διαρρηγνύεται, επιτρέποντας στο νερό να εισέλθει και να αρχίσει το φύτρωμα του σπόρου. Υπό κανονικές συνθήκες, η διάρρηξη αυτής της μεμβράνης γίνεται με βραδείς ρυθμούς με τη βοήθεια μικροοργανισμών του εδάφους (Ferrandis, 1999).

Ο δεύτερος λόγος που κάνει τα φυτά της οικογένειας Cistaceae επικρατή έναντι άλλων φυτών, είναι η ιδιότητά τους να δημιουργούν συμβιωτική σχέση στις ρίζες τους με μύκητες του γένους *Tuber*. Σε αυτή τη σχέση, ο μύκητας βοηθά τις ρίζες να απορροφήσουν νερό και μέταλλα από το έδαφος, επιτρέποντας στο φυτό ξενιστή να αναπτυχθεί σε ιδιαίτερα φτωχά εδάφη. Επιπρόσθετα, ο μύκητας *T. melanosporum* (μαύρη τρούφα) έχει την ιδιότητα να εκκρίνει ουσίες οι οποίες νεκρώνουν τη χλωρίδα σε ικανή απόσταση από το μυκήλιο του, επιτρέποντας μονάχα στο φυτό ξενιστή να επιβιώσει, δίνοντας του το πλεονέκτημα της αποκλειστικότητας για εκείνη τη περιοχή (Chevalier, 1975; Gjiouvannetti, 1982). Αυτή η ιδιότητα υπήρξε η αφορμή για πολλές έρευνες σχετικά με την εμπορική εκμετάλλευση της καλλιέργειας τρούφας (*Tuber*) στο ριζικό σύστημα φυτών της οικογένειας Cistaceae. Το μικρό μέγεθος των θάμνων των *Cistus* ίσως αποδειχτεί σημαντικό, καθώς οι παραδοσιακοί ξενιστές της τρούφας είναι ο δρυς και το πεύκο, δέντρα που είναι μεγάλα, οπότε η καλλιέργεια *Cistus* μπορεί να αυξήσει τη στρεμματική απόδοση.

#### 4.2 Γένος *Cistus*



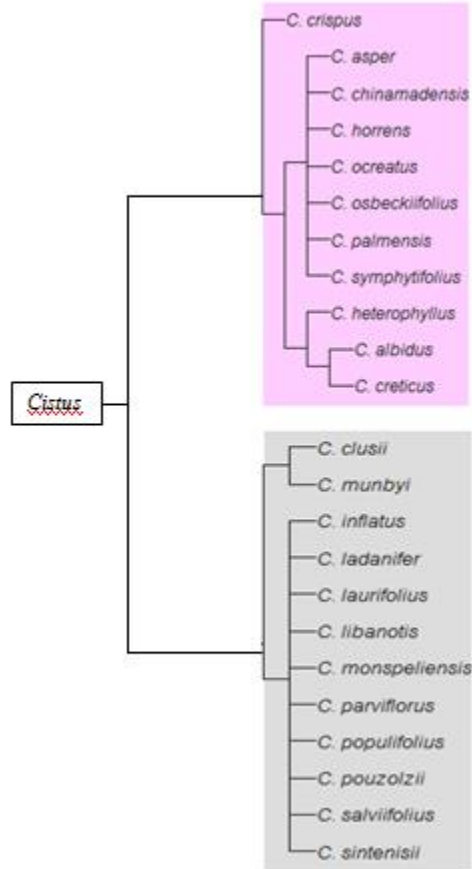
**Εικόνα 23:** γεωγραφική κατανομή και αριθμός ειδών του γένους *Cistus* ανά περιοχή. Το διάγραμμα πίτας αναπαριστά την αναλογία των φυτών με λευκά και ροζ άνθη.

**Εικόνα 24:** αναπαράσταση των ειδών *Cistus creticus*, *C. monspeliensis* και *C. salvifolius*.

Για το γένος *Cistus*, οι μονογραφίες αναφέρουν 16 έως 28 είδη (Grosser, 1903, Dunal, 1824, Guzmán and Vargas, 2005, 2009). Σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα, έχει προταθεί η κατάταξή τους σε 3 υπογένη (*Cistus*, *Leucosistus*, *Halimiodes*) με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά (Demoly et al., 1993). Ακολουθώντας την κατάταξη του Grosser (1903) και τις

νεότερες προσθήκες σε αυτή, 16 είδη που έχουν περιγραφεί από αυτό το γένος απαντώνται στην Ευρώπη.

**Εικόνα 25:** δένδρογραμμα του υπογένους *Cistus*, όπου τα είδη έχουν χωριστεί σε δύο κλάδους αναλόγως του χρώματος των ανθέων τους (Civeyrel, 2011)



#### 4.3 Είδος *Cistus creticus* L.

‘Ν’ αρχίσει ο γάβρος σφέρδουκλας/ ν’ ανθεί κι ο λάδανος να ιδρώνει/ κι η πετροπέρδικα να φτερουγάει/ να κακαρίζει ο λόγγος!’ Καζαντζάκης, Οδύσσεια

Τρία υποείδη του *Cistus creticus* είναι βοτανικώς αναγνωρισμένα τα:

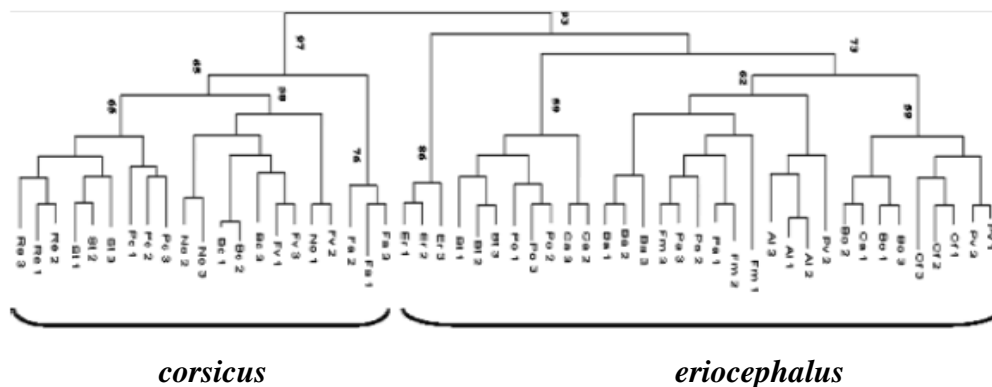
*Cistus creticus* subsp. *creticus* (L.),

*Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) και

*Cistus creticus* subsp. *corsicus* (Loisel.).

Από αυτά τα υποείδη, το *corsicus* υπάρχει στην Σαρδηνία (Ιταλία) και στην Κορσική (Γαλλία), ενώ στην Ελλάδα και ειδικά στην Κρήτη είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο το *Cistus creticus* subsp. *creticus* (Demetzos *et al.*, 2002). Όσον αφορά το *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus*, είναι

διαδεδομένο σε όλη την μεσογειακή λεκάνη και κυρίως στα μέρη που ευδοκούν τα προηγούμενα υποείδη, δηλαδή στην Κρήτη, Σαρδηνία και Κορσική. Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι συχνά αναφέρεται λανθασμένα η ονομασία του είδους ως *Cistus incanus* αντί του ορθού *Cistus creticus*. Στην πραγματικότητα, το *Cistus incanus* είναι υβρίδιο του *Cistus crispus* με το *Cistus albidus* (Guzman et al., 2005).



**Εικόνα 26:** δενδρόγραμμα βασισμένο στην γενετική απόσταση κατά Dice (τεχνική UPGMA) για 54 φυτά του είδους *C. creticus* από την Κορσική. Στην πρώτη ομάδα κατατάσσονται τα φυτά του υποείδους *corsicus* ενώ στην δεύτερη το υποείδους *eriocephalus* (Paollini et al., 2009)

### Βοτανική περιγραφή *Cistus creticus* sbsp. *creticus*

Το *Cistus creticus* sbsp. *creticus*, κοινώς λαδανιά ή αλαδανιά, είναι ένα φυτό γνωστό για τις

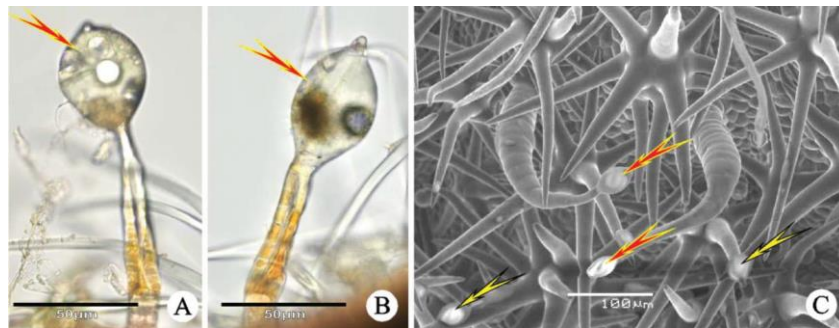


**Εικόνα 27:** καλοκαιρινά φύλλα κίστου

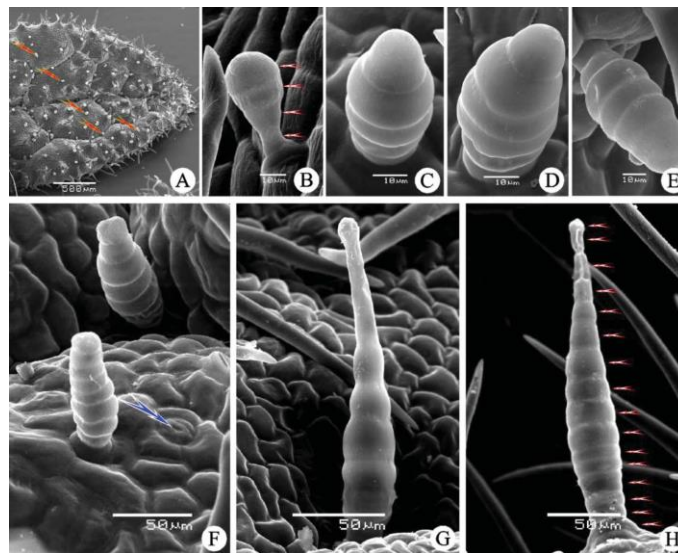
αρωματικές, φαρμακευτικές και μελισσοτροφικές ιδιότητές του. Απαντάται σε ξηρά και πετρώδη εδάφη, συχνά καλύπτοντας μεγάλες εκτάσεις, τους γνωστούς κιστώνες. Ευδοκμεί συνήθως σε ημιορεινές περιοχές με φτωχή βλάστηση, ενώ μπορεί να αναπτυχθεί και σε ασβεστώδη εδάφη. Η αλαδανιά είναι ένα αειθαλές θαμνώδες φυτό που συχνά ξεπερνά το ένα μέτρο σε ύψος. Ο βλαστός του είναι πολύκλαδος. Χαρακτηριστικά είναι τα φύλλα του, τα οποία είναι ρητινώδη, παχιά και κυματοειδή, ενώ το σχήμα τους είναι απλό αδιαίρετο. Η διάταξή τους είναι αντίθετη ή κατ'εναλλαγή με παράφυλλα, ενώ φέρουν απλές αστεροειδείς τρίχες ή δέσμες αυτών. Παρόν είναι το φαινόμενο του εποχικού διμορφισμού. Κατά την περίοδο του χειμώνα και της άνοιξης, η μέση επιφάνεια των φύλλων είναι  $6\text{mm}^2$ , ενώ το φθινόπωρο μειώνεται στα  $2\text{mm}^2$ . Το φθινόπωρο άλλωστε το φυτό χάνει και μέρος του φυλλώματος του, σε μερικές περιπτώσεις ακόμα και όλο. Αναβλάστηση του φυτού έχουμε συνήθως ένα μήνα μετά τις πρώτες φθινοπωρινές βροχές. Βασικό γνώρισμα του υποείδους *creticus* είναι η κάλυψη όλου του φυτού από μονήρεις ή αστεροειδείς αδενώδεις τρίχες που παράγουν την ελαιορητίνη λάδανο (Christodoulakis et al.,



2014). Αυτή η ρητίνη παράγεται κυρίως από τα φύλλα και τρυφερούς βλαστούς. Η μεγαλύτερη πυκνότητα αδενωδών τριχών στο φυτό παρουσιάζεται κατά μήκος των νεύρων της κάτω επιφάνειας των φύλλων καθώς και στα στελέχη. Η παραγωγή της ρητίνης στη διάρκεια της ημέρας αυξάνει καθώς ανεβαίνει η θερμοκρασία. Καθώς η ρητίνη εκρέει από τις αδενώδεις τρίχες, καλύπτει την εξωτερική επιφάνεια της τρίχας, τη βάση της και την επιφάνεια του οργάνου στο οποίο φύεται. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για το φυτό, καθώς ελαττώνει την εξατμισοδιαπνοή, καθώς και τη θερμοκρασία του φύλλου, λόγω της εξάτμισης του αιθέριου ελαίου που περιέχει. Ακόμα, φαίνεται να διαδραματίζει προστατευτικό ρόλο έναντι της υπερϊώδους ακτινοβολίας.



**Εικόνα 28:** οι αδενώδεις τρίχες σε παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα βέλη επισημαίνουν τη ρητίνη.



**Εικόνα 29:** στην πρώτη φωτογραφία είναι εμφανείς οι χαρακτηριστικές αδενώδεις τρίχες πάνω στα φύλλα κίστου. Στις επόμενες φαίνεται η εξέλιξη των τριχών, που αποτελούνται από 3 έως πάνω από 16 κύτταρα σε πλήρη εξέλιξη



**Εικόνες 30-31:** αναπαράσταση του *Cistus creticus* και φωτογραφία του άνθους του

Τα άνθη, διαμέτρου συνήθως 4,5-5,0 εκατοστών, διατηρούνται μονάχα μια μέρα και το μπουμπούκι μάλλον διεγείρεται από το πρώτο πρωινό φως, οπότε και τα πέταλα ανοίγουν. Μέχρι το επόμενο πρωί, τα σέπαλα έχουν κλείσει και τα πέταλα έχουν απορριφθεί. Έτσι, δημιουργείται μια πεντάχωρη κάψα που περιέχει 80-130 σπέρματα. Τα άνθη της λαδανιάς έχουν 5 πέταλα χαρακτηριστικού ρόδινου χρώματος και 5 σέπαλα, ενώ έχουν πλήθος στημόνων και κίτρινα στίγματα πλούσια σε γύρη.



**Εικόνα 32:** χαρακτηριστικός κιστόνας

#### 4.4 Ιστορικά στοιχεία για το λάδανο

Ο Ηρόδοτος και ο Διοσκουρίδης περιγράφουν τον τρόπο συλλογής από τους βοσκούς της ρητίνης της λαδανιάς από τα γένια των τράγων που έτρωγαν το φυτό, και τη χαρακτηριστική ευχάριστη μυρωδιά της. Η ίδια ουσία φαίνεται να πωλούνταν τότε και στην Αίγυπτο, καθώς ο Ηρόδοτος αναφέρει «τό δέ λήδανον τό Άράβιον καλέουσι λάδανον. (Ηροδ. Γ 112) πού σημαίνει ότι χρησιμοποιούσαν όχι μόνον τήν ουσία άλλα και την ίδια την Κρητική της ονομασία. Στο μεσαίωνα, η συλλογή της ρητίνης γινόταν με ένα είδος τσουγκράνας εφοδιασμένης με δερμάτινες λουρίδες στις οποίες κολλούσε η ρητίνη (λάδανο). Αυτό το εργαλείο ονομάζεται αργαστήρι (Εικόνα 33) Ο τρόπος αυτός συλλογής του λάδανου περιγράφηκε εκτενώς από το

Γάλλο περιηγητή Μπελόν καθώς και από μεταγενέστερους όπως ο Joseph Pitton de Tournefort, ενώ δεν απέχει πολύ από τον τρόπο που γίνεται η συλλογή του ακόμα και σήμερα. Η συλλογή της ρητίνης γίνεται από φυσικούς πληθυσμούς του *Cistus creticus* κατά τις θερμές ώρες της ημέρας στη διάρκεια της ημέρας το καλοκαίρι, με τη βοήθεια του αργαστηριού. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η χρήση του δε καταστρέφει το φυτό. Πιθανότατα η συλλογή και εκμετάλλευση του φυτού στη Κρήτη άρχισε την περίοδο της Αραβοκρατίας. Η συλλογή του λάδανου είναι ιδιαίτερα κοπιαστική ενώ η παραγωγή της ρητίνης από το φύλλα εξαρτάται από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες, όσο και από τη περιοχή όπου γίνεται η συλλογή. Συνήθως η απόδοση ρητίνης είναι κυμαίνεται από 1,5-15% επί του ξηρού βάρους των φύλλων. Συλλογή του λάδανου γίνεται και στη Ισπανία, ωστόσο διαφέρει ο τρόπος. Εκεί, αφού κοπούν οι αλαδανιές, βράζονται σε μεγάλα καζάνια και το λάδανο το οποίο επιπλέει, συλλέγεται. Ωστόσο, αυτή η ρητίνη έχει διαφορετική σύσταση από αυτήν που παράγεται στη Κρήτη, τόσο λόγω του τρόπου παρασκευής όσο και λόγω της προέλευσης από διαφορετικό φυτό (*Cistus ladaniferus*). Το ελληνικό λάδανο έχει χρώμα σκούρο καφετί και είναι αρωματικό με πικρή γεύση.



**Εικόνα 33:** απεικόνιση του αργαστηριού, που χρησιμοποιούνταν για τη συλλογή του λάδανου, από τον περιηγητή Joseph Pitton de Tournefort 1700-1702



**Εικόνες 34-35:** γυναίκα που χρησιμοποιεί το αργαστήρι για τη συλλογή του λάδανου και η ρητίνη του λάδανου.

#### 4.5 Δρογοϊστορία – Χρήσεις – Βιολογικές δράσεις

Οι αρχαίοι ονόμαζαν τό φυτό «αλίσαρον». Αναφέρουν γι' αυτό ο Διοσκουρίδης και ο Ηρόδοτος. Στην μυθολογία αναφέρεται ότι οι Θεοί καθόρισαν ο κίσθος να είναι το φυτό που θα θεραπεύει τους τραυματισμένους πολεμιστές. Γλωσσολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζει ή ονομασία αυτή η οποία δεν διαφέρει πολύ από την υπάρχουσα Κρητική αγγίσαρος και πιθανόν προέρχεται από την Μινωϊκή εποχή, καθώς τα ονόματα της αρχαίας Ελληνικής πού λήγουν σε -ισαρος θεωρούνται Μινωικής προελεύσεως (Χαβάκης, 1978). Ο Θεόφραστος στην περιγραφή του κίσθου, δηλαδή του *C. creticus*, ανέφερε ότι υπάρχουν δύο είδη, το αρσενικό και το θηλυκό. Σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά που προσδίδει στο καθένα, πιστεύεται ότι το αρσενικό γένος αντιστοιχεί στο *C. creticus*, ενώ το θηλυκό στο *C. salviifolius* (κίσθος ο ελελισφακόφυλλος).. Αναφορά στο κίσθο με το όνομα *ξυσταριά* γίνεται και στο *Ιατροσοφικόν*, μια συλλογή συνταγών από μοναστήρι της Κύπρου, γραμμένη τη περίοδο της τουρκοκρατίας (1571-1878) (Lardos, 2006).

Το φυτό έχει αρωματικές αποχρεμπτικές και διεγερτικές ιδιότητες. Έχει επίσης αντιβιοτικές και αντιαιμορραγικές ιδιότητες. Τα φύλλα χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατο του τσαγιού. Εσωτερικά έχει χρησιμοποιηθεί κατά της διάρροιας, της καταρροής και ως εμμηναγωγό. Η συνήθης εποχή συλλογής των φύλλων είναι το τέλος της άνοιξης ή η αρχή του καλοκαιριού, οπότε και ξηραίνονται προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως έχει. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο Ιπποκράτης χρησιμοποιούσε το κίσθο κατά της τριχόπτωσης (Σπύρου, 1984). Ο Διοσκουρίδης το χρησιμοποιούσε ως στυπτικό. Αφού κονιοποιούσε τα άνθη του, τα αναμίγνυε με κερύ φτιάχνοντας έτσι αλοιφή, την οποία χρησιμοποιούσε σε εγκαύματα και σε παλιά έλκη (Αννάσης, 1976).

Αρκετά περισσότερες αναφορές έχουμε για τη χρήση της ρητίνης. Ο Διοσκουρίδης αναφέρει : 'Το λάδανον δύναμιν έχει θεραπευτικήν, μαλακτικήν, αναστομωτικήν, ίστησι δε τας ρέουσας τρίχας μιγέν οίνω και σμύρνη και μυρσινίω ελαίω, ουλάς τε ευπρεπεστέρας ποιεί μετ' οίνου καταχρίόμενον και ωταλγίας μεθ' υδρομέλιτος ή ροδίου εγχεομένου θεραπεύει, υποθυμάται δε και προς δευτέρων εκβολάς και σκληρίας θεραπεύει τας εν μήτρα εν πεσσω μιγέν, και τας ανωδύνοις και βηχικάς και μαλάγμασι χρησίμως μείγνυται κοιλίαντε ίστησι συν οίνω παλαιώ ποθέν, έστι δε και αρνητικό' (Διοσκορίδης, 2000). Από εκείνα τα χρόνια γινόταν χρήση της ρητίνης ως αντιλοιμώδες (κατά της πανώλης) και σαν τονωτικό. Ο Κέλσος χρησιμοποιούσε το λάδανο ως έμπλαστρο σε κακοήθη μελανώματα, ενώ ο Αβικέννας αναφέρει τη χρήση του ως αποσκληρυντικό του στομάχου και του εντέρου, όπως και για τη θεραπεία του σπλήνα. Γνωστή είναι η χρήση του και στην ταρίχευση των νεκρών. Άλλες φαρμακευτικές ιδιότητες της ρητίνης είναι η ισχυρή αντιμικροβιακή αλλά και η αντιλευχαιμική δράση. Ως αρωματική ουσία έχει χρησιμοποιηθεί σε θυμιάσεις ενώ αποτελεί και συστατικό του Άγιου Μύρου. Άλλωστε από τη ρητίνη (*gummi ladanum*) παράγεται και το αιθέριο έλαιο της λαδανιάς το οποίο χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία. Το λάδανο είναι υποκατάστατο του φημισμένου *ambergis*, το οποίο είναι μια κηρώδης ουσία προερχόμενη από το σπέρμα των φαλαινών και η οποία είναι πολύτιμη στην βιομηχανία παρασκευής αρωμάτων.

#### 4.6 Επιστημονικές μελέτες για βιολογική δράση του *cistus creticus*

Μελέτη των εκχυλισμάτων των φύλλων του *Cistus creticus* sbsp. *creticus*, έδειξε ότι κάποια εκχυλίσματα είχαν κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών σειρών, αλλά και αντιμικροβιακή δράση (Chinou et al., 1994). Αντιβακτηριδιακή και αντιμυκητιασική δράση αναφέρεται και σε άλλες μελέτες (Barrajon-Catalan et al., 2010, Barros et al., 2013, Kalus et al., 2009). Αξιοσημείωτη είναι η αντιϊκή δράση εκχυλισμάτων *Cistus* (Droebner et al., 2007, Ehrhardt et al., 2007, Kalus et al., 2009), όπως και η αντικαρκινική (Dimas et al., 1998, Angelopoulou et al., 2001, Dimas et al., 2006, Guzman et al., 2005, Hatziantoniou et al., 2006, Barrajon-Catalan et al., 2010, Skoric et al., 2012, Vitali et al., 2011).

#### 4.7 Δρογομηγεία του είδους *Cistus*

Στο υποείδος *creticus* έχουν ανιχνευτεί 92 τερπένια, από τα οποία τα 36 είναι μονοτερπένια, 35 σεσκιτερπένια και 21 διτερπένια. (Papaefthimiou et al., 2014; Chinou et al., 1994). Σε διαφορετικό υποείδος (*C. creticus* sbsp. *eriocephalous*) βρέθηκαν 47 τερπένια, 17 εκ των οποίων ήταν μονοτερπένια, 19 σεσκιτερπένια και 11 διτερπένια με δομή λαβδανίου. Επίσης έχει αναφερθεί η παρουσία 2 καρβονυλικών παραγώγων. (Demetzos et al., 1997; Papaefthimiou et al., 2014). Λαβδανικά διτερπένια και παράγωγα του manoyl oxide έχουν ανιχνευτεί σε εξανικό εκχύλισμα φύλλων, καρπών και ρητίνης (Demetzos et al., 1990).

#### Φαινολικά παράγωγα

12 φαινυλ-προπανοειδή και φλαβονοειδή έχουν αναφερθεί στο *Cistus creticus* sbsp. *creticus*. (Papaefthimiou et al., 2014; Chinou et al., 1994). Από τα ανώτερα μέρη του φυτού *C. creticus* sbsp. *tauricus* έχουν απομονωθεί φλαβαν-3-όλες όπως κατεχίνη, γαλλοκατεχίνες, και κατέχινο-3-ραμνοσίδης. Ταυτοποιήθηκαν επίσης διμερείς και τριμερείς προανθοκυανιδίνες. Ακόμα βρέθηκε σικιμικό οξύ και πρωτοκατεχινικό οξύ. Ενδιαφέρον εύρημα ήταν η παρουσία της φλαβανόνης 2,3 διυδρο-μυρικετίνη (Danne et al., 1993; Petereit et al., 1991).

Ανάλυση φύλλων από *Cistus creticus* αποκάλυψε τη παρουσία φλαβονοειδών όπως καιμπερόλη, κερκετίνη, απιγενίνη, ναριγγενίνη, και της κουμαρίνης σκοπολετίνης (6-O-μεθυλ-7-υδρόξικουμαρίνη). Σε φύλλα *C. creticus* έχουν εντοπιστεί οι γλυκοσίδες φλαβονοειδών καιμπερολο-3-γλυκοσίδης, κερκέτινο 3-γλυκοσίδης, κερκέτινο 3-ρουτινοσίδης, μυρικέτινο 3-ραμνοσίδης και μυρικετινο 3-γαλακτοσίδης (Demetzos et al., 1989).

Μελέτη του φαινολικού περιεχομένου υδατικών εκχυλισμάτων από δέκα διαφορετικά είδη *Cistus* κατέταξε τις ουσίες σε 3 κύριες κατηγορίες: ελλαγιταννίνες, φλαβονοειδή και παράγωγα φαινολικού οξέως. Η ανάλυση έγινε με HPLC και diode array ανιχνευτή, συζευγμένο με electrospray ion trap MS (HPLC-DAD-ESI-MS/MS). Βρέθηκαν: ρουτινοσίδης της ισοραμνετίνης, ρουτίνη, επικατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη, κερκιτρίνη, διμερές επικατεχίνης-επιγαλλοκατεχίνης, κερκέτινο-3-ρουτινο-7-γλυκοσίδης, κερκέτινο-3-(2'-καφεοϋλ)-ρουτινοσίδης και μυρικετρίνη. (Barrajón-Catalán et al., 2011).

## 5. Γύρη από *Cistus* sp.

Καθώς τα φυτά του γένους *Cistus* L. έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες, ενώ ταυτόχρονα είναι και μελισσοτροφικά φυτά, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τη μελέτη γύρης προερχόμενη από αυτά. Η ευρεία εξάπλωσή τους στη μεσογειακή λεκάνη κάνει εύκολη τη συλλογή δειγμάτων γύρης πλούσια σε γυρεόκκους του είδους, επιτρέποντας την εκπόνηση αρκετών μελετών για αυτήν (Percier du Sert, 2009; Feas et al., 2012, Maruyama et al, 2010; Hamamoto et al.,2006; Yamaguchi et al, 2007; Saric et al, 2009; Tomas-Lorente et al., 1992, Pinto et al.,2010; Marghitas et al., 2009). Η γύρη από *Cistus* L. έχει δείξει ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες δράσεις όπως αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντιοιστρογόνο και χημειοπροστατευτική. Εκτενή αναφορά σε αυτές γίνεται στο κεφάλαιο των βιολογικών δράσεων. Επίσης έχει βρεθεί πληθώρα φλαβονοειδών και γλυκοσίδων τους όπως γαλανζίνη, ισοραμνετίνη, κερκετίνη, καιμπφερόλη, μυρικετίνη, λουτεολίνη χρυσίνη, πινοσεμπρίνη, μυρικέτινο-3-ρουτινοσίδης, μυρικέτινο-3-γλυκοσίδης, κερκέτινο-3-σοφοροσίδης, κερκείνο-3-ρουτινοσίδης, κερκέτινο-3-ραμνόςυλ-γαλακτοσίδης, καιμπφέρολο-3-γλυκοσίδης, καιμπφέρολο-3-γλυκοσίδης και ισοραμνέτινο-3-γλυκοσίδης.

# **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ - ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΟΥΣΙΩΝ - ΥΛΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

### 1.1 Τεχνικές ανίχνευσης, διαχωρισμού και απομόνωσης των φυσικών προϊόντων

#### *Υγρή χρωματογραφία στήλης (CC)*

- α) Ανοικτού τύπου υπό κενό με στατική φάση silica gel 60H (<45 μm, Merck).
- β) Ανοικτού τύπου με στατική φάση flash silica gel (0.040-0.063 mm, Merck).
- γ) Ανοικτού τύπου με στατική φάση πολυυδροξυπροπυλιωμένη δεξτράνη, Sephadex LH-20 (25-100 μm, Pharmacia).
- δ) Ανοικτού τύπου με στατική φάση κυτταρίνη (Cellulose, Merck).

#### *Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)*

- α) Πλάκες αλουμινίου με επίστρωση silica gel με δείκτη φθορισμού (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) διαστάσεων 20 x 20 cm (αναλυτική χρωματογραφία).
- β) Γυάλινες πλάκες με επίστρωση silica gel με δείκτη φθορισμού (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) διαστάσεων 20 x 20 cm (παρασκευαστική χρωματογραφία).
- γ) Πλάκες αλουμινίου με επίστρωση silica gel RP-18 με δείκτη φθορισμού (silica gel RP-18 F<sub>254</sub>) διαστάσεων 20 x 20 cm (αναλυτική χρωματογραφία).
- δ) Γυάλινες πλάκες αλουμινίου με επίστρωση silica gel RP-18 με δείκτη φθορισμού (silica gel RP-18 F<sub>254</sub>) διαστάσεων 20 x 20 cm (παρασκευαστική χρωματογραφία).
- ε) Πλάκες αλουμινίου με επίστρωση κυτταρίνης (χωρίς δείκτη φθορισμού) διαστάσεων 20 x 20 cm (αναλυτική χρωματογραφία).
- ζ) Γυάλινες πλάκες με επίστρωση κυτταρίνης (χωρίς δείκτη φθορισμού) διαστάσεων 20 x 20 cm (παρασκευαστική χρωματογραφία). // Όλα τα παραπάνω είδη πλακών ήταν της εταιρείας Merck.

#### *Συμπύκνωση υπό κενό*

Όλες οι συμπυκνώσεις πραγματοποιήθηκαν με εξάτμιση μέχρι ξηρού, με χρήση συμπυκνωτή κενού Rotavapor Büchi R-200 σε θερμαινόμενο υδατόλουτρο Büchi Heating Bath B-490 στους 35-40°C.



### ***Διαλύματα ψεκάσμου***

Διάλυμα θειϊκής βανιλίνης: Για την παραγωγή 200 mL μεθανολικού διαλύματος θειϊκής βανιλίνης έγινε ανάμειξη διαλύματος 5 g βανιλίνης (καθαρότητας 99%) διαλυμένης σε 95 mL MeOH, με διάλυμα 5 mL θειικού οξέος διαλυμένο σε 95 mL MeOH.

Διάλυμα Naturstoff: 1% διάλυμα συμπλόκου αιθανολαμίνης διφαινυλοβορικού οξέος (Aldrich) σε MeOH

## **1.2 Όργανα και τεχνικές προσδιορισμού δομής και ανίχνευσης των φυσικών προϊόντων**

### ***Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)***

Τα απομονωμένα προϊόντα διαλύθηκαν σε δευτεριωμένους διαλύτες (CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, D<sub>2</sub>O). Φάσματα <sup>13</sup>C-NMR και DEPT λήφθηκαν σε όργανο Bruker AC 200 (50 MHz). Φάσματα <sup>1</sup>H-NMR καθώς και φάσματα δύο διαστάσεων COSY (Correlation Spectroscopy), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) και NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) λήφθηκαν σε όργανο Bruker DRX 400 (400 MHz). Οι χημικές μετατοπίσεις δίνονται σε τιμές δ (ppm) με εσωτερικό πρότυπο TMS, ενώ οι σταθερές σύζευξης *J* σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών των φασμάτων αποδίδεται εν συντομία ως εξής : s = μονή, d = διπλή, t = τριπλή, q = τετραπλή, quint.=πενταπλή, sept. = επταπλή και m = πολλαπλή.

### ***Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS)***

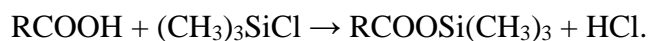
Η ανάλυση πραγματοποιείται σε αέριο χρωματογράφο Hewlett-Packard 6890 συνδεδεμένο με σύστημα φασματογράφου μάζας Hewlett-Packard 5973 που λειτουργεί με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια (electron impact) και με ενέργεια ιονισμού 70 eV. Ο αέριος χρωματογράφος είναι εξοπλισμένος με έναν split / splitless εγχυτήρα με λόγο διαχωρισμού 1/10 και μια τριχοειδή στήλη HP 5MS με μήκος 30 m, εσωτερική διάμετρο 0.25 mm και πάχος μεμβράνης 0.25 μm. Η μελέτη των χρωματογραφημάτων γίνεται με βάση την λογαριθμική τιμή που παίρνουμε για κάθε ουσία μετά την επεξεργασία των κορυφών, το φάσμα μάζας της κάθε ουσίας και τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Κατά την μελέτη των δειγμάτων έγινε χρήση δυο θερμοκρασιακών προγραμμάτων.

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα I: Η αρχική θερμοκρασία είναι 100°C και αυξάνεται με ρυθμό 4°C/min, μέχρι μέγιστης θερμοκρασίας 300°C. Συνολικός χρόνος ανάλυσης 52 min. Η ταχύτητα ροής του He είναι 0.7 mL/min.

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα II: Η αρχική θερμοκρασία είναι 150°C και αυξάνεται με ρυθμό 6°C/min, μέχρι μέγιστης θερμοκρασίας 300°C. Συνολικός χρόνος ανάλυσης 25 min. Η ταχύτητα ροής του He είναι 0.8 mL/min.

### ***Σιλυλίωση***

Η σιλυλίωση, δηλαδή ο σχηματισμός πτητικών παραγώγων για προσδιορισμό μη πτητικών ενώσεων με αέρια χρωματογραφία GC επιτυγχάνεται με εισαγωγή ομάδων  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$  ή  $-\text{SiH}(\text{CH}_3)_2$  σε ενεργά H (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -NH, -SH)



Σε ποσότητα 5mg ξηρού εκχυλίσματος προστίθεται ποσότητα 50μl άνυδρης πυριδίνης και 75 μl του αντιδραστηρίου BTFA [bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide]. Ακολουθεί θέρμανση στους 80°C για 20min και στη συνέχεια τα δείγματα που έχουν πλέον σιλιανοποιηθεί υποβάλλονται σε αεριοχρωματογραφία φασματομετρίας μαζών (GC-MS).

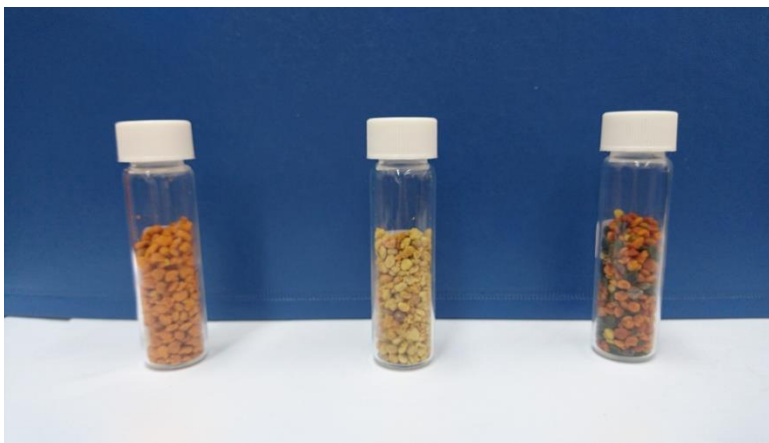
### ***Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (HPLC-TOF-MS)***

Η ανάλυση πραγματοποιείται σε χρωματογράφο υψηλής απόδοσης Agilent 1200 Infinity HPLC συζευγμένο με αναλυτή μάζας QTOF 6530B (τετραπολικός αναλυτής χρόνου πτήσης). Ο αναλυτής μάζας φέρει συσκευή πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) Dual Agilent Jet Stream spray source (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) συνδεδεμένη με γεννήτρια N<sub>2</sub> (Parker Hannifin Corporation, Haverhill, MA; Παράγει N<sub>2</sub> καθαρότητας >99%). Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) έγινε σε στήλη LC 100x2mm (υλικό πλήρωσης Gemini® 3 μm i.d. C18 με επικάλυψη TMS, 110 Å). Η έκλυση είναι βαθμιδωτή και η κινητή φάση (διαλύτης έκλυσης) αποτελείται από τα A (5% ακετονιτρίλιο σε νερό) και B (5% νερό σε ακετονιτρίλιο) διαλύματα. Και τα δύο διαλύματα έχουν pH 4.5 με τη προσθήκη 10mM φορμικού αμμωνίου. Η διαβάθμιση της έκλυσης στα 25 λεπτά ήταν από 5% B έως 60% B. Η ροή ήταν 0.1 mL/min. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 25 λεπτά. Η ανάλυση ESI-QTOF-MS εκτελέστηκε στα 2Ghz, με αρνητικό ιοντισμό και ενέργεια ιοντισμού 160 eV. Θερμοκρασία αερίου ξήρανσης 350°C, ροή αερίου ξήρανσης 12 lt/min, θερμοκρασία φέρον αερίου 400°C,

ροή φέρον αερίου 12 lt/min, πίεση νεφελοποιητή 35 psig, τάση τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης V(+) 4000V, τάση σάρωσης 65V. Οι παράμετροι της μεθόδου είναι οι εξής: αυτόματη λειτουργία MS/MS, εύρος μάζας 50-1000 amu για MS και 50-1000 amu για MS/MS. Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με σύγκριση φασμάτων MS/MS με δεδομένα από τη βιβλιογραφία και τη βάση δεδομένων METLIN. Η εμπειρική αναγνώριση κάποιων παραγώγων βασίστηκε στο μοτίβο θραυσματοποίησης (fragmentation pattern) γνωστών ουσιών.

## 2. ΓΥΡΕΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Παρελήφθησαν τρία δείγματα γύρης. Η συλλογή τους έγινε από το Μάιο έως τον Σεπτέμβριο του 2015. Το **πρώτο δείγμα I** προήλθε από την Ιεράπετρα Κρήτης. Το **δείγμα II** από την περιοχή των Καλαβρύτων Πελοποννήσου, ενώ το **δείγμα III** είχε συλλεχτεί από τα Μεσόγεια Αττικής.



**Εικόνα1:** τα δείγματα γύρης I, II και III

Η προετοιμασία των γυρεόκοκκων για τη παρατήρηση έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Louveaux όπου επιτρέπει τη ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων. Η παρατήρηση των γυρεόκοκκων έγινε σε μικροσκόπιο Olympus CX21 με φακό Olympus UTV1X-2 και φωτογράφιση με συζευγμένη κάμερα Infinity Lite.

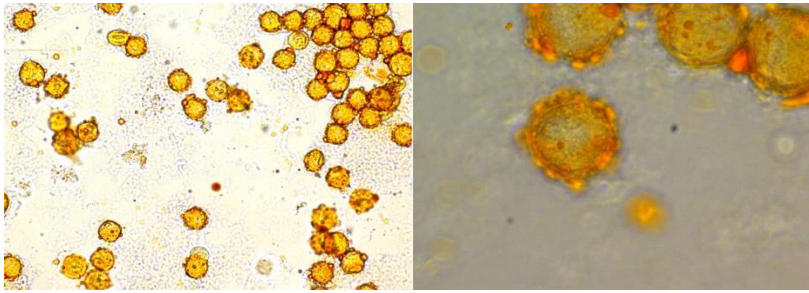
### **Δείγμα γύρης I (Κρήτη)**



**Εικόνα 2:** δείγμα γύρης I

Κατά την εξέταση του δείγματος παρατηρήθηκαν γυρεόκοκκοι κυρίως από *Cistus* sp. (οικογένεια Cistaceae) αλλά και μερικοί από *Brassica* sp. (οικογένεια Cruciferae). Το συγκεκριμένο δείγμα προέρχεται σχεδόν εξ ολοκλήρου (98%) από *Cistus* sp.

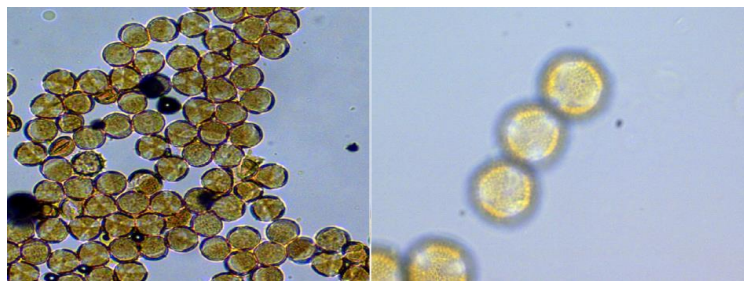
- Γυρεόκοκκοι *Cistus sp*



Εικόνα 3: γυρεόκοκκοι *Cistus sp*

Κατά την μικροσκοπική παρατήρηση των γυρεόκοκκων από *Cistus sp* στο δείγμα **I** σε μεγέθυνση 10x και 40x παρατηρήσαμε ότι το χαρακτηριστικό αυτών των γυρεόκοκκων είναι η ύπαρξη ελαιώδους στοιβάδας. Έχουν σχήμα σφαιροειδές ή ωοειδές στην ισημερινή όψη. Στην πολική όψη είναι τριγωνικό, με τα ανοίγματα να είναι στις γωνίες. Οι πλευρές του τριγώνου είναι καμπύλες προς τα έξω. Το μέγεθός τους ποικίλει από 37-51 μm. Το ανάγλυφό τους χαρακτηρίζεται ως reticulate, με το μέγεθος και το σχήμα των επιφανειακών κοιλιοτήτων να διαφέρει, με αποτέλεσμα στους κόλπους να ελαττώνεται τόσο, ώστε η περιοχή να φαίνεται λεία. Ο τύπος του γυρεόκοκκου χαρακτηρίζεται ως τρικολπικός,. Η στοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, εξίνη, είναι παχύτερη των 2μm, οι κόλποι είναι μεγάλοι σε μήκος και οι πόροι κυκλικοί.

- Γυρεόκοκκοι *Brassica sp.*



Εικόνα 4: γυρεόκοκκοι *Brassica sp.*

Κατά την μικροσκοπική παρατήρηση των γυρεόκοκκων από *Brassica sp.*(10x και 40x) παρατηρήθηκε ότι οι γυρεόκοκκοι αυτού του είδους ξεχωρίζουν από τους πορτοκαλόχρωμους του *Cistus* καθώς είναι έντονα κίτρινοι. Έχουν σχήμα σφαιρικό έως ελαφρά επιμηκυμένο με δικτυωτή επιφάνεια. Επίσης διαθέτουν εξαιρετικά παχιά μεμβράνη διαφράγματος, με κοκκώδη υφή, ενώ έχουν μικρή επιφάνεια πόλων.

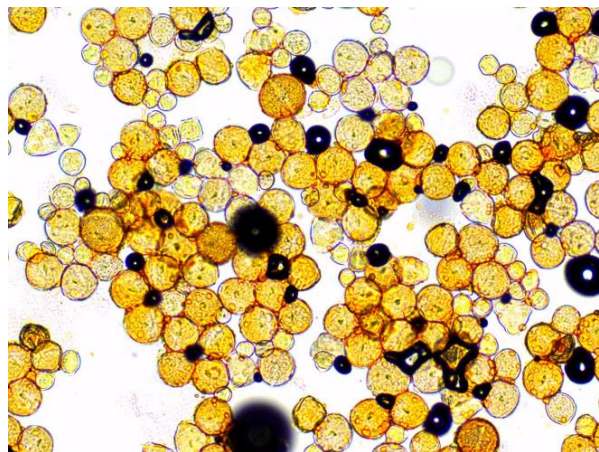
### Δείγμα γύρης II (Πελοπόννησος)



Εικόνα 5: δείγμα γύρης II

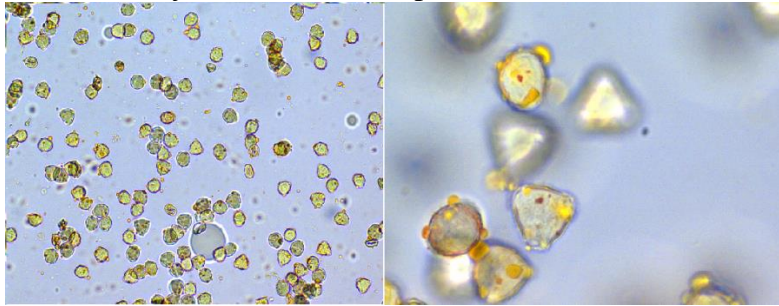
Στο δείγμα αυτό βρέθηκαν γυρεόκοκκοι από *Cistus* sp. (οικογένεια Cistaceae), *Verbascum* sp. (οικογένεια Scrophulariaceae), *Trifolium* sp. (οικογένεια Leguminosae), *Prunus* sp.(οικογένεια Rosaceae), *Rubus* sp. (οικογένεια Rosaceae), και *Asphodelus* sp. (οικογένεια Liliaceae). Επίσης βρέθηκαν σε μικρή ποσότητα γυρεόκοκκοι από *Persea americana* που είναι το γνωστό Avocado (οικογένεια Lauraceae) και *Quercus* sp.(οικογένεια Fagaceae). Η γύρη αυτή προέρχεται από διαφορετικά φυτικά είδη. Το δείγμα αποτελείται σε ποσοστό περίπου 70% από γυρεόκοκκους του είδους *Cistus* sp.

Κατά την μικροσκοπική παρατήρηση του δείγματος II φαίνεται η ποικιλία των διαφορετικών γυρεόκοκκων, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (10x).



Εικόνα 6: γενική εικόνα δείγματος 2

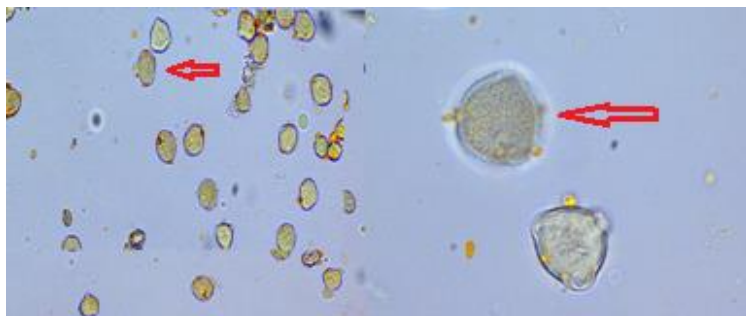
- Γυρεόκοκκοι του είδους *Verbascum* (Scrophulariaceae)



Εικόνα 7: γυρεόκοκκοι *Verbascum*

Ένα χαρακτηριστικό των γυρεόκοκκων του είδους *Verbascum* είναι το ωσειδές κατά τον ισημερινό άξονα σχήμα του κόκκου, που μεταπίπτει σε κυκλικό έως υποτριγωνοειδές κατά τον πολικό άξονα. Η επιφάνεια τους φέρει δικτυωτές πτυχώσεις

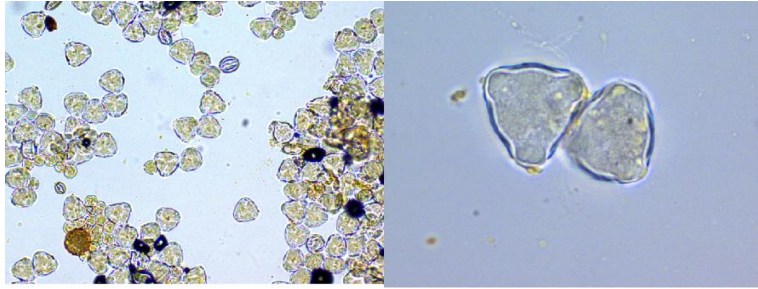
- Γυρεόκοκκοι του είδους *Trifolium* (Leguminosae)



Εικόνα 8: γυρεόκοκκοι *Trifolium*

Οι γυρεόκοκκοι του είδους *Trifolium* έχουν σχήμα ωσειδές, διαθέτουν τρεις κόλπους και τρεις πόρους (tricolporate). Οι κόλποι είναι επιμήκεις κατά τον ισημερινό άξονα αλλά δεν εκτείνονται σε όλο το μήκος του κόκκου. Το ανάγλυφο έχει μορφή δικτυώματος και χαρακτηρίζεται ως reticulate και scabrate, ενώ στους κόλπους εμφανίζεται λείο χωρίς στοιχεία εξίνης. Φέρει 3 χαρακτηριστικούς μαστούς, όπου κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση συνήθως μόνο ένας είναι ορατός κάθε φορά.

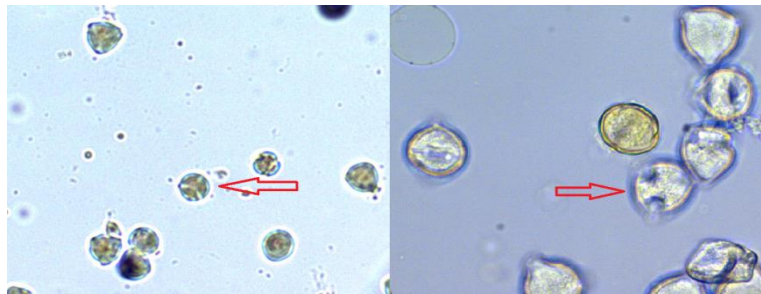
- Γυρεόκοκκοι της οικογένειας **Rosaceae**



**Εικόνα 9:** γυρεόκοκκοι *Rosaceae*

Οι γυρεόκοκκοι της οικογένειας Rosaceae (πιθανότατα *Prunus*) που βρέθηκαν στο δείγμα είναι τρίλοβοι, συμμετρικοί, με τρεις κόλπους, μεσαίου μεγέθους και έχουν παχύ διπλό τοίχωμα. Κατά τον ισημερινό άξονα ο κόκκος έχει υποτριγωνικό σχήμα, ενώ κατά τον πολικό άξονα το σχήμα είναι ελλειπτικό.

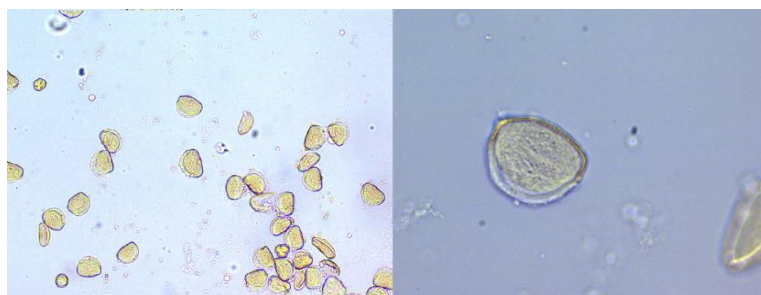
- Γυρεόκοκκοι *Rubus sp.* (Rosaceae)



**Εικόνα 10:** γυρεόκοκκοι *Rubus sp.*

Οι γυρεόκοκκοι του φέρουν τρεις κόλπους με χαρακτηριστικά μεγάλους πόρους.

- Γυρεόκοκκοι *Asphodelus sp.* (Liliaceae)



**Εικόνα 11:** γυρεόκοκκοι *Asphodelus sp.*

Οι γυρεόκοκκοι του γένους *Asphodelus sp.* (Liliaceae) έχουν σχήμα ημισφαιρικό με έντονη άλω.



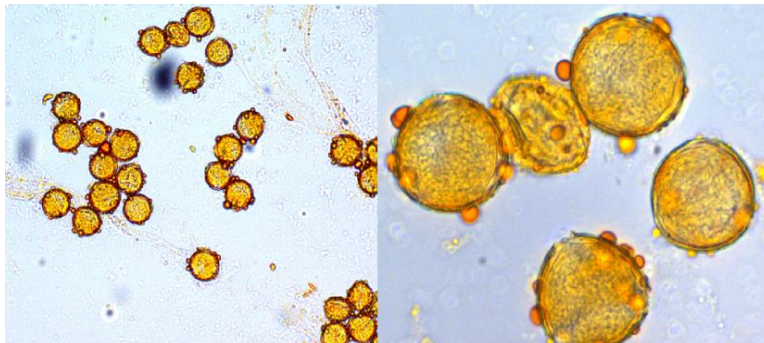
### Δείγμα γύρης III (Αττική)



Εικόνα 12: δείγμα γύρης III

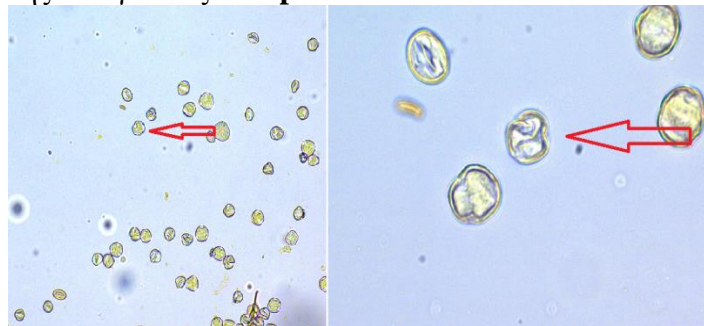
Σε αυτό το δείγμα ταυτοποιήθηκαν γυρεόκοκκοι από *Cistus* sp. (οικογένεια Cistaceae), *Papaver rhoeas* (οικογένεια Papaveraceae), καθώς και γυρεόκοκκοι που ανήκουν στην οικογένεια των Compositae (πιθανότατα *Carduus* sp.). Επίσης παρατηρήθηκαν γυρεόκοκκοι της οικογένειας Scrophulariaceae και Boraginaceae (πιθανόν του *Cynoglossum* sp.). Το δείγμα αποτελείται περίπου κατά 70% από *Cistus* sp.

- Γυρεόκοκκοι *Cistus* sp. (μελετήθηκαν και περιεγράφηκαν παραπάνω)



Εικόνα 13: γυρεόκοκκοι της οικογένειας *Cistus* sp.

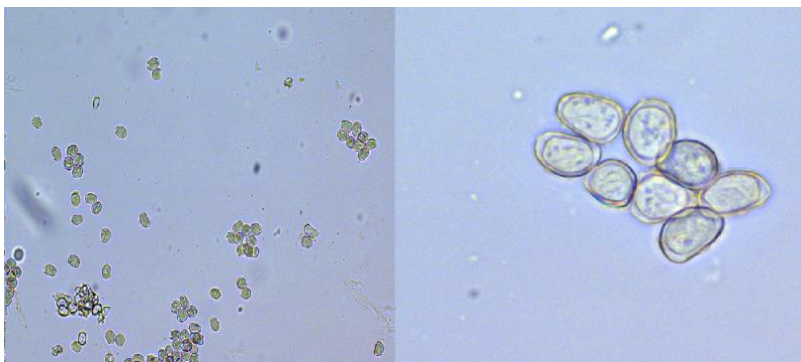
- Γυρεόκοκκοι της οικογένειας **Scrophulariaceae**



Εικόνα 14: γυρεόκοκκοι της οικογένειας *Scrophulariaceae*

Οι γυρέοκοκκοί της οικογένειας *Scrophulariaceae* είναι τριγωνικοί και φέρουν χαρακτηριστικούς κόλπους που κλίνουν προς τους πόλους, είτε προς σημεία που η μεμβράνη έχει διαρραγεί.

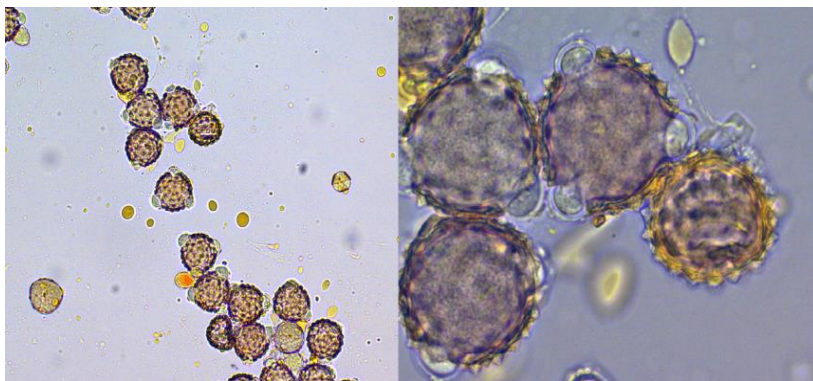
- Γυρέοκοκκοί της οικογένειας ***Boraginaceae***



**Εικόνα 15:** γυρέοκοκκοί της οικογένειας *Boraginaceae*

Οι γυρέοκοκκοί της οικογένειας *Boraginaceae* (πιθανόν *Cynoglossum* sp.) έχουν σχήμα ωσειδές και εμφανίζουν συνήθως τρεις κόλπους και τρεις πόρους (tricolpate ή heterocolpate).

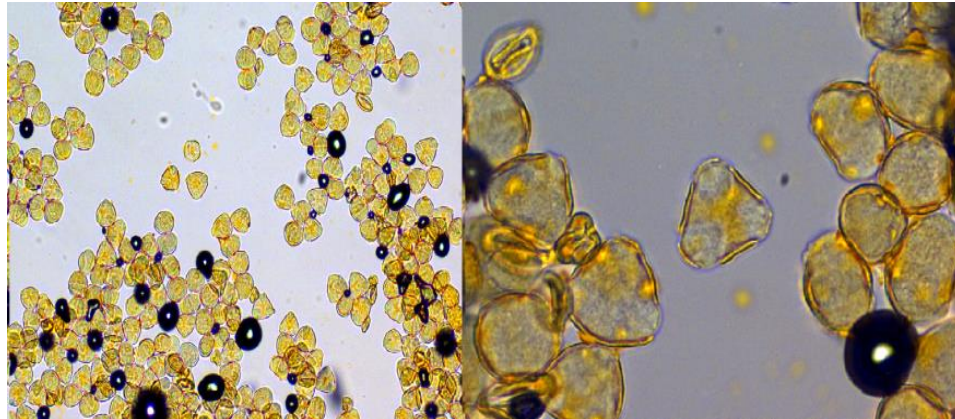
- Γυρέοκοκκοί της οικογένειας ***Compositae***



**Εικόνα 16:** γυρέοκοκκοί της οικογένειας *Compositae*

Οι γυρέοκοκκοί της οικογένειας *Compositae* έχουν σχήμα ωσειδές, με τρεις κόλπους ανοίγματος 4-8  $\mu\text{m}$  και τρεις πόρους ανοίγματος 0,8-3  $\mu\text{m}$ . Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτών των γυρέοκοκκων είναι η αγκαθωτή επιφάνεια.

- Γυρεόκοκκοι της οικογένειας **Papaveraceae**



Εικόνα 17: γυρεόκοκκοι της οικογένειας *Papaveraceae*

Οι γυρεόκοκκοι της οικογένειας *Papaveraceae* που παρατηρούνται στο δείγμα ανήκουν στους κολποφόρους γυρεόκοκκους αυτού του είδους, των οποίων η μεμβράνη φέρει τραχείς κόκκους.

### ***Συμπεράσματα Γυρεολογικής Μελέτης***

Από τη γυρεολογική μελέτη προέκυψε ότι το δείγμα, το οποίο αποτελείται κυρίως από γυρεόκοκκους του γένους *Cistus sp.* (98%), είναι το δείγμα **I** με προέλευση από την Κρήτη, το οποίο μπορεί να χαρακτηριστεί ως μονοποικιλιακό είδος γύρης. Δεδομένου ότι στην Κρήτη βρίσκεται κυρίως το είδος *Cistus creticus* από αυτό το γένος, το οποίο όπως προκύπτει από την γυρεολογική μελέτη αποτέλεσε τροφή για τις μέλισσες, θεωρήσαμε ως ιδιαίτερα ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη το δείγμα αυτό.

Το δείγμα **III** από τον νομό Αττικής περιέχει χαμηλότερο ποσοστό από γυρεόκοκκους του γένους *Cistus sp.* (περίπου 70%), ενώ στο δείγμα **II**, με προέλευση από την Πελοπόννησο, οι γυρεόκοκκοι αυτού του είδους είναι σε πολύ μικρό ποσοστό. Τα δυο τελευταία δείγματα χαρακτηρίζονται ως πολυποικιλιακά είδη γύρης.

Προκειμένου να αξιολογήσουμε περαιτέρω τα δείγματά μας προβήκαμε σε έλεγχο φαινολικού περιεχομένου και αντιοξειδωτικής δράσης.

### 3. ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ, ΟΛΙΚΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ, ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ

Από κάθε γύρη, επιλέχθηκαν βουτανολικά και μεθανολικά εκχυλίσματα καθώς σε αυτά αναμένεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων, οι οποίες έχουν αντιοξειδωτική δράση. Ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών πραγματοποιήθηκε σε ισοδύναμα γαλλικού οξέως αλλά και σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέως. Προσδιορίστηκαν τα ολικά φαινολικά και ολικά φλαβονοειδή και εκφράστηκαν ανά γραμμάριο εκχυλίσματος σε κάθε δείγμα γύρης. Στη συνέχεια έγινε σύγκριση της ικανότητας τους για εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών ABTS<sup>·+</sup> και DPPH<sup>·</sup>.

#### 3.1 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-ciocalteu

##### *Περιγραφή μεθόδου*

Για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin-Ciocalteu τα βήματα της οποίας αναγράφονται παρακάτω. Η μέθοδος Folin-Ciocalteu αρχικά χρησιμοποιήθηκε το 1927 για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών (Folin & Ciocalteu, 1927) και είναι επίσης γνωστή ως μέθοδος GAE (Gallic Acid Equivalence). Η μέθοδος αργότερα βελτιώθηκε από τους *Singleton και Rossi* (Singleton, 1965) οπότε και έγινε πολύ δημοφιλής. Από τότε χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό ολικών φαινολικών διαφόρων φυσικών προϊόντων αλλά και για τον προσδιορισμό θειολών, νουκλεοτιδίων, τριοζών, γλυκεραλδευδης και ανόργανων συστατικών (Singleton, 1999).

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι μείγμα μολυβδαινικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ), βολφραϊμικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ), και φωσφορικού οξέος ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Παρασκευάζεται με ανάμιξη  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , π.ΗCl, 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  σε ύδωρ και βράσιμο για 10 ώρες. Κατόπιν προστίθεται  $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  που του δίνει ένα χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Σχηματίζονται  $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  και  $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  και η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η αναγωγή του Mo(VI) σε Mo(V) με μεταφορά ενός ηλεκτρονίου (Singleton, 1965). Προκαλεί οξείδωση των φαινολικών ενώσεων με ταυτόχρονη αναγωγή των οξέων. Η αντίδραση αυτή βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων, οπότε το πολυφαινολικό προφίλ που προσδιορίζεται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu παρουσιάζει πολύ καλή γραμμική συσχέτιση με την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος. Καθώς σχηματίζεται ένα φαινολικού ανιόν, αυτό ανάγει το αντιδραστήριο σχηματίζοντας ένα βαθύ μπλε σύμπλοκο μολυβδαινίου-βολφραμίου χαρακτηριστικής μπλέ απόχρωσης που απορροφά στο ορατό σε μήκος κύματος 725-750 nm (Singleton, 1965). Πρέπει να τονιστεί επίσης ότι οι φαινολικές ενώσεις για να αντιδράσουν με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu απαιτούν βασικό περιβάλλον γι' αυτό πριν από την προσθήκη του αντιδραστήριου το pH του δείγματος πρέπει να γίνεται βασικό (pH=10) και αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Να

σημειωθεί ότι δεν γίνεται διαχωρισμός των μονομερών, διμερών και ανώτερων φαινολικών συστατικών.

Το ολικό φαινολικό φορτίο υπολογίζεται από την καμπύλη αναφοράς του γαλλικού οξέος (GA, πρότυπη ουσία), και εκφράζεται σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (mg/g εκχυλίσματος), ενώ εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπη ουσία το καφεϊκό οξύ, οπότε το ολικό φαινολικό φορτίο εκφράζεται σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (Caffeic Acid Equivalents, CAE)/g εκχυλίσματος.

Για τη μέτρηση των απορροφήσεων των διαλυμάτων στα 765 nm, στο πείραμα που χρησιμοποιήθηκε γαλλικό οξύ, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Infinite M200 PRO TECAN reader.

Στο πρώτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας έγινε η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς ενώ ακολούθως πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για πυκνά και αραιά διαλύματα των εκχυλισμάτων. Οι μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο UV-VIS έγιναν εις διπλούν ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη επαναληψιμότητα και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (Caffeic Acid Equivalents, CAE)/g εκχυλίσματος.

### ***Οργανολογία***

- Τα εκχυλίσματα μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-1700 series Pharmaspec της εταιρίας Shimadzu ρυθμισμένο στα 725nm Οι λάμπες του οργάνου ήταν μια λάμπα αλογόνου (Halogen WI) και μια λάμπα δευτερίου (Deuterium D2).
- Κυψελίδες μιας χρήσης διαμέτρου 1dm.
- Πιπέτες ακριβείας των 100μl και των 1000μl της εταιρείας Gilson.
- Συσκευή μηχανικής ανάδευσης (Vortex)
- Eppendorf

### ***Διαδικασία***

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε για τα μεθανολικά εκχυλίσματα της γύρης 2 και γύρης 3, καθώς και για το βουτανολικό εκχύλισμα της γύρης I. Κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέως και στη συνέχεια έγιναν μετρήσεις για τα πυκνά και αραιά διαλύματα των εκχυλισμάτων. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια, ελήφθησαν δυο τιμές για κάθε μέτρηση με το φασματοφωτόμετρο UV-Vis και η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές

### **Κατασκευή καμπύλης αναφοράς**

Η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς γίνεται με εύρος συγκέντρωσης καφεϊκού οξέος από 0-10μg /ml MeOH . Αρχικά προστέθηκε η ποσότητα νερού αντίστοιχη για κάθε συγκέντρωση ενώ ακολουθούν οι αντίστοιχες ποσότητες του Δ2 (αραιό καφεϊκό οξύ συγκέντρωσης 250μl/ml MeOH). Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 60 μL από το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu σε κάθε Eppendorf (ανά 30 sec) και μετά από την πάροδο 3 λεπτών προστέθηκαν 120 μL κορεσμένου διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ανά 30 sec). Στο επόμενο βήμα, σε κάθε Eppendorf προστέθηκαν 420μl υπερκάθαρου νερού έως ότου ο συνολικός όγκος ανά Eppendorf να φτάνει τα 1,2 ml. Τέλος κάθε Eppendorf ανακινείται σε Vortex για 1-2sec και τα δείγματα αφήνονται για 1h σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος προτού φωτομετρηθούν. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι ποσότητες για κάθε αντιδραστήριο:

**Πίνακας 1:** Σύσταση πρότυπων διαλυμάτων καφεϊκού οξέως

Κωδικός Δείγματος	μg καφεϊκού οξέος	μl ddH <sub>2</sub> O	μl Δ2	μl Follin	μl Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Τυφλό	0	600	0	60	120
2a/b	1	596	4	60	120
3a/b	2	592	8	60	120
4a/b	4	584	16	60	120
5a/b	6	576	24	60	120
6a/b	8	568	32	60	120
7a/b	10	560	40	60	120
8a/b	12	552	48	60	120

### **Προετοιμασία δειγμάτων**

Ζυγίστηκαν 10 mg εκχυλίσματος και διαλύθηκαν σε 1 mL MeOH για το πυκνό δείγμα. Κατόπιν το δείγμα αυτό αραιώθηκε 10 φορές, δηλαδή στα 100 μL πυκνού δείγματος προστέθηκαν 900 μL MeOH προκειμένου να παρασκευάσουμε το αραιό δείγμα. Για κάθε εκχύλισμα, ετοιμάστηκαν δύο πυκνά δείγματα καθώς και δύο αραιά δείγματα, ώστε η φωτομέτρηση να είναι όσο το δυνατόν ακριβέστερη και εντός της γραμμικού τμήματος απορρόφησης της καμπύλης αναφοράς. Για τη μέτρηση των δειγμάτων προστέθηκαν 50μl από κάθε αραιό και κάθε πυκνό διάλυμα στα eppendorf. και έπειτα 550 μL απεσταγμένο νερό και ακολουθείται η ίδια διαδικασία με αυτήν που περιεγράφηκε παραπάνω. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρήθηκε στα 725 nm.

### **Υπολογισμός απορρόφησης δειγμάτων**

Για κάθε δείγμα υπολογίζεται αρχικά η συγκέντρωση του βάσει της απορρόφησης και της εξίσωσης ελαχίστων τετραγώνων,  $y=ax+\beta$ , που προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς.

(σχέση 1). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εκφρασμένα σε ισοδύναμα καφεϊκού οξέος (caffeic acid equivalents, CAE)/g εκχυλίσματος όπως αυτά προέκυψαν με βάση τη σχέση 2, η οποία προκύπτει βάση των αραιώσεων ανά δείγμα:

$$C_{\text{δείγματος}} = (A_{\text{δείγματος}} - \beta) / \alpha \quad (1)$$

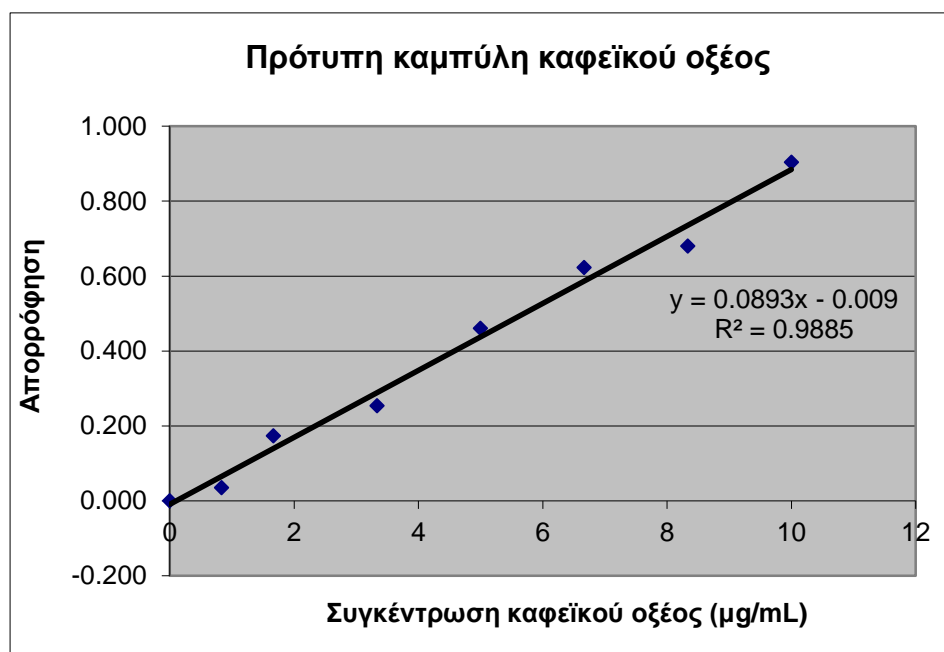
$$\text{mgCAE} / \text{g εκχυλίσματος} = (C_{\text{δείγματος}} \times 1,2 \text{ml} \times 1000 \text{mg}) / 50 \text{mg} \quad (2)$$

### Αποτελέσματα

Πίνακας 2: Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων καφεϊκού οξέως για το δείγμα γύρης 1

Συγκέντρωση (μg/mL)	Μέσος όρος απορρόφησης	Τιμή 1	Τιμή 2
0	0.000	0.000	0.000
1	0.035	0.025	0.045
2	0.174	0.160	0.187
3	0.254	0.250	0.257
5	0.461	0.476	0.445
7	0.623	0.654	0.591
8	0.680	0.649	0.711
10	0.904	0.968	0.839

Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς καφεϊκού που χρησιμοποιήθηκε για το δείγμα γύρης 1



Πίνακας 3: Απορροφήσεις δείγματος γύρης 1

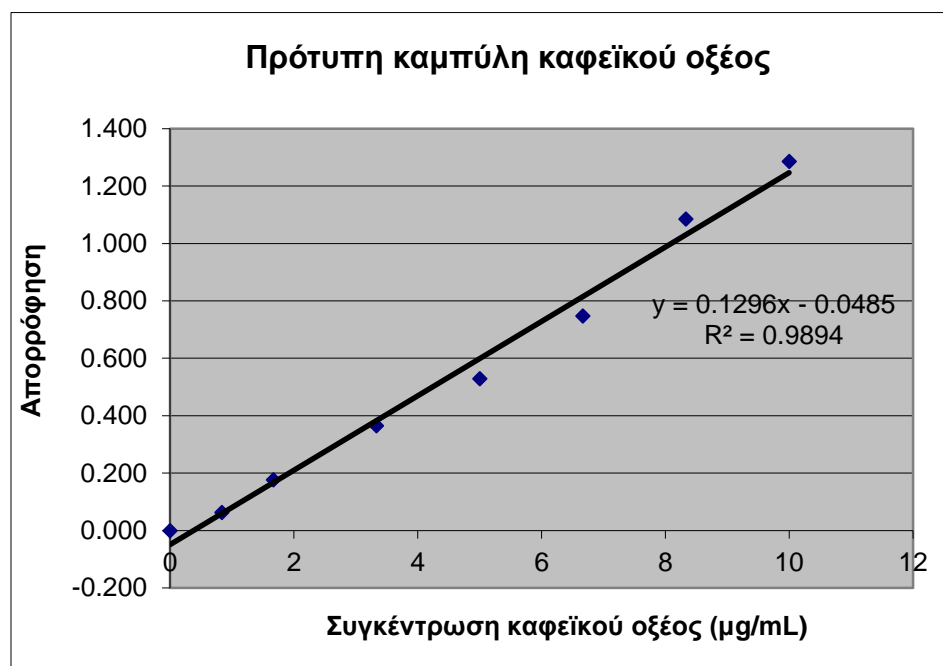
<u>Δείγμα</u>	<u>A</u>	<u>M.O. απορροφήσεων</u>
αραιό διάλυμα 1	0.269	0.285
αραιό διάλυμα 2	0.301	

Στη συνέχεια, με βάση την εξίσωση (2) υπολογίστηκε ότι η συγκέντρωση των ολικών φαινολικών στο βουτανολικό εκχύλισμα της γύρης 1 είναι **79.01 mgCAE/gεκχυλίσματος**.

**Πίνακας 4:** Απορροφήσεις πρότυπων διαλυμάτων καφεϊκού οξέως για τα δείγματα γύρης 2 και 3

συγκέντρωση (μg/mL)	μέσος όρος απορροφησης	Τιμή 1	Τιμή 2
0	0.000	0.000	0.000
1	0.064	0.063	0.064
2	0.177	0.179	0.175
3	0.366	0.356	0.375
5	0.530	0.560	0.499
7	0.748	0.712	0.783
8	1.085	1.011	1.159
10	1.286	1.321	1.251

**Διάγραμμα 2:** Καμπύλη αναφοράς καφεϊκού που χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα γύρης 2 και 3



**Πίνακας 5:** Απορροφήσεις δειγμάτων γύρης 2 και 3

<u>Δείγμα</u>	<u>A (διάλυμα 1)</u>	<u>A( διάλυμα 2)</u>	<u>μέσος όρος απορροφήσεων</u>	<b>ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ</b> (mgCAE/gεκχυλίσματος)
αραιό διάλυμα γύρης 2	0.234	0.235	0.235	<b>52.50</b>
αραιό διάλυμα γύρης 3	0.185	0.193	0.189	<b>43.98</b>



Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, με πρότυπο το γαλλικό οξύ. Αυτό έγινε με σκοπό την σύγκριση των αποτελεσμάτων από τις δυο διαφορετικές διαδικασίες και την αξιολόγησή τους.

Τα αποτελέσματα ολικών φαινολικών (total phenolic content-TPC) με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (εκφρασμένο σε ισοδύναμα γαλλικού οξέως, GAE) έχουν ως εξής

<b>ΔΕΙΓΜΑ</b>	<b>ΟΛΙΚΑ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ</b> (mg GAE / g extract)
γύρη <b>I</b>	<b>60.2±2.0</b>
γύρη <b>II</b>	<b>28.7±0.7</b>
γύρη <b>III</b>	<b>15.2±0.4</b>

Συμπέρασμα: Παρατηρούμε ότι η γύρη **I** που αποτελείται κυρίως από *Cistus* sp. δίνει και με τις δυο διαδικασίες τα υψηλότερα ποσοστά σε ολικά φαινολικά συγκριτικά με τα άλλα δύο δείγματα γύρης ενώ ακολουθεί το δείγμα **II** που περιέχει ποσοστό 70% από το γένος *Cistus*.

Επίσης από την σύγκριση των δυο διαφορετικών διαδικασιών προκύπτει ότι δεν υπάρχει μια σταθερή αναλογία στην έκφραση των αποτελεσμάτων μεταξύ καφεϊκού και γαλλικού οξέος αλλά και στις δυο διαδικασίες τα δείγματα ακολουθούν την ίδια φθίνουσα πορεία ως προς την περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά (δείγμα **I**>δείγμα **II**>δείγμα **III**).

### **3.2 Προσδιορισμός ολικών φλαβονοειδών με τη μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου (AlCl<sub>3</sub>)**

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας ενός δείγματος σε φλαβονοειδή (συγκεκριμένα φλαβόνες και φλαβονόλες) και βασίζεται στο σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων μεταξύ των καρβονυλικών και υδροξυλικών ομάδων των φλαβονοειδών και των ιόντων Al<sup>3+</sup>, τα οποία απορροφούν στην περιοχή του ορατού (415 nm). Το αντιδραστήριο αποτελεί το διάλυμα AlCl<sub>3</sub> 2-10% (w/v) και μπορεί να εφαρμοστεί παρουσία διαλύματος οξέων ή οξικών αλάτων.

Τα ολικά φλαβονοειδή υπολογίζονται από την καμπύλη αναφοράς της κερκετίνης (πρότυπη ουσία) και εκφράζονται σε ισοδύναμα κερκετίνης (mg/g εκχυλίσματος).

Για τη μέτρηση των απορροφήσεων των διαλυμάτων στα 415 nm χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Infinite M200 PRO TECAN reader.

## Αποτελέσματα

ΔΕΙΓΜΑ	ΟΛΙΚΑ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ (mg QE / g extract)
γύρη I	57.6±2.0
γύρη II	9.0±0.4
γύρη III	6.0±0.3

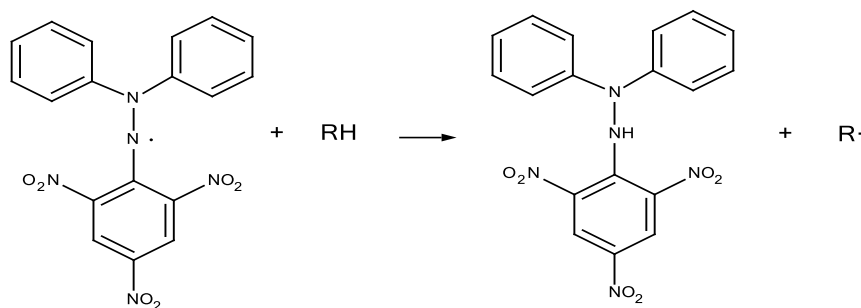
Συμπέρασμα: Οι διαφορές ανάμεσα στα δείγματά μας όσον αφορά τα ολικά φλαβονοειδή είναι μεγάλες καθώς η γύρη 1 έχει το τετραπλάσιο φορτίο από την γύρη 2 (57.6mg QE / g εκχυλίσματος έναντι 9.0mg QE / g εκχυλίσματος) και δεκαπλάσιο από τη γύρη 3 (6.0mg QE / g εκχυλίσματος). Παρατηρούμε και εδώ γνωρίζοντας και τα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ότι και τα φλαβονοειδή ακολουθούν στα υπό εξέταση δείγματα την ίδια φθίνουσα πορεία ως προς την περιεκτικότητά τους (δείγμα 1>δείγμα 2>δείγμα 3).

### 3.3 Αντιοξειδωτικοί έλεγχοι

#### Αρχές μεθόδων

#### Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης με αναστολή της ελεύθερης ρίζας DPPH·

Η 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλική ρίζα (DPPH·) είναι μία σταθερή ελεύθερη ρίζα, η οποία παρουσιάζει ένα βαθύ ιώδες χρώμα και μία ισχυρή ζώνη απορρόφησης στα 515-520 nm (συνήθως μετράται στα 517 nm). Παρουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων, η ρίζα DPPH μπορεί να δεχτεί ένα ηλεκτρόνιο ή ένα άτομα υδρογόνου από το αντιοξειδωτικό μόριο, οπότε μετατρέπεται στην περισσότερο σταθερή 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζίνη, σύμφωνα με την αντίδραση:



1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλική  
ρίζα (DPPH·)

1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζίνη

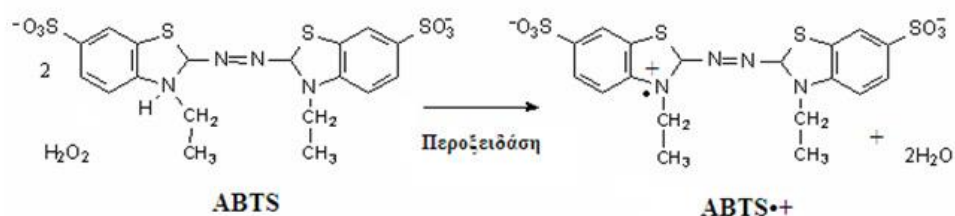
Καθώς η 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζίνη έχει ωχροκίτρινο χρώμα, είναι εφικτός ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας μίας ουσίας ή ενός μίγματος ουσιών

μετρώντας την αλλαγή του χρώματος φασματοφωτομετρικά. Όσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών των αντιοξειδωτικών ενώσεων, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αποχρωματισμός του διαλύματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται συνήθως ως το ποσοστό % αναστολής (ή δείκτης αναστολής) της ελεύθερης ρίζας DPPH·.

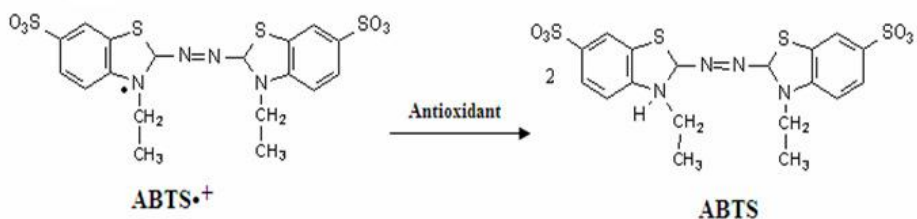
Για τη μέτρηση των απορροφήσεων των διαλυμάτων στα 517 nm χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Infinite M200 PRO TECAN reader.

#### Έλεγχος αντιοξειδωτικής δράσης με αναστολή της ελεύθερης ρίζας ABTS<sup>•+</sup>

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να αντιδρούν με τη ρίζα ABTS<sup>•+</sup>, η οποία έχει μπλε χρώμα και παρουσιάζει χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης με μέγιστα στα 414, 645, 734 και 815 nm, προκαλώντας αποχρωματισμό του διαλύματος αυτής. Ο βαθμός του αποχρωματισμού, ως ποσοστό αναστολής της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>, προσδιορίζεται ως μία συνάρτηση της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και του χρόνου της επώασης. Η ρίζα ABTS<sup>•+</sup> παράγεται με οξείδωση του αντιδραστηρίου 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) από το υπερθειικό κάλιο (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>).



Παραγωγή της ρίζας ABTS<sup>•+</sup>



Αντίδραση με το αντιοξειδωτικό

Με σκοπό την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων, προσδιορίζεται η μεταβολή της απορρόφησης διαλύματος της ρίζας, συνήθως στα 734 nm, ενώ οι υπολογισμοί γίνονται σε σχέση με τη δραστηκότητα του Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) ως πρότυπη ουσία αναφοράς, στις ίδιες συνθήκες.

Για τη μέτρηση των απορροφήσεων των διαλυμάτων στα 734 nm χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Infinite M200 PRO TECAN reader.

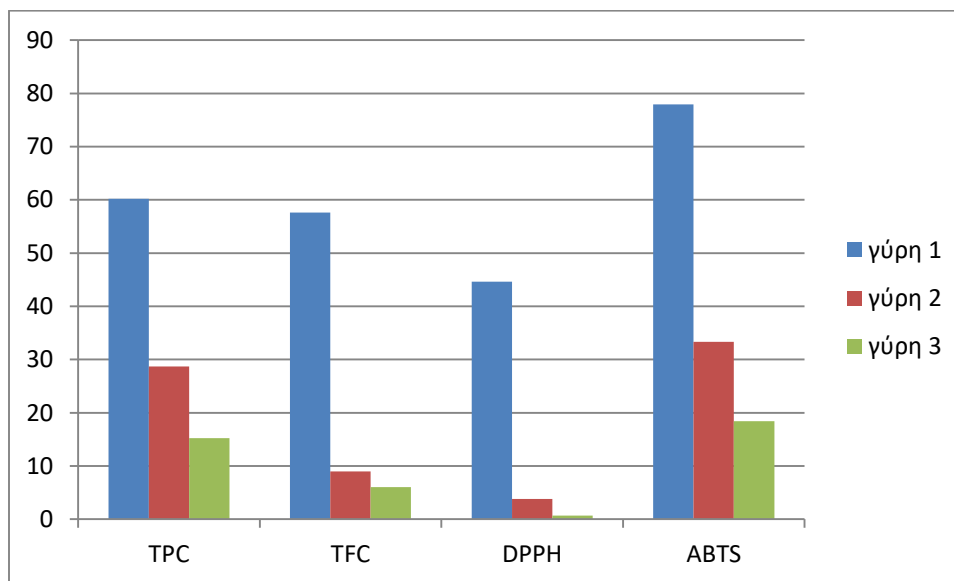
#### Αποτελέσματα

ΔΕΙΓΜΑ	DPPH		ABTS	
	% inhibition (200 µg / mL)	IC <sub>50</sub> (µg / mL)	% inhibition (100 µg /mL)	IC <sub>50</sub> (µg / mL)
γύρη 1	44.6±3.8	233.3±6.1	77.9±0.8	56.2±0.8
γύρη 2	3.8±0.6	ND	33.3±1.8	ND
γύρη 3	0.7±0.0	ND	18.4±0.7	ND

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα με όρους τυπικής απόκλισης (n=3)  
 IC<sub>50</sub> : ελάχιστη συγκέντρωση ικανή να προκαλέσει αναστολή 50%,  
 ND : μη ανιχνεύσιμη

### 3.4 Συμπεράσματα προσδιορισμού ολικών φαινολικών, ολικών φλαβονοειδών και αντιοξειδωτικών ελέγχων

**Γράφημα 1:** Σύγκριση αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων και φαινολικού φορτίου των τριων δειγμάτων γύρης



Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων δείχνει ότι η γύρη **I** έχει σχεδόν διπλάσια περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά ανά γραμμάριο εκχυλίσματος (60.2 mg GAE / g εκχυλίσματος) από τη γύρη **II** (28.7 mg GAE / g εκχυλίσματος), ενώ σε σύγκριση με τη γύρη **III** έχει τετραπλάσια (15.2 mg GAE / g εκχυλίσματος).

Τα δείγματα του παρόντος πειράματος είναι πιο πλούσια σε φαινολικά σε σχέση με μεθανολικά εκχυλίσματα δειγμάτων γύρης από τη Πορτογαλία (Morais et al, 2011), όπου τα ολικά φαινολικά κυμαίνονταν από 10,5-16,8 mg GAE / g εκχυλίσματος, από δείγματα γύρης Βραζιλίας (3,6-10,9 mg GAE / g εκχυλίσματος ) (Carpes et al., 2007), όπως και από δείγματα μονοποικιλιακής γύρης διαφορετικών ειδών από τη Ρουμανία (4,4-16,48 mg GAE / g εκχυλίσματος) (Marghitas et al., 2009).

Οι διαφορές ανάμεσα στα δείγματά μας είναι ακόμα μεγαλύτερες όσον αφορά τα ολικά φλαβονοειδή, καθώς η γύρη **I** έχει το τετραπλάσιο φορτίο από την γύρη **II** (57.6mg QE / g εκχυλίσματος έναντι 9.0mg QE / g εκχυλίσματος) και δεκαπλάσιο από τη γύρη **III** (6.0mg QE / g εκχυλίσματος). Σε σύγκριση με άλλες βιβλιογραφικές μελέτες (Araujo et al., 2017) η γύρη **I** είναι πιο πλούσια σε φλαβονοειδή σε σχέση με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας ενώ τα δείγματα γύρης **II** και **III** είναι στον άνω μέσο όρο.

Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών ελέγχων, όπου καλύτερη δράση παρουσιάζει το δείγμα της γύρης **I** με μεγάλη διαφορά από τα άλλα δυο δείγματα.

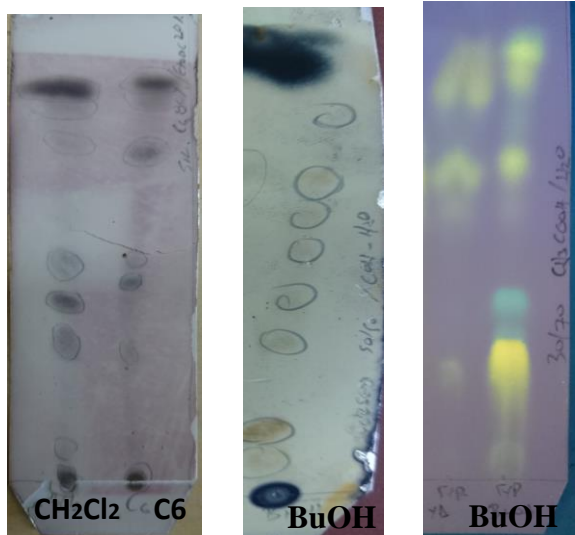
Στον έλεγχο αναστολή της ελεύθερης ρίζας  $ABTS^{\cdot+}$ , η γύρη **III** εμφανίζει την πιο ασθενή δράση, με 18.4% ικανότητα αναστολής σε συγκέντρωση 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , ενώ στην ίδια συγκέντρωση η γύρη **II** επιτυγχάνει ικανότητα αναστολής 33.3%. Η γύρη **I** υπό τις ίδιες συνθήκες μπορεί να αναστείλει την οξείδωση υπερδιπλάσιου ποσοστού της ρίζας  $ABTS^{\cdot+}$  (77.9%). Για τη ρίζα  $DPPH^{\cdot}$  η γύρη **I** μπορεί να αναστείλει την οξείδωσή της κατά 44.6%, σε συγκέντρωση 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ενώ για τα δείγματα γύρης **II** και **III** το ποσοστό ήταν μόνο 3.8% και 0.7% αντίστοιχα. Σε σύγκριση με προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, η γύρη **I** εμφανίζει παρεμφερή ικανότητα αναστολής της ρίζας  $DPPH^{\cdot}$  ( $IC_{50}= 0.23 \text{ mg}/\text{ml}$ ) σε σχέση με πολυποικιλιακό δείγμα γύρης ( $IC_{50}= 0.18\text{mg}/\text{ml}$ ) (Graikou et al., 2011).

#### 4. ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΓΥΡΗΣ Ι

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα του γυρεολογικού ελέγχου όπου το δείγμα γύρης Ι αποτελείται κυρίως από γυρεοκόκκους του γένους *Cistus* αλλά και από τα αποτελέσματα των αντιοξειδωτικών ελέγχων όπου το ίδιο δείγμα έδειξε την καλύτερη δράση με μεγάλη διαφορά σε σχέση με τα άλλα δυο δείγματα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το δείγμα γύρης Ι παρουσιάζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον, λόγω του μονοποικιλιακού του φορτίου αλλά και λόγω των αποτελεσμάτων των προκαταρκτικών ελέγχων που διεξήχθησαν.

Έτσι συνεχίσαμε την εργασία με την χημική μελέτη του δείγματος γύρης Ι. Περίπου 27,5 g γύρης εκχυλίστηκαν με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας: κυκλοεξάνιο, διχλωρομεθάνιο, βουτανόλη, νερό. Η εκχύλιση έγινε με εμβάπτιση του φυτικού υλικού σε 150ml διαλύτη με χρήση υπερήχων. Η διαδικασία της εκχύλισης έγινε δυο φορές για κάθε διαλύτη. Τα εκχυλίσματα κάθε διαλύτη συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση μέχρι ξηρού και ζυγίστηκαν. Τα τελικά βάρη κάθε εκχυλίσματος ήταν:

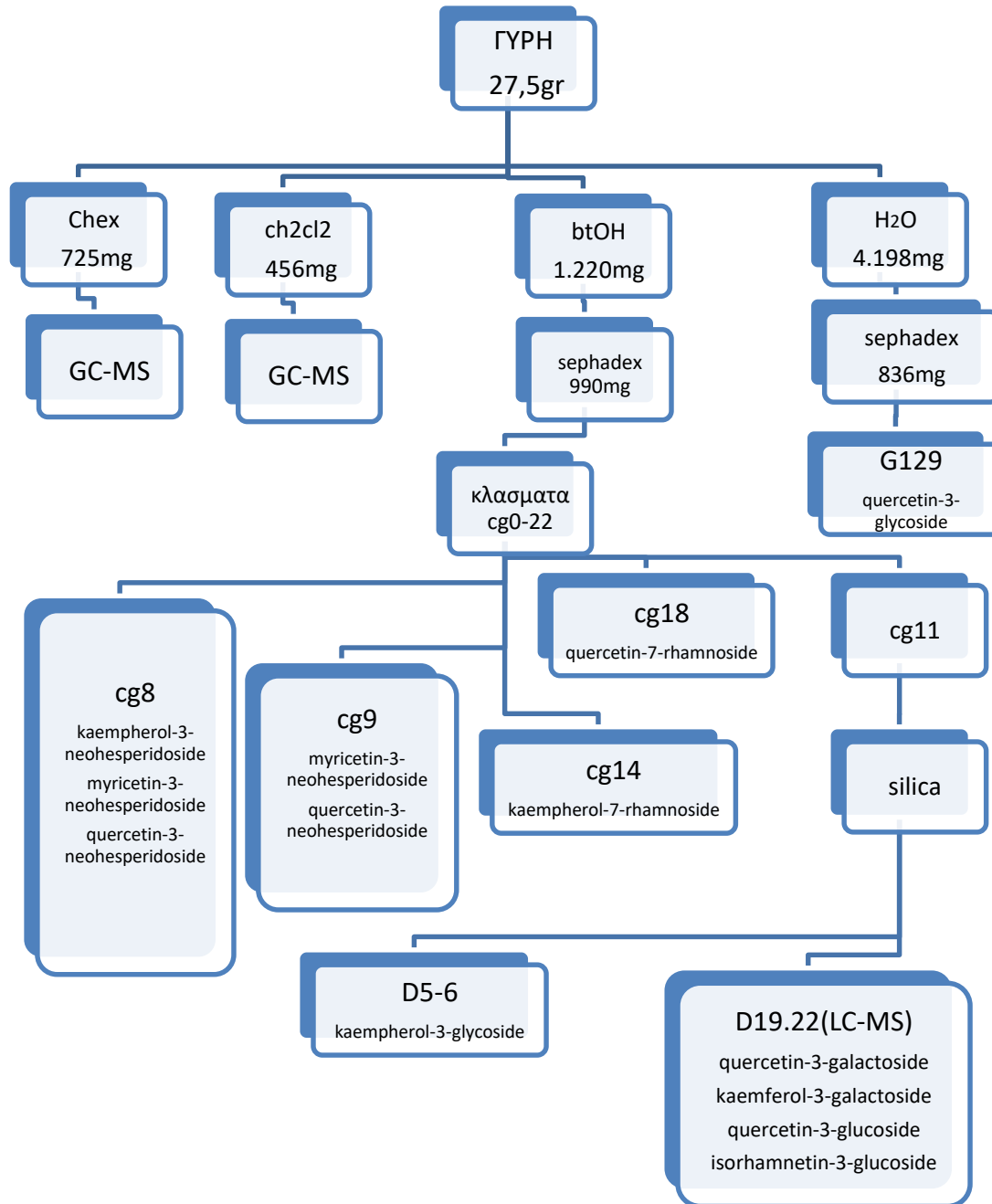
- Κυκλοεξανικό: 725mg
- Διχλωρομεθανικό: 456mg
- Βουτανολικό: 1,22g
- Υδατικό: 4,20g



**Εικόνες 18-20:** TLC κλασμάτων CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και C6 SIL σε C6:EtOAc(80:20) και BuOH κλάσμα SIL σε MeOH:H<sub>2</sub>O(50:50) και CEL σε AcOH:H<sub>2</sub>O(30:70)

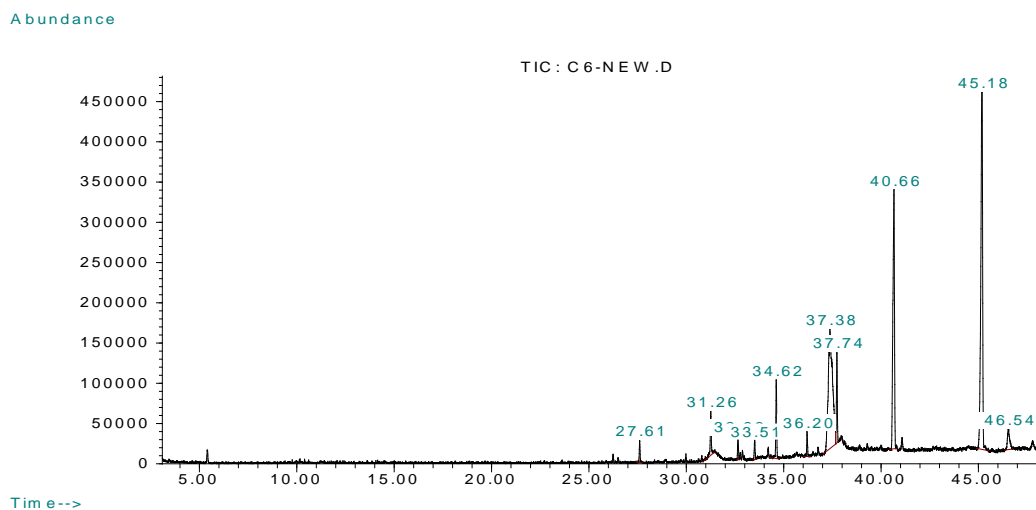
Συνοπτικά η όλη διαδικασία που ακολουθήθηκε για το κάθε εκχύλισμα, οι μέθοδοι που επιλέχθηκαν για την μελέτη τους αλλά και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τους διαχωρισμούς των συστατικών και την ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών, παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΜΕΛΕΤΗΣ



#### 4.1 Μελετη χρωματογραφηματων gc-ms κυκλοεξανικου και διγλωρομεθανικου εκχυλισματος του δειγματος της γυρης I

##### Κυκλοεξανικο εκχυλισμα



**Εικόνα 21:** Χρωματογράφημα gc-ms κυκλοεξανικου εκχυλίσματος δείγματος γυρης I

**Πίνακας 6:** Αποτελέσματα gc-ms ανάλυσης κυκλοεξανικου εκχυλίσματος γυρης I

Ουσία	Ποσοστό %
nonanal	<b>0.68</b>
manoyl oxide	<b>0.40</b>
n-heneicosane	<b>1.02</b>
24- methylene-cholesterol	<b>1.09</b>
eicosyne	<b>0.89</b>
pentacosane	<b>3.94</b>
hexacosane	<b>1.17</b>
fucosterol	<b>26.57</b>
heptacosane	<b>4.34</b>
nonacosanol	<b>20.95</b>
n-hentriacontanol	<b>34.84</b>
vit E	<b>2.43</b>
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>98.32</b>



Τα κυκλοεξανικό εκχύλισμα της γύρης **I** υποβλήθηκε σε αέριο χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μάζας (GC-MS, θερμοκρασιακό πρόγραμμα I). Από το χρωματογράφημα ανιχνεύθηκαν αλειφατικοί υδρογονάνθρακες μεγάλης αλύσου όπως eicosane (C20), heneicosane (C21), pentacosane (C25) και heptacosane (C27). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη (Bashir et al., 2013) που βρίσκει μεγαλύτερα ποσοστά αλειφατικών υδρογονανθράκων μεγάλης αλύσου (C>20) σε δείγματα γύρης προερχόμενα από πόες σε σχέση με αυτά των δέντρων.

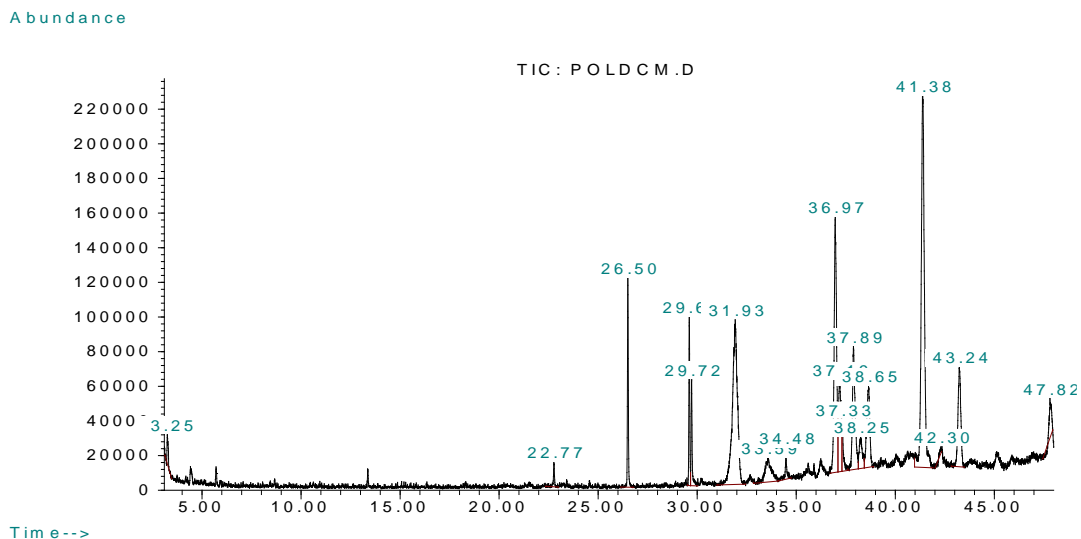
Επίσης, σε μεγάλο ποσοστό, βρέθηκε η αλκοόλη n-hentriacontanol (C31) (34.84%), η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει βρεθεί στο παρελθόν σε γύρη από *Typha orientalis* (Bin et al., 1998) αλλά και σε πρόπολη (Duran et al., 2008), (Kaškonienė et al., 2014). Προσδιορίστηκε επίσης σε αρκετά μεγάλο ποσοστό (20,97%) η αλκοόλη nonacosanol (C29), η οποία με βάση την βιβλιογραφία έχει εντοπισθεί σε γύρη (Bashir et al., 2013) Αλλά και το αλκίνιο eicosine είχε βρεθεί σε δείγμα πρόπολης από την Πολωνία (Maciejewicz et al., 1982). Επίσης προσδιορίστηκαν φυτοστερόλες όπως η 24-μεθυλεν-χοληστερόλη και η φουκοστερόλη. Η τελευταία ανιχνεύτηκε σε μεγάλο ποσοστό (26,57%), όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς είναι από τα πλέον γνωστά βιοδραστικά συστατικά της γύρης (Campos et al., 2010).

Ακόμα, η ανάλυση GC-MS υπέδειξε την ύπαρξη βιταμίνης E σε αρκετά μεγάλο ποσοστό (2.43%). Η περιεκτικότητα σε βιταμίνη E έχει προταθεί σαν δείκτης φυτικής προέλευσης της γύρης, σε δείγματα από τη Βραζιλία (Oliveira et al., 2009).

Η ανίχνευση manoyl oxide ακόμα και σε μικρό ποσοστό (0.40%) αποτελεί ενδιαφέρον στοιχείο, καθώς αυτή η ένωση και τα ισομερή της έχουν απομονωθεί από τα φύλλα του *Cistus creticus* L. και έχουν κυτταροστατική δράση έναντι λευχαιμικής σειράς κυττάρων (Demetzos et al., 2001).

## Διχλωρομεθανικό εκχύλισμα

Στο διχλωρομεθανικό εκχύλισμα έγινε μελέτη μέσω GC-MS (Θερμοκρασιακό πρόγραμμα I ), αφού πρώτα το δείγμα είχε σιλιλιωθεί.



Εικόνα 22: Χρωματογράφημα gc-ms διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος δείγματος γύρης 1

Πίνακας 7: Αποτελέσματα gc-ms ανάλυσης σιλιλιωμένου διχλωρομεθανικού εκχυλίσματος γύρης 1

ουσία	ποσοστό %	ουσία	ποσοστό %
decanoic acid	0.55	sucrose	13.14
propanedioic acid (malonic acid)	2.59	sugar	5.08
hexadecanoic acid (palmitic acid)	4.05	sugar	2.07
$\alpha$ -linolenic acid	3.18	isofucosterol	5.39
linoleic acid	2.32	sucrose	25.25
24-methylen- cholesterol	17.44	sugar	6.07
fructose	4.37	maltose	4.03

Στο διχλωρομεθανικό εκχύλισμα προσδιορίστηκαν σάκχαρα σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50%. Υψηλή είναι και η συγκέντρωση λιπαρών οξέων ευθείας αλυσού (straight chain fatty acid's – SCFA;s) όπως το παλμιτικό οξύ. Επιπλέον προσδιορίστηκε η ύπαρξη των δυο βασικών ακόρεστων λιπαρών οξέων, δηλαδή του λινολεϊκού και του  $\alpha$ -λινολενικού οξέως σε ποσοστό 3.18% και 2.32% αντίστοιχα. Προηγούμενη μελέτη σε πολυποικιλιακά δείγματα γύρης από την Κορέα, την Πολωνία και την Κίνα επισήμανε το παλμιτικό, το  $\alpha$ -λινολενικό και το λινολεϊκό οξύ

ως τα πλέον συχνά απαντώμενα λιπαρά οξέα στη γύρη (Szczesna et al.,2006). Επίσης σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ταυτοποιήθηκαν και άλλα οξέα όπως το μαλονικό οξύ . Στην ύπαρξη των λιπαρών οξέων οφείλεται πιθανότατα η αντιβακτηριδιακή δράση που παρουσιάζει η γύρη των μελισσών (Manning, 2001).

Οι μέλισσες, καθώς δεν έχουν την δυνατότητα να παράγουν σκουαλένιο βασίζονται για τη λήψη στερολών σχεδόν εξολοκλήρου στην διατροφή τους με γύρη. Έτσι, η ύπαρξη υψηλού ποσοστού 24-μεθυλεν-χολεστερόλης στην γύρη είναι ιδιαίτερης σημασίας για αυτές, καθώς με βάση την βιβλιογραφία δεν μπορούν να μεταβολίσουν τη στιγμαστερόλη και τη σιτοστερόλη (Svodova et al., 1983; Herbert et al., 1980).

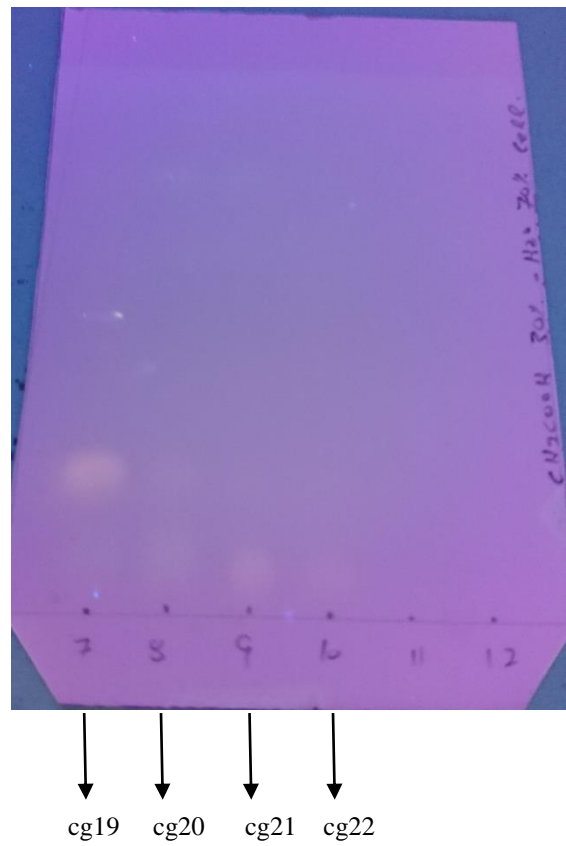
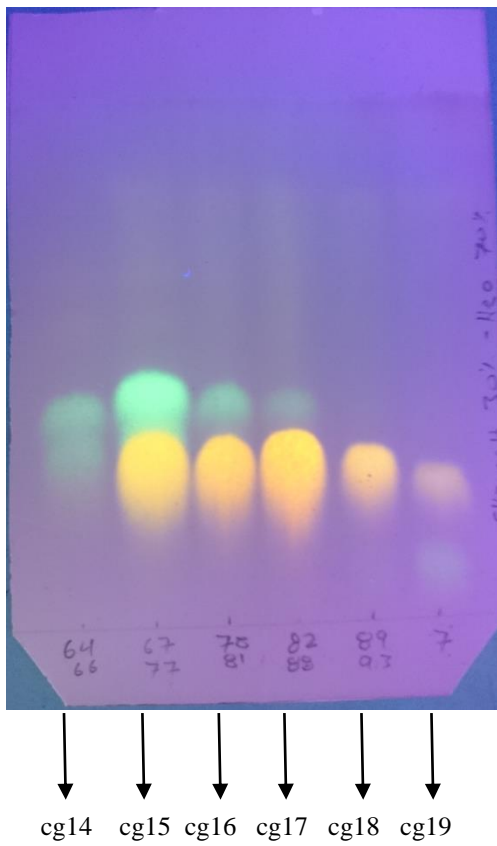
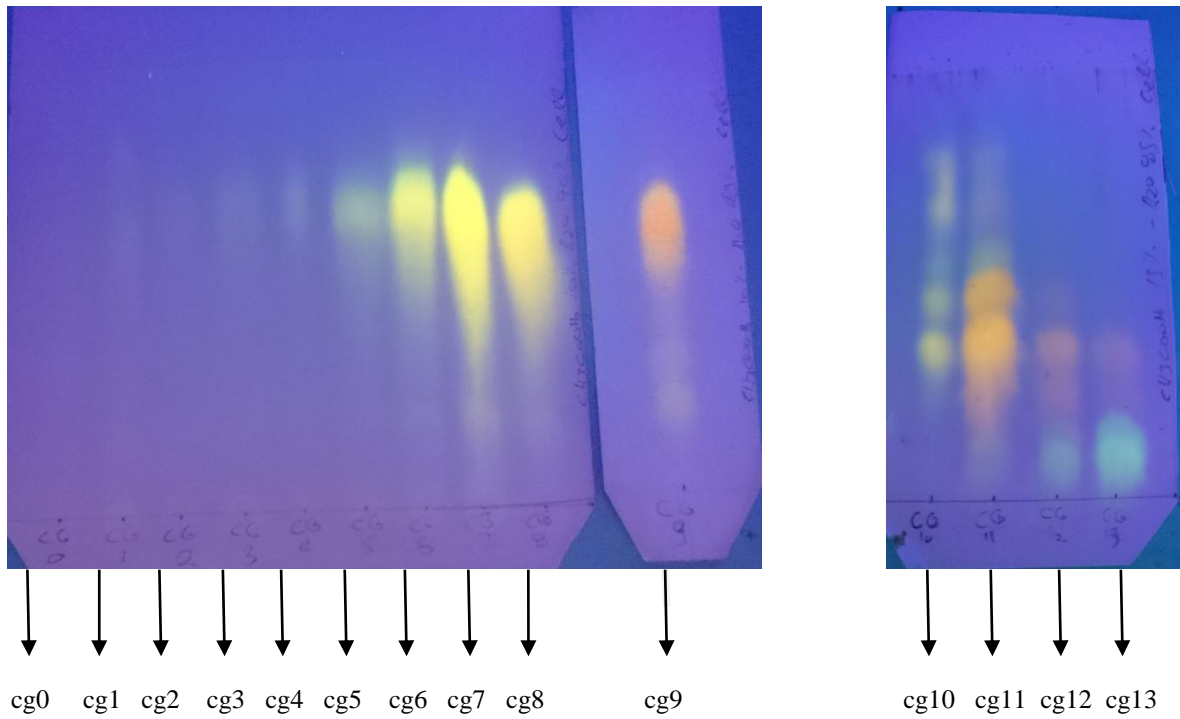
#### 4.2 Μελέτη βουτανολικού εκχυλίσματος της γύρης του *Cistus creticus*

Αρχικά, 990 mg από το βουτανολικό εκχύλισμα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικό διαχωρισμό σε στήλη χρωματογραφίας ανοικτού τύπου, ύψους 70cm και πλάτους 4,5cm με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 (25-100 μm, Pharmacia). Το ύψος γεμίσματος της στήλης με το υλικό πλήρωσης έφτανε τα 30cm και το πακετάρισμα έγινε με μεθανόλη. Η έκλουση της στήλης έγινε με μεθανόλη και προέκυψαν 100 κλάσματα. Μετά από έλεγχο των κλασμάτων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, προχωρήσαμε σε συνενώσεις κλασμάτων αντίστοιχα με την χρωματογραφική τους εικόνα. Τα κλάσματα που προέκυψαν από τις συνενώσεις, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 8:** Συνενωμένα κλάσματα στήλης βουτανολικού εκχυλίσματος

ονομασία και συνενώσεις κλασμάτων	βάρος (mg)	ονομασία και συνενώσεις κλασμάτων	βάρος (mg)
cg0 (k 0-5)	35	cg12 (dok 58-60)	2
cg1 (dok 1-11)	25	cg13 (dok 61-63)	29
cg2 (dok 12)	5	cg14 (dok 64-66)	10
cg3 (dok 13)	50	cg15 (dok 67-77)	19
cg4 (dok 14-17)	170	cg16 (dok 78-81)	47
cg5 (dok 18-19)	25	cg17 (dok 82-88)	135
cg6 (dok 20-21)	15	cg18(L6)	45
cg7 (dok 22-25)	44	cg19 (L7)	76
cg8 (dok 26-30)	16	cg20 (L8)	66
cg9 (dok 31-37)	17	cg21 (L9)	41
cg10 (dok38-42)	7	cg22 (L10)	28
cg11 (dok 43-57)	49		

Η συνολική χρωματογραφική εικόνα των συνενωμένων κλασμάτων φαίνεται στις εικόνες που ακολουθούν.



Εικόνες 23-26: Χρωματογραφική εικόνα των συννεωμένων κλασμάτων

Τα κλάσματα που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη είναι τα εξής: cg4 και cg5, cg8, cg9, cg11, cg14 και cg18 τα οποία θα περιγραφούν αναλυτικά στο πειραματικό μέρος που ακολουθεί.

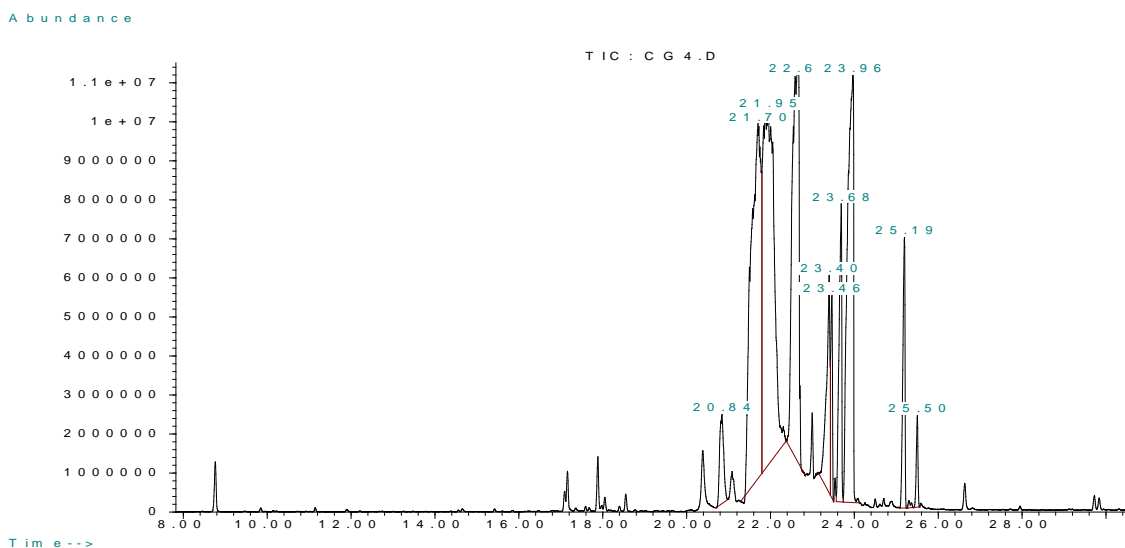
### Μελέτη κλασμάτων cg4 και cg5

Τα κλάσματα cg4 και cg5 εμφάνισαν την ίδια χρωματογραφική εικόνα στις TLC οπότε έγινε σιλυλίωση και αέρια χρωματογραφία GC-MS .



Εικόνα 27: TLC cg4 και cg5 σε Cel: AcOH :H<sub>2</sub>O (10:90)

Τα αποτελέσματα του GC-MS δείχνουν ότι το κλάσμα αποτελείται κατά κύριο λόγο από σάκχαρα.



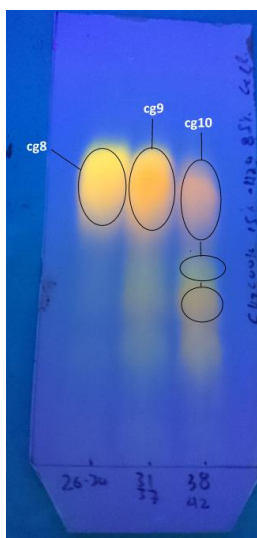
Εικόνα 28: Χρωματογράφημα κλάσματος cg4

**Πίνακας 9:** Πίνακας αποτελεσμάτων gc-ms ανάλυσης κλάσματος cg4

ΟΥΣΙΑ	AREA
arabinosuranose	22.20
d-ribofuranose	25.59
glycopyranose	17.09
d-glycitol	4.72
d-glycose	2.16
d-ribose	4.97
d-glycopyranose	16.16
d-glycose	3.72
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>96.61</b>

### Μελέτη κλάσματος cg8

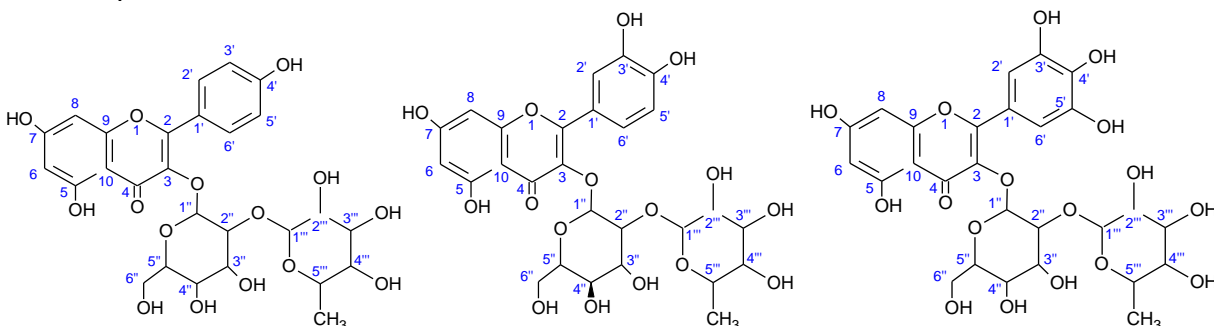
Το κλάσμα cg8 απομονώθηκε ως κίτρινη κόνις. Σε TLC κυτταρίνης κατόπιν ψεκασμού με αντιδραστήριο Naturstoff και θέρμανσης εμφάνισε έντονα κίτρινη χρώση.



**Εικόνα 29:** TLC cg8 Cel. H<sub>2</sub>O:AcOH (80:20)

Το κλάσμα cg8 (16mg) αναλύθηκε φασματοσκοπικά με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR και μέσω σύγκρισης με βιβλιογραφικά δεδομένα, προέκυψε ότι είναι το μίγμα ουσιών, καμπφέρολο-3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης (καμπφέρολο-3-O-νεοεσπεριδοσίδης), κερκέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης (κερκέτινο-3-O-νεοεσπεριδοσίδης) και μυρικέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδης (μυρικέτινο-3-O-νεοεσπεριδοσίδης).

1.Φασματοσκοπική μελέτη του μίγματος (cg8) καιμπφερόλο-3-O-β-(1→2) ραμνόςυλ-γλυκοσίδη, κερκέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόςυλ-γλυκοσίδη, μυρικέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόςυλ-γλυκοσίδη



Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  οι κορυφές οι οποίες υποδηλώνουν την παρουσία φλαβονοειδούς τύπου κερκετίνης εντοπίζονται ως μία διπλή κορυφή στα 7.62ppm (H-2') με σταθερά σύζευξης 2.4 Hz, μία διπλή κορυφή στα 6.86 ppm (H-5') με σταθερά σύζευξης  $J = 8.9\text{Hz}$  καθώς και μια διπλή διπλής κορυφή στα 7.60 ppm (H-6') με σταθερά σύζευξης  $J = 2.4/8.3\text{ Hz}$ . Φαίνεται λοιπόν ότι στο κλάσμα υπάρχει ένα μόριο που φέρει αρωματικό πυρήνα 1,3,4-τρι-υποκατεστημένο.

Η ύπαρξη φλαβονοειδούς τύπου καιμπερόλης στο μίγμα επιβεβαιώνεται από την ύπαρξη μίας διπλής διπλής κορυφής στα 8.04ppm (H-2'/H-6') με μια μεγάλη σταθερά σύζευξης  $J = 8.7\text{Hz}$  και μια μικρότερης που δεν φαίνεται καθαρά (brs), καθώς και της διπλής κορυφής στα 6.88 ppm με  $J = 8.9\text{Hz}$  (H-5'). Τα στοιχεία αυτά αποτελούν ένδειξη για την ύπαρξη ενός 1,4-δι-υποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα.

Χαρακτηριστικό για φλαβονοειδές που περιέχει μυρικετίνη είναι η μονή κορυφή στα 7.25ppm η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-2' και H-6' και τα οποία δεν έχουν καμία *ortho*-σύζευξη.

Δυο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης  $J = 1.8\text{ Hz}$  στα 6.18 ppm (H-6) και στα 6.38 ppm (H-8), είναι χαρακτηριστικές των *meta*-σύζευξεων που εντοπίζονται στο άγλυκο τμήμα του μορίου του καιμπερόλο-ραμνόςυλ-γλυκοσίδη. Αντίστοιχα, οι ανάλογες τιμές για το μόριο που φέρει τη κερκετίνη είναι 6.18ppm (H-6) και 6.37ppm (H-8) με  $J = 2.1\text{Hz}$ , ενώ το μόριο που το άγλυκό του τμήμα είναι η μυρικετίνη, συντονίζει στα 6.18ppm (H-6) και 6.36ppm (H-8) με  $J = 1.8\text{Hz}$ .

Στην περιοχή των ανωμερικών πρωτονίων έχουμε μία διπλή κορυφή στα 5.75 ppm με  $J = 7.7\text{Hz}$  που αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης. Επίσης μία απλή κορυφή που συντονίζει στα 5.22 ppm αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόςης. Η αποθωράκιση του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης στα 5.75 ppm είναι ενδεικτικό της απευθείας σύνδεσης της γλυκόζης με το άγλυκο τμήμα του μορίου. Η τιμή της σταθεράς σύζευξης του (7.7Hz) είναι χαρακτηριστική β-γλυκοζιτικού δεσμού (Kazuma et al., 2003). Επιπρόσθετα, η σύνδεση της ραμνόςης με τη γλυκόζη στη θέση 2 της γλυκόζης εντείνει το φαινόμενο της αποθωράκισης του ανωμερικού πρωτονίου της γλυκόζης που καταλήγει στο συμπέρασμα ότι έχουμε νεοεσπεριδοσίδη. Ο νεοεσπεριδοσίδης της κερκετίνης διαφέρει από τη ρουτίνη στο τρόπο

σύνδεσης των δυο σακχάρων. Έτσι, ενώ η ρουτίνη είναι ο κερκέτινο-3-O-β-(1→6) ραμνόσυλ-γλυκοσίδη, ο αντίστοιχος νεοεσπεριδοσίδη είναι ο κερκέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδη και συνήθως το ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης στη ρουτίνη συντονίζεται στα 5.35ppm (Fathiazad et al, 2010) ενώ στην περίπτωση του νεοεσπεριδοσίδη συντονίζεται στα 5.73 ppm (Kazuma et al., 2003).

Το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόζης δεν παρουσιάζει τόσο έντονη αποθωράκιση και συντονίζεται στα 5.22ppm, δίνοντας μια απλή κορυφή, χαρακτηριστική α-γλυκοζιτικού δεσμού. Από την περιοχή 3.08 ppm έως 4.10 ppm εντοπίζονται τα πρωτόνια των σακχάρων τόσο της γλυκόζης, όσο και της ραμνόζης, ενώ το μεθυλίο της ραμνόζης συντονίζεται στα 0.96 ppm δίνοντας μια διπλή κορυφή με  $J = 5.6$  Hz.

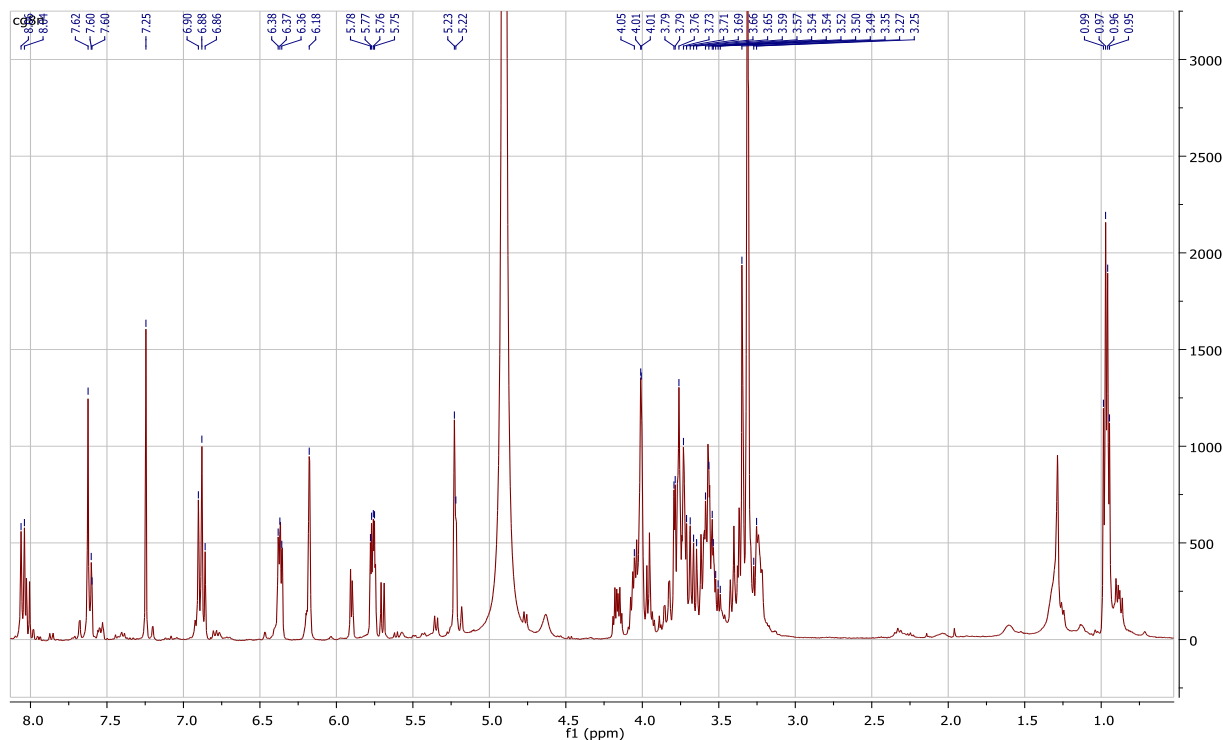
**Πίνακας 10:** Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$ -NMR κερκέτινο-3-O-β-D(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδη, καιμπφέρολο -3-O-β-D(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδη και μυρικέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόσυλ-γλυκοσίδη. (cg8)

<u>πρωτόνιο</u>	<u>καιμπφέρολο-3-O-νεοεσπεριδοσίδη</u>	<u>κερκέτινο-3-O-νεοεσπεριδοσίδη</u>	<u>μυρικέτινο-3-O-νεοεσπεριδοσίδη</u>
	$\delta$ (ppm), πολλαπλότητα, $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm), πολλαπλότητα, $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm), πολλαπλότητα, $J$ (Hz)
H-6	6.18 (d,1.8)	6.18(d,1.8)	6.18(d,1.8)
H-8	6.38(d,1.8)	6.37(d,2.1)	6.36(d,2.1)
H-2'	8.06(d,8.9)	7.62(d,2.4)	7.25(s)
H-3'	6.90(d,8.9)	-	-
H-5'	6.88(d,8.9)	6.86(d, J=8.3)	-
H-6'	8.06(d,8.9)	7.60(dd,8.3/2.4)	7.25(s)
<b><u>3-Glu</u></b>			
H-1''	5.75(d,7.7)	5.76(d,7.7)	5.75(d,7.7)
H-2''	3.65(m)	3.66(m)	3.69(m)
H-3''	3.30-3.60	3.30-3.60	3.30-3.60
H-4''	3.30-3.60	3.30-3.60	3.30-3.60
H-5''	3.25(m)	3.25(m)	3.25(m)
H-6''a	3.73(dd,11.9/3.1)	3.73(dd,11.9/3.1)	3.73(dd,11.9/3.1)
H-6''b	3.52(dd,12.0/6.2)	3.54(dd,12.0/6.2)	3.57(dd,11.9/6.0)
<b><u>2''-Rhm</u></b>			
H-1'''	5.22(s)	5.22(s)	5.23(brS)
H-2'''	4.01(m)	4.01(m)	4.01(m)
H-3'''	3.79(m)	3.79(m)	3.79(m)
H-4'''	3.33(m)	3.34(m)	3.33(m)
H-5'''	4.01(m)	4.01(m)	4.01(m)



Me-rhm	0.95(d,4.8)	0.96(d,5.6)	0.97(d,5.6)
--------	-------------	-------------	-------------

### <sup>1</sup>H-NMR cg8(MeOD):



Ο καιμπφέρολο-3-O-νεοεσπεριδοσίδης έχει προσδιοριστεί σε πολυποικιλιακή γύρη Νεας Ζηλανδίας καθώς και Πορτογαλίας με τεχνικές HPLC-DAD (Campos et al., 1997). Επίσης προσδιορίστηκε ως το κύριο φλαβονοειδές σε δείγματα γύρης από *Echium plantagineum* (Ferrer et al., 2010).

Ο κερκέτινο- 3-O-νεοεσπεριδοσίδης έχει προσδιοριστεί σε γύρη από *Zea mays* (Ceska et al., 1984), ενώ γλυκοσίδες της μυρικετίνης, αλλά όχι νεοεσπεριδοσίδης, έχουν απομονωθεί και προσδιοριστεί σε γύρη από *Cistus ladanifer* L. (Tomas-Lorente et al., 1991). Σε δείγματα ισπανικής γύρης μετά από υδρόλυση, η μυρικετίνη ήταν από τα κυριότερα φλαβονοειδή που ανιχνεύτηκαν (Bonvehi et al., 2001).

Γλυκοσίδες της μυρικετίνης, της κερκετίνης και της καιμπφερόλης έχουν προσδιοριστεί σε φύλλα από *Cistus creticus* (Demetzos et al., 1989). Επίσης, έχουν προσδιοριστεί ως άγλυκα μόρια σε (μυρικετίνη, κερκετίνη και καιμπφερόλη) εγχύματα από το ίδιο φυτό (Wittpahl et al., 2015).

### Μελέτη κλάσματος cg9

Το κλάσμα cg9 (17mg) μετά από φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  (MeOD) και σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα προέκυψε ότι είναι μίγμα των φλαβονοειδών κερκέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόςυλ-γλυκοσίδης (κερκέτινο-3-O-νεοεσπεριδοσίδης) και μυρικέτινο-3-O-β-(1→2) ραμνόςυλ-γλυκοσίδης (μυρικέτινο-3-O-νεοεσπεριδοσίδης) που περιγράφηκαν προηγουμένως.



Εικόνα 30: TLC cg9 Cel AcOH:H<sub>2</sub>O(10:90)

### Χρωματογραφία στήλης του κλάσματος cg11

Το κλάσμα cg11 (49mg) αναμιγνύεται με 80 mg silica και τοποθετείται σε στήλη διαμέτρου 1cm με στατική φάση 1,5gr silica και κινητή φάση μίγμα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας. Όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε πλάκα silica και σύστημα ανάπτυξης διαλυτών 80/20 EtOAc/MeOH. Ακολούθησε συνένωση των κλασμάτων που εμφάνισαν ίδια χρωματογραφική εικόνα. Τα στοιχεία έκλουσης, οι συνενώσεις και τα βάρη, παρουσιάζονται στους κάτωθι πίνακες.

Πίνακες 11-12: Πίνακας συστημάτων έκλουσης, συνενώσεων και βάρους κλασμάτων στήλης cg11

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
D 1-16	EtOAc 100%
D 17-30	EtOAc 99%-MeOH 1%
D 31-61	EtOAc 98%-MeOH 2%
D 62-80	EtOAc 97%-MeOH 3%
D 81-90	EtOAc 95%-MeOH 5%
D 91-103	EtOAc 92%-MeOH 8%
D 104-111	EtOAc 85%-MeOH 15%



Εικόνα 31: TLC cg11 MeOH:EtOAc(15:85)

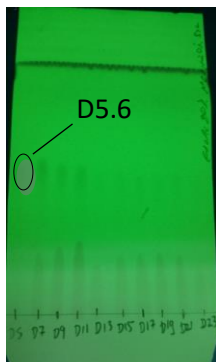
συνενώσεις κλασμάτων	βάρος (mg)	συνενώσεις κλασμάτων	βάρος (mg)
D1-4	1	D40	3
D5-6	8	D41-49	1
D19.22	14	D50-85	10
D23-39	3	D86-111	3

Από αυτά τα κλάσματα, αυτά που παρουσίασαν ενδιαφέρον ήταν το D5.6 και το D19.22.



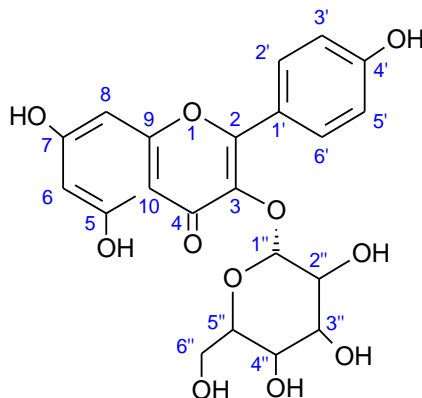
### Μελέτη κλάσματος D5.6

Το κλάσμα D.5.6 (8mg) έχει υποκίτρινο χρώμα και δίνει μαύρη κηλίδα σε TLC silica και ψεκασμό με βανιλίνη. Μετά από φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  (MeOD) και σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα προέκυψε ότι είναι η ουσία καμπφέρολο-3-Ο-γλυκοσίδη (αστραγαλίνη)



Εικόνα 32: TLC D5.6 SIL MeOH:EtOAc(20:80)

### 2.Φασματοσκοπική μελέτη του καμπφέρολο-3-Ο-γλυκοσίδη (αστραγαλίνη) (d5.6)



Το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  έδειξε ότι τα πρωτόνια του Β-δακτυλίου H-6' και H-2' εμφανίζουν μια διπλή κορυφή στα 8.05ppm (d,  $J=8.37$  Hz). Το σήμα από τα H-3' και H-5' παρατηρείται στα 6.88ppm ως μια διπλή κορυφή (d,  $J=8.37$  Hz), χαρακτηριστική της *ortho*-σύζευξης τους με τα H-2' και H-6' αντίστοιχα. Τα πρωτόνια του Α δακτυλίου H-6 και H-8 δίνουν κορυφές στα 6.21ppm και 6.41ppm (d,  $J= 1.97$  Hz), καθώς εμφανίζουν μια *meta*- σύζευξη μεταξύ τους.

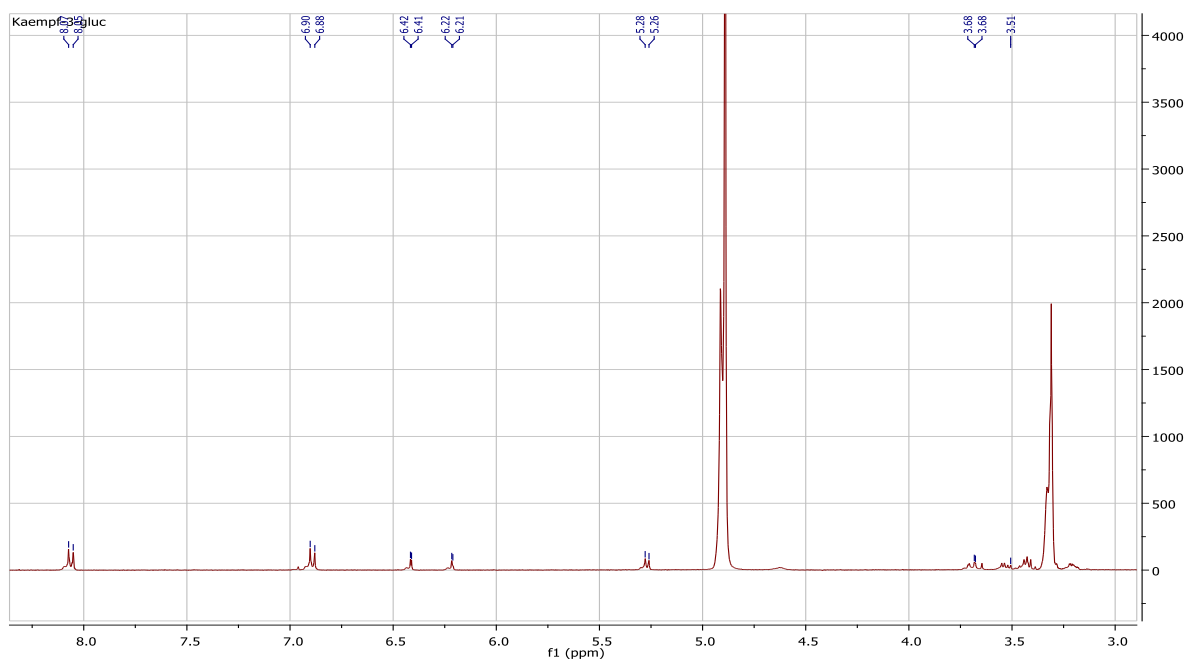
Η κορυφή στο  $\delta 5.26$  αποδόθηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Kuruüzüm-Uz et al, 2013) στο ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης (d,  $J=6.97$  Hz). Επιπρόσθετα, στην περιοχή των πρωτονίων του σακχάρου, παρατηρείται συντονισμός στα 3.51ppm και στα 3.68ppm για τα H-6''α και H-6''β με μεγάλη μεταξύ τους σταθερά σύζευξης ( $J=11.84\text{Hz}$ ), η οποία οφείλεται στο διαφορετικό

στεροχημικό τους περιβάλλον. Βασιζόμενοι στα φασματοσκοπικά και βιβλιογραφικά δεδομένα καταλήγουμε στην δομή του καμπφέρολο-3-Ο-γλυκοσίδη.

**Πίνακας 13:** Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H-NMR}$  καμπφέρολο-3-Ο-γλυκοσίδη (d5.6)

<u>πρωτόνιο</u>	<u><math>\delta</math>(ppm), πολλαπλότητα, J(Hz)</u>
6	6.21d(1.92)
8	6.41d(1.92)
2'	8.05(d,8.37)
3'	6.88(d,8.37)
5'	6.88(d,8.37)
6'	8.06(d,8.37)
H-1''	5.26d(6.97)
H-6''a	3.51dd(11.84/ 5.31)
H-6''b	3.68dd(11.84/2.31)

$^1\text{H-NMR}$  D5.6(MeOD):



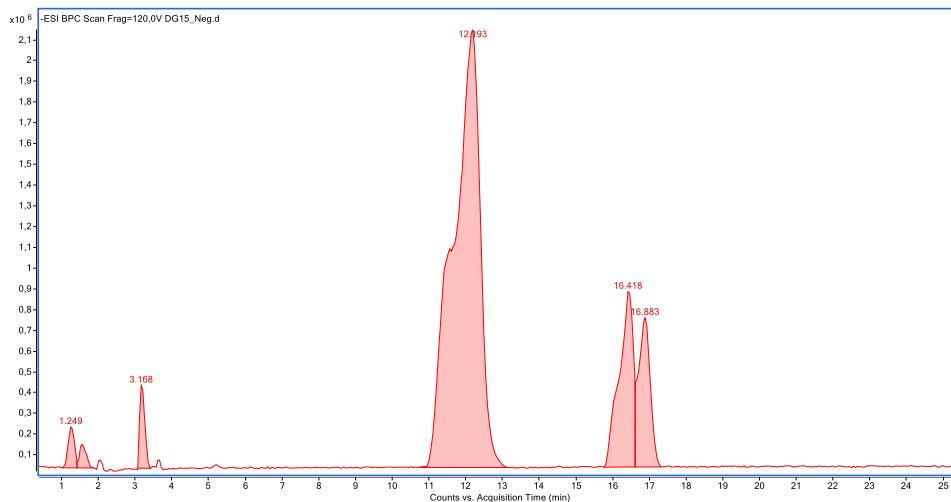
Ο καμπφέρολο-3-Ο-γλυκοσίδη έχει απομονωθεί από γύρη του φυτού *Cistus ladanifer* (Tomas-Lorente et. al, 1991), καθώς και από γύρη *Cistus sp.* από την Ισπανία (Maruyama et. al., 2010). Επίσης, έχει βρεθεί και στα φύλλα του φυτού *Cistus creticus* (Demetzos et. al., 1989).

## Μελέτη κλάσματος D19.22

### 3.Μελέτη του μίγματος D19.22 με LC-MS

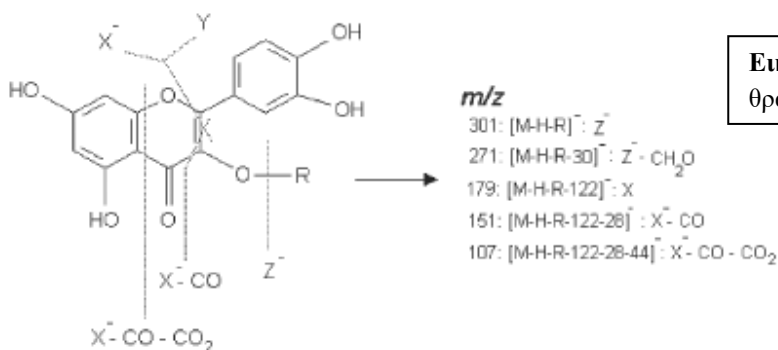
Μέρος του κλάσματος D19.22 (περίπου 7 mg) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία LC-MS

Εικόνα 33: Χρωματογράφημα LC-MS



Πίνακας 14: Φασματοσκοπικά δεδομένα <sup>1</sup>H- NMR καιμπφέρολο-3-Ο-γλυκοσίδη (d5.6)

χρόνος ανάσχεσης (RT, minutes)	ουσία
11.56	κερκέτινο-3-γαλακτοσίδης (υπεροσίδης)
12.19	κερκέτινο-3-γλυκοσίδης (ισοκερκετίνη)
16.41	καιμπφέρολο-3-γαλακτοσίδης (τριφολίνη)
16.84	ισοραμνέτινο-3-γλυκοσίδης



**Εικόνα 34:** κυριότερα ιόντα και μονοπάτια θραυσματοποίησης φλαβονοειδών

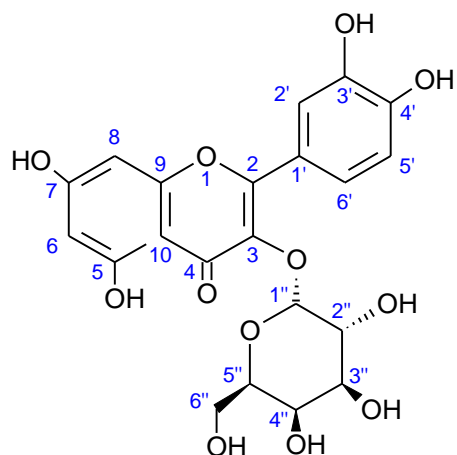
Ο υπεροσίδης (κερκέτινο-3-γαλακτοσίδης) εμφανίζει παρόμοια θραυσματοποίηση με την ισοκερκετίνη μια μικρή διαφοροποίηση στο ύψος των θραυσμάτων αλλά και με διαφορετικό χρόνο ανάσχεσης. Το φάσμα μάζας δείχνει μια κορυφή  $m/z$  463 για το μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  το οποίο έχει μοριακό τύπο  $C_{21}H_{20}O_{12}$ , και το θραύσμα του άγλυκου τμήματος  $[M_{\alpha\gamma\lambda}-H]$  που δίνει κορυφή  $m/z$  301. Παράγωγα ιόντα θραυσμάτων της είναι τα  $[M_{\alpha\gamma\lambda}-H-CH_2O]^-$ ,  $m/z$  271. Η διαφορά αυτή των δυο τελευταίων θραυσμάτων ( $301-271=30$ ) σημαίνει ότι το σάκχαρο είναι συνδεδεμένο στη θέση 3 του φλαβονοειδούς. Η ύπαρξη ιόντος με  $m/z$  162 ( $463-301$ ) δηλώνει τη παρουσία μορίου σακχάρου γλυκόζης ή γαλακτόζης.

Το φάσμα μάζας της ισοκερκετίνης (κερκέτινο-3-γλυκοσίδης) δείχνει μια κορυφή  $m/z$  463 για το μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  το οποίο έχει μοριακό τύπο  $C_{21}H_{20}O_{12}$ , και το θραύσμα του άγλυκου τμήματος  $[M_{\alpha\gamma\lambda}-H]$  δίνει κορυφή  $m/z$  301. Παράγωγα ιόντα θραυσμάτων της είναι τα  $[M_{\alpha\gamma\lambda}-H-CH_2O]^-$ ,  $m/z$  271, και  $[M_{\alpha\gamma\lambda}-H-CH_2O-CO]^-$ ,  $m/z$  243 (Tsiftoglou et al, 2013).

Ο καιμπφέρολο-3-γαλακτοσίδης έχει κορυφή  $m/z$  447 για το μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  το οποίο έχει μοριακό τύπο  $C_{21}H_{20}O_{11}$  και θραύσμα  $m/z$  162 που υποδηλώνει τη παρουσία μορίου γλυκόζης ή γαλακτόζης. Επίσης η διαφορά  $m/z$  30 σημαίνει ότι το σάκχαρο είναι συνδεδεμένο στη θέση 3 της καιμπφερόλης. Επιβεβαίωση ότι η ουσία είναι καιμπφέρολο-3-γαλακτοσίδης έγινε με σύγκριση της θραυσματοποίησης με πρότυπη ουσία και με σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Castillo-Munoz et al, 2008).

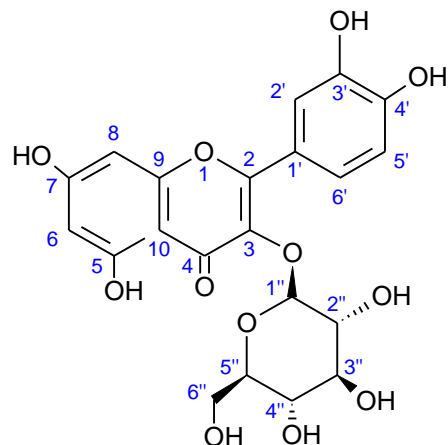
Το φάσμα μάζας (ESI-MS-MS) του ισοραμνέτινο-3-γλυκοσίδη έδειξε κορυφή  $m/z$  477 που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν  $[M-H]^-$  και συμφωνεί με το μοριακό τύπο  $C_{22}H_{22}O_{12}$  της ουσίας. Επίσης εμφανίζεται η ανιονική ρίζα  $[M_{\alpha\gamma\lambda}-H]^{*-}$ ,  $m/z$  314. Η θραυσματοποίηση του άγλυκου ιόντος δίνει το ανιόν  $[M_{\alpha\gamma\lambda}-H-CH_3-CH_2]^-$  με  $m/z$  271 και το ανιόν  $[M_{\alpha\gamma\lambda}-H-CH_3-CH_2O-CO]^-$  με  $m/z$  243 (Tsiftoglou et al, 2013).

## Ουσίες που ταυτοποιήθηκαν με LC-MS



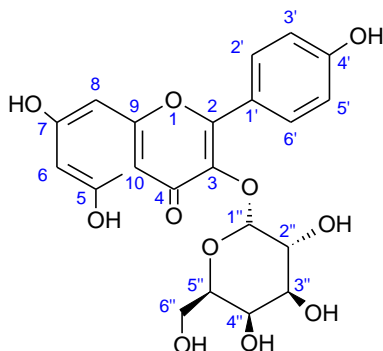
κερκέτινο-3-Ο-γαλακτοσίδης

(8)



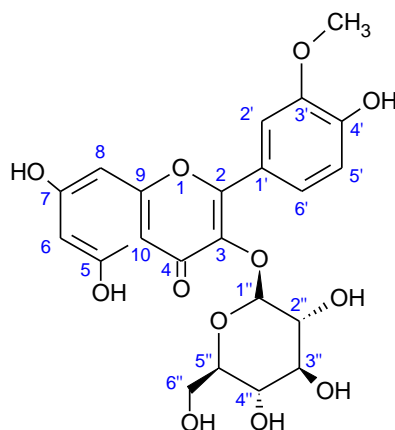
κερκέτινο-3-Ο-γλυκοσίδης

(9)



καιμπφέρολο-3-Ο-γαλακτοσίδης

(6)



ισοραμνέτινο-3-Ο-γλυκοσίδης

(10)

Ο υπεροσίδης (κερκέτινο-3-Ο-γαλακτοσίδης) έχει βρεθεί σε εγχύματα από *Cistus creticus* (Riehle *et al.*, 2012), καθώς και σε γύρη μελισσών (Ceksteryte *et al.*, 2006). Έχει αντιμυκητιασική δράση (Li *et al.*, 2005), δράση επί των κυττάρων οστεοσαρκώματος (Zhang *et al.*, 2014) και αντιϊική δράση (Huang *et al.*, 2007).

Ο καιμπφέρολο-3-Ο-γαλακτοσίδης (τριφολίνη) έχει βρεθεί σε εγχύματα *Cistus creticus* (Wittpahl *et al.*, 2015) αλλά και σε γύρη από *Petunia* (Vogt *et al.*, 1995). Μελέτες έχουν δείξει ότι έχει αντιμυκητιασική (Li *et al.*, 2005) και αντιλευχαιμική δράση (Torres *et al.*, 2008).

Η ισοκερκετίνη (κερκέτινο-3-Ο-γλυκοσίδης) έχει βρεθεί σε γύρη από *Cistus ladanifer* (Tomas-Lorente *et al.*, 1991), στα φύλλα του *Cistus creticus* (Demetzos *et al.*, 1989), καθώς και σε

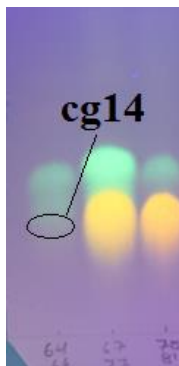


εγχύματα από *Cistus creticus* (Riehle et. al., 2013). Περαιτέρω αναφορά στην ισοκερκετίνη γίνεται κατά την απομόνωση της από το υδατικό εκχύλισμα.

Ο ισοραμενέτινο-3-γλυκοσίδης έχει βρεθεί σε γύρη από *Cistus ladanifer* (Tomas-Lorente et al, 1992). Η ίδια μελέτη αναφέρει την ισοραμενέτινη ως ένα από τα πιο συχνά απαντώμενα φλαβονοειδή της γύρης, μαζί με την κερκετίνη, την μυρικετίνη και την καιμπερόλη. Μελέτη γύρης από *Cistus creticus* από την Κροατία βρίσκει υψηλή συγκέντρωση ισοραμενέτινης μόνο στα υδρολυμένα δείγματα της γύρης (Saric et al., 2009). Ισοραμενέτινη έχει απομονωθεί από φύλλα φυτών του γένους *Cistus* (Kupeli et al., 2006, Tomas-Menor et al, 2013). Επίσης γλυκοσίδες της ισοραμενέτινης έχουν απομονωθεί από τα υπέργεια τμήματα του υποείδους *Cistus creticus* ssp. *eriocephalus* (Maggi et al., 2016). Η ισοραμενέτινη θεωρείται από τους κύριους μεταβολίτες της κερκετίνης και έχει δράση στο μηχανισμό της φλεγμονής (Boesch-Saadatmandi et al, 2011).

### **Μελέτη κλάσματος cg14**

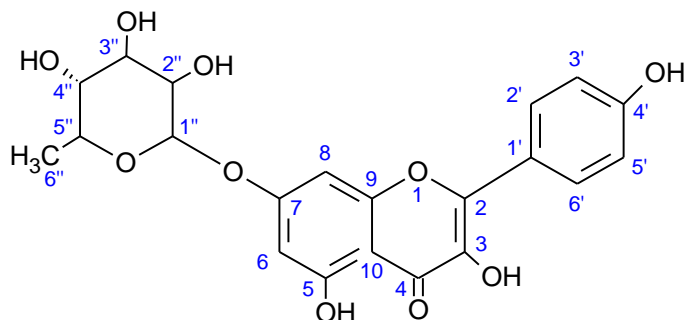
Το κλάσμα cg14 (10 mg) απομονώθηκε ως υποκίτρινη κόνις. Σε TLC κυτταρίνης κατόπιν ψεκασμού με αντιδραστήριο Naturstoff και θέρμανσης εμφάνισε ελαφρά γαλάζια χρώση.



**Εικόνα 35:** TLC cg14 Cel AcOH:H<sub>2</sub>O(30:70)

Η φασματοσκοπική μελέτη του cg14 σε DMSO και η σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα (Sharaff, 1997) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για τον καιμπερόλο-7-O-β-D-ραμνοσίδης

#### 4. Φασματοσκοπική μελέτη του καιμπφερόλο-7-O-β-D-ραμνοσίδη (cg14)



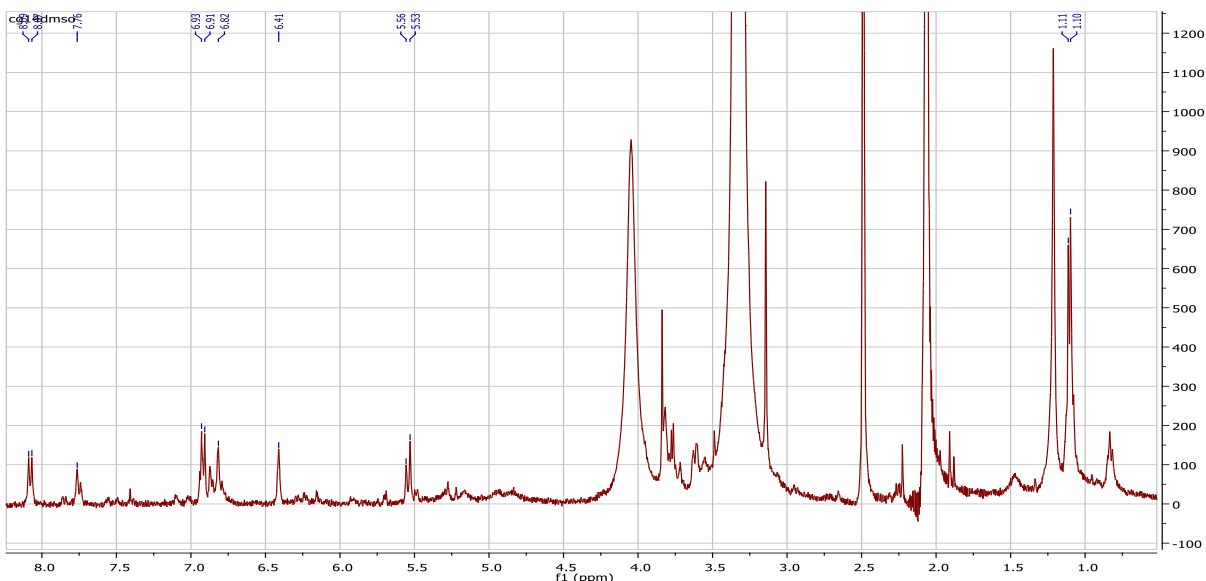
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$ , οι χαρακτηριστικές κορυφές του άγλυκου της καιμπφερόλης είναι μια διπλή κορυφή (d) σε  $\delta$  8.08 με  $J=8.80$  Hz για τα H-2' και H-6', συζευγμένη με μια άλλη διπλή κορυφή σε  $\delta$  6.92 (d,  $J=8.80$  Hz) που αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-3' και H-5'. Επίσης παρατηρούμε κορυφές σε  $\delta$  6.41 και  $\delta$  6.82 που αντιστοιχούν στα H-6 και H-8 αντίστοιχα.

Το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόζης εμφανίζεται στα 5.53ppm, τιμή που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία (Sharaf,1997). Η διπλή κορυφή σε  $\delta$  1.10 είναι τυπική για μεθύλιο ραμνόζης, όπως και η σύζευξη της που είναι  $J=5.9$  Hz.

**Πίνακας 15:** Φασματοσκοπικά δεδομένα της καιμπφερόλο-7-O-β-D-ραμνοσίδη διαλυμένης σε DMSO

	$\delta$ (ppm)	πολλαπλότητα	$J$ (Hz)
H-6	6.40	brs	-
H-8	6.82	brs	-
H-2'	8.08	d	8.80
H-3'	6.92	d	8.80
H-5'	6.92	d	8.80
H-6'	8.08	d	8.80
H-1(-rhamnose)	5.53	s	-
CH3(rhamnose)	1.10	d	5.9

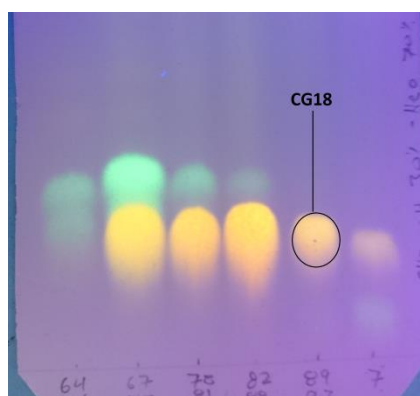
## $^1\text{H-NMR}$ cg14(DMSO):



Ο καιμπέρολο-7-O-β-D-ραμνοσίδης έχει βρεθεί σε δείγματα από μέλι ακακίας (*Robinia pseudacacia*) με τη τεχνική HPLC-MS, και μάλιστα η παρουσία του έχει προταθεί ως δείκτης για την βοτανική καταγωγή του μελιού αυτού (Truchado et. al., 2008). Η καιμπφερόλη και οι γλυκοσίδες της έχουν απομονωθεί από ποικίλα δείγματα γύρης, αλλά η δομή 7 ραμνοσιδης της καιμπφερόλης αναφέρεται για πρώτη φορά σε γύρη μελισσών.

### Μελέτη κλάσματος cg18

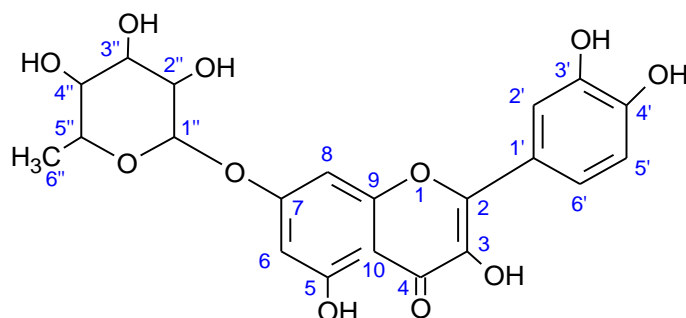
Το κλάσμα cg18 (13mg) απομονώθηκε ως κίτρινη κόνις. Κατόπιν ψεκασμού με αντιδραστήριο Naturstoff σε TLC κυτταρίνης και μετά από θέρμανση εμφάνισε έντονα κίτρινη χρώση.



Εικόνα 36: TLC cg18 Cel. AcOH:H<sub>2</sub>O (30:70)

Το κλάσμα cg18 μετά από φασματοσκοπική ανάλυση αποδείχτηκε ότι είναι η ουσία κερκέτινο-7-O-β-D-ραμνοσίδης.

## 5. Φασματοσκοπική μελέτη του κερκέτινο-7-O-ραμνοσίδη (cg18)



Η φασματοσκοπική μελέτη του κλάσματος cg18 διαλυμένου σε MeoD έδειξε ότι το άγλυκο τμήμα του μορίου αποτελείται από κερκετίνη. Χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος είναι η κορυφή στα 6.40ppm (d,  $J=2.06$  Hz) που αντιστοιχεί στο H-6 και δίνει μια *meta*-σύζευξη με την κορυφή του H-8 που εμφανίζεται στα 6.72ppm (d,  $J= 2.09$  Hz). Το H-2' εμφανίζεται έντονα αποθωρακισμένο στα 7.73ppm και έχει μια μόνο *meta*-σύζευξη με το H-6', συνεπώς η κορυφή του είναι διπλή (d,  $J=2.04$  Hz). Αντιθέτως, η κορυφή του H-6' στα 7.64ppm (dd,  $J=8.47$  ,2.04 Hz) είναι διπλή διπλής, καθώς έχει μια *ortho*-σύζευξη με το H-5' και μια *meta*-σύζευξη με το H-2'. Η κορυφή του τελευταίου, εμφανίζεται στα 6.86 ppm (d,  $J=8.52$  Hz), που συμφωνεί απόλυτα με την βιβλιογραφία (Ishiguro,1991). Όσον αφορά το τμήμα του σακχάρου, το ανωμερικό πρωτόνιο της ραμνόζης δίνει μια διευρυμένη απλή κορυφή στα 5.55ppm ,ενώ χαρακτηριστική για το μόριο είναι η εμφάνιση του μεθυλίου της ραμνόζης σε  $\delta$ 1.24 (d,  $J=6.0$  Hz).

**Πίνακας 16:** Φασματοσκοπικά δεδομένα του κερκέτινο-7-O-ραμνοσίδη διαλυμένου σε MeoD

<u>πρωτόνιο</u>	<u><math>\delta</math>(ppm), σταθερά σύζευξης <math>J</math>(Hz)</u>
H-6	6.40d(2.06)
H-8	6.72(d,2.06)
H-2'	7.73(d,2.04)
H-5'	6.86(d,8.52)
H-6'	7.64(dd,8.47/2.04)
H-1''	5.53(d,1.26)h brS
Me-Rhm	1.24(d,6.0)

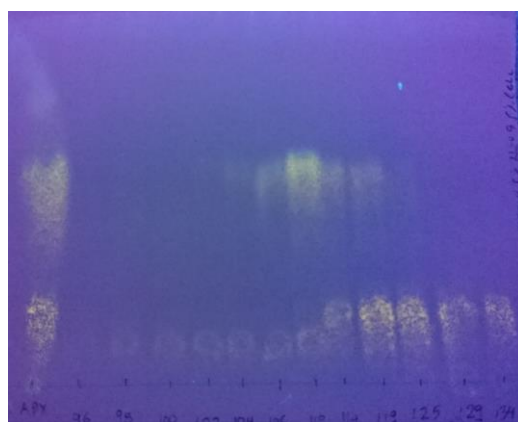


### 4.3 Υδατικό εκχύλισμα γύρης

Από το υδατικό εκχύλισμα, 836mg υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικό διαχωρισμό σε στήλη με υλικό πλήρωσης Sephadex LH-20 (25-100  $\mu\text{m}$ , Pharmacia) ανοικτού τύπου. Χρησιμοποιήθηκε στήλη ύψους 60cm x 3,5cm πλάτος. Το ύψος γεμίσματος της στήλης με sephadex ήταν 28cm και το πακετάρισμα έγινε με μεθανόλη. Η έκλυση της στήλης ξεκίνησε με μεθανόλη και αφορά τα κλάσματα G1-155 (900ml μεθανόλης), ενώ στο τελευταίο στάδιο έγινε έκλυση με 200ml διαλύματος μεθανόλης-νερού 50-50. Τα κλάσματα που προέκυψαν από τις συνενώσεις, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 17: Συνενώσεις και βάρη κλασμάτων

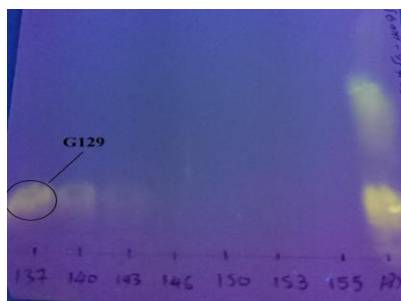
συνενώσεις κλασμάτων	βάρος (mg)	συνενώσεις κλασμάτων	βάρος (mg)
g1-36	6	g89-93	4
g37-47	78	g94-96	5
g48-50	46	g97-102	4
g51-56	245	g103-105	3
g57-59	164	g106-110	6
g60-64	11	g111-113	5
g65-68	29	g114-119	4
g69-71	5	g120-125	8
g72-74	4	g126-136	3
g75-78	5	g137-140	6
g79-81	3	g141-145	3
g82-83	2	g146-155	16
g84-88	3	g156	5



Εικόνα 37: TLC κλασμάτων στήλης υδατικού γύρης  
Cel. AcOH:H<sub>2</sub>O (5:95)

### Μελέτη κλάσματος G129

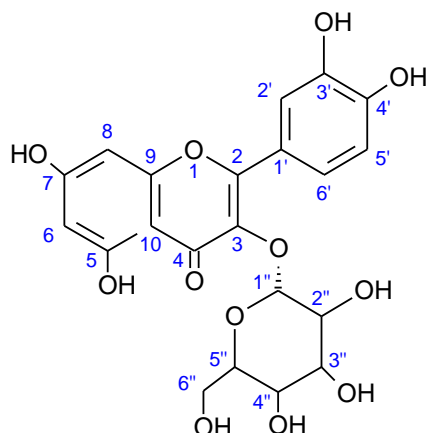
Το συνενωμένο κλάσμα g129 βάρους 3mg είχε κίτρινο χρώμα και σε TLC κυτταρίνης κατόπιν ψεκασμού με διάλυμα Naturstoff δίνει έντονο κίτρινο χρωματισμό.



Εικόνα 38: TLC G129 Cel. AcOH:H<sub>2</sub>O (30:70)

Το κλάσμα G129 μετά από φασματοσκοπική ανάλυση αποδείχτηκε ότι είναι ο κερκέτινο 3-O-β-γλυκοσίδης (ισοκερκετίνη).

## 1. Φασματοσκοπική μελέτη του κερκέτινο 3-O-β-γλυκοσίδη( Ισοκερκετίνη) (G129)



Από τη φασματοσκοπική μελέτη της ουσίας g129 σε CD<sub>3</sub>OD με <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR και COSY και σύγκριση των φασμάτων με αντίστοιχα της βιβλιογραφίας (Μαρίνη, 2017, Kuruyüzüm-Uz et al., 2013, Kazuma et al., 2003) το κλάσμα ταυτοποιήθηκε ως ο κερκέτινο-3-O-β-γλυκοσίδης.

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR εμφανίζεται μία διπλή διπλής κορυφή στα 7.57 ppm (H-6') με  $J = 2.0/8.3$  Hz και δύο διπλές κορυφές, μία στα 7.60 ppm (H-2') και μία στα 6.85 ppm (H-5'), με  $J = 2.0$  Hz και  $J = 8.3$  Hz αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως το μόριο περιέχει έναν 1,3,4-τρι-υποκατεστημένο αρωματικό πυρήνα. Μεταξύ του H-6 που δίνει κορυφή στα 6.16 ppm και του H-8 που εμφανίζεται στα 6.34 ppm, υπάρχει *meta*-σύζευξη, η οποία καθιστά τις δυο αυτές κορυφές διπλές με  $J = 2.0$  Hz.

Παρατηρώντας την περιοχή των σακχάρων, μία διπλή κορυφή με  $J = 7.6$  Hz στα 5.17 ppm αντιστοιχεί στο ανωμερικό πρωτόνιο της γλυκόζης. Τα πρωτόνια της θέσης 6'' της γλυκόζης εμφανίζονται ως δύο διπλές διπλών κορυφές, καθότι λόγω στερεοχημείας δίνουν σύζευξη τόσο μεταξύ τους όσο και με το H-5''. Το πρωτόνιο 6''<sub>a</sub> συντονίζεται στα 3.73 ppm με  $J = 2.1/11.7$  Hz και το πρωτόνιο 6''<sub>b</sub> στα 3.62 ppm, με  $J = 2.1/11.7$  Hz.

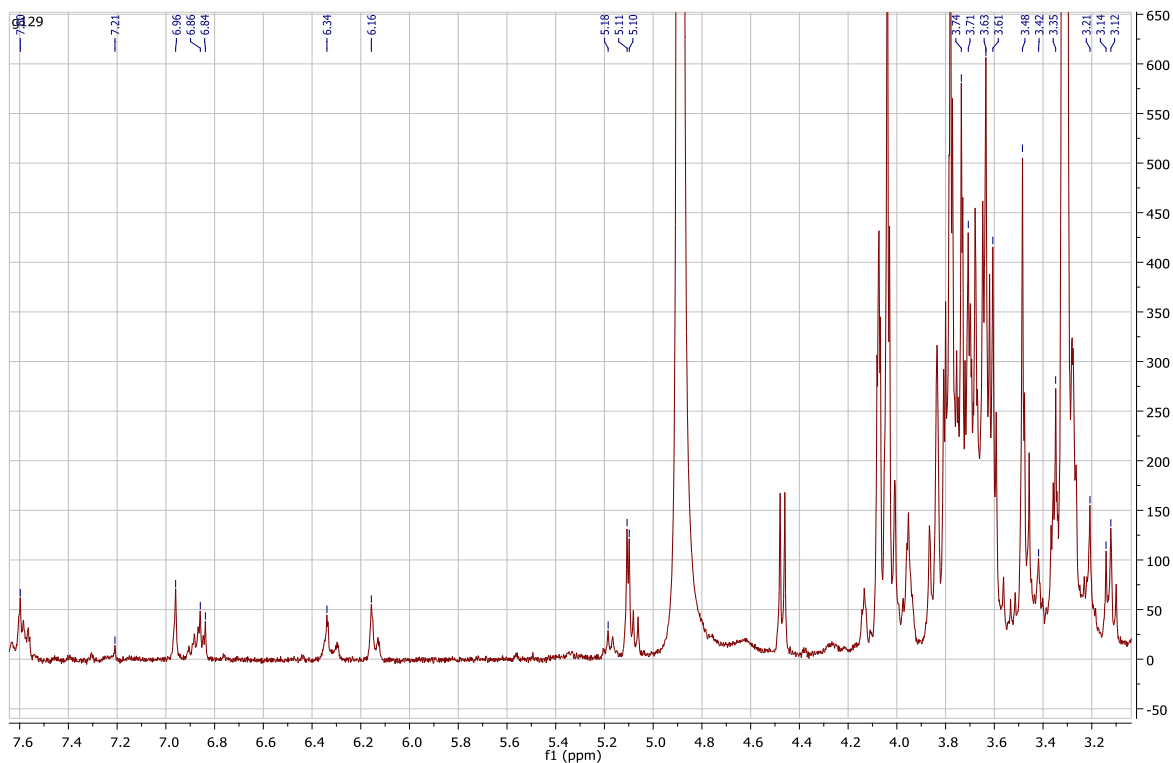
Μια πολλαπλή κορυφή στα 3.35-3.50 ppm αντιστοιχεί στα υπόλοιπα πρωτόνια του σακχάρου, δηλαδή στα H-2'' και H-3''.

Το φάσμα COSY δείχνει την συσχέτιση του πρωτονίου H-6 με το H-8 καθώς και του H-6' με το H-5'. Τέλος, είναι εμφανής και η γειτνίαση του ανωμερικού πρωτονίου H-1'' με το H-2'' (3.47 ppm) της γλυκόζης.

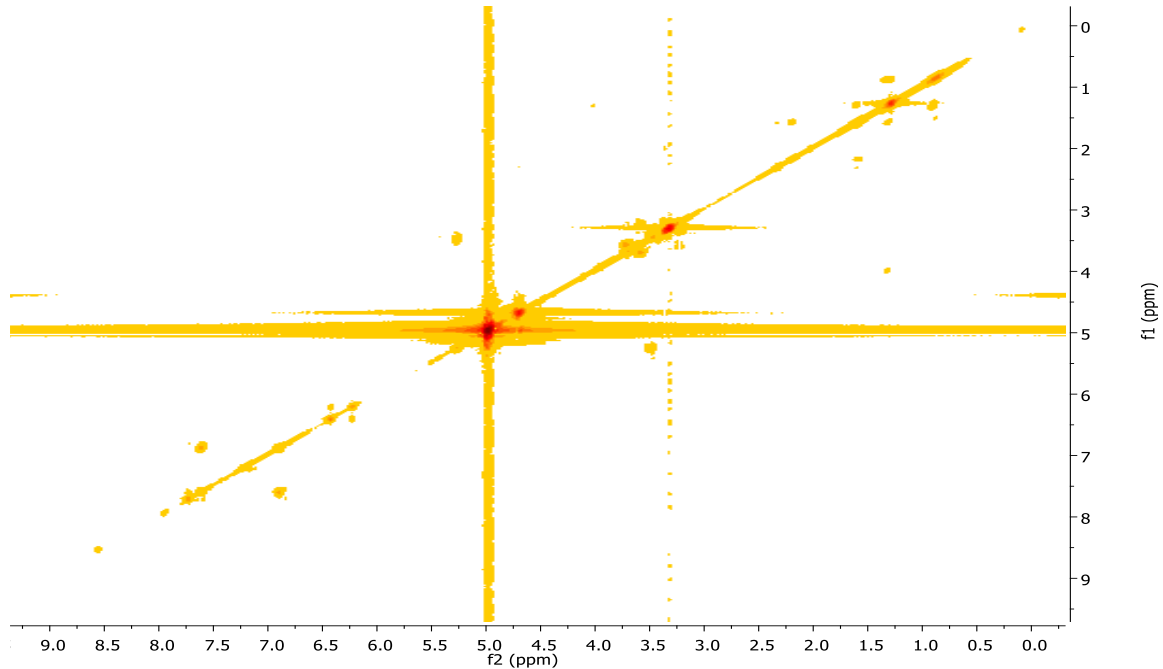
**Πίνακας 18:** φασματοσκοπικά δεδομένα του κερκέτινο 3-O- β- γλυκοσίδη διαλυμένου σε MeOD

	$\delta$ (ppm)	πολλαπλότητα	$J$ (Hz)
H-6	6.16	d	2.0
H-8	6.34	d	2.0
H-2'	7.60	d	2.0
H-3'	-	-	-
H-5'	6.85	d	8.3
H-6'	7.57	dd	8.3, 2.0
H-1''	5.17	d	7.42
H-2''	3.47		
H-3''	3.30-3.50		
H-4''	3.35	m	
H-5''	3.12	m	
H-6''a	3.73	dd	11.7, 2.1
H-6''b	3.62	dd	11.7, 2.1

**$^1\text{H-NMR}$**  g129(MeOD):







Ισοκερκετίνη (κερκέτινο 3-O-β-γλυκοσίδης) έχει βρεθεί σε γύρη από *Cistus ladanifer* (Tomas-Lorente et. al, 1991), στα φύλλα του *Cistus creticus* (Demetzos et. al., 1989), καθώς και σε εγχύματα από *Cistus incanus* (Riehle et. al., 2013).

Η ισοκερκετίνη είναι μια πολυμελετημένη ουσία, με μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον. Εμφανίζει επουλωτικές (Bhatia et al., 2016), αντιπηκτικές και αντιθρομβωτικές ιδιότητες (Choi et al., 2016). Έχει γίνει επίσης αναφορά στις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντυπερτασικές και αντιδιαβητικές της δράσεις (Zhang et al, 2011, Junior, 2011, Rogerio, 2007). Κλινικές μελέτες υποστηρίζουν ακόμη πως οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του μορίου έχουν προληπτική και αντιογκογόνο δράση έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου όπως του ήπατος, του παγκρέατος, του στήθους, του προστάτη και του παχέος εντέρου (Orfali et al., 2016).

## 5. ANTIMIKΡΟΒΙΑΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ

Στα πλαίσια ελέγχου των δράσεων της γύρης από *Cistus sp.*, πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι της αντιβακτηριακής και αντιμυκητιασικής δράσης των εκχυλισμάτων του δείγματος που έδειξε το πιο ενδιαφέρον προφίλ και το οποίο ήταν το πιο πλούσιο σε γύρη από *Cistus sp.*

### 5.1 Αντιβακτηριακοί έλεγχοι

Οι αντιμικροβιακοί έλεγχοι έγιναν με τη μέθοδο της διάλυσης (dilution method). Σε όλα τα δείγματα έγιναν μετρήσεις των ελάχιστων συγκεντρώσεων τους που διέθεταν ανασταλτική δράση (MIC, Minimum Inhibitory Concentration). Λήφθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις και μετρήθηκε η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MIC) σε 96-τρύπες πλάκες. Χρησιμοποιήθηκαν έξι πρότυπα στελέχη Gram-θετικών και -αρνητικών βακτηρίων, εκ των οποίων τα δύο Gram(+) βακτήρια είναι τα: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) και *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), ενώ τα άλλα τέσσερα είναι τα Gram(-) βακτήρια: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) και *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 227853). Όλα τα βακτήρια προέρχονται από την ATCC (American Type Culture Collection). Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν ως μέτρο σύγκρισης ήταν τα αντιβιοτικά νετιλμικίνη, αμοξυκιλίνη και κλαβουλανικό οξύ (Sanofi, Diagnostics Pasteur). Επίσης, για κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό ο διαλύτης στον οποίο είχαν διαλυθεί τα προς εξέταση δείγματα.

#### Αποτελέσματα αντιβακτηριακών ελέγχων

Τα αποτελέσματα του ελέγχου της αντιβακτηριακής δράσης, που πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της διάλυσης, φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα, όπου δίνονται οι τιμές MIC (mg/mL):

Πίνακας 19: αντιβακτηριακή δράση εκχυλισμάτων σε σύγκριση με πρότυπα αντιβιοτικά

<b>ΔΕΙΓΜΑ</b>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aeruginosa</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
κυκλοεξανικό εκχύλισμα	na	na	na	na	na	na
βουτανολικό εκχύλισμα	$2.0 \cdot 10^{-3}$	$1.98 \cdot 10^{-3}$	$2.47 \cdot 10^{-3}$	$2.82 \cdot 10^{-3}$	$2.98 \cdot 10^{-3}$	$2.36 \cdot 10^{-3}$
διγλωρομεθανικό εκχύλισμα	na	na	na	na	na	na
υδατικό εκχύλισμα	3.12	3.00	2.98	3.15	3.56	3.77
αμοξυκιλίνη	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2.4 \cdot 10^{-3}$	$2.2 \cdot 10^{-3}$	$2.8 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$
νετιλμικίνη	$4 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$	$8.8 \cdot 10^{-3}$	$8 \cdot 10^{-3}$	$8 \cdot 10^{-3}$	$10 \cdot 10^{-3}$
κλαβουλανικό οξύ	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2.4 \cdot 10^{-3}$	$2.2 \cdot 10^{-3}$	$2.8 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$

na: ανενεργά (not active)

Τα αποτελέσματα φανερώνουν την εξαιρετική αντιμικροβιακή δράση του βουτανολικού εκχυλίσματος της γύρης *Cistus*, όπου είναι αντίστοιχη της αμοξικιλίνης και του κλαβουλανικού οξέως για όλο το φάσμα των μικροβίων που περιελάμβαναν οι έλεγχοι. Χαρακτηριστικό της δραστηριότητας αυτού του εκχυλίσματος είναι η πολύ ισχυρότερη αντιβακτηριδιακή του δράση από καθιερωμένα αντιβιοτικά, όπως η νετιλμικίνη. Το υδατικό εκχύλισμα παρουσίασε μια ασθενή δράση έναντι των εξεταζόμενων βακτηρίων, ενώ το κυκλοεξανικό και το διγλωρομεθανικό εκχυλισμα ήταν ανενεργά.

## 5.2 Αντιμυκητιασικοί έλεγχοι

Για τον έλεγχο της αντιμυκητιασικής δράσης των εκχυλισμάτων ακολουθήθηκε ανάλογη μέθοδος με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αντιβακτηριακής δράσης, δηλαδή η μέθοδος της διάλυσης. Το τροφικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Sabouraud, ενώ η επώαση των τρυβλίων έγινε στους 25°C για 48h. Οι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν του γένους *Candida albicans* (ATCC 1023), *C. tropicalis* (ATCCC 13801) και *C. glabrata* (ATCCC 28838). Ως πρότυπα, για μέτρο σύγκρισης, χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά 5-φλουοκυτοκίνη και αμφοτερικίνη Β.

### Αποτελέσματα αντιμυκητιασικών ελέγχων

Τα αποτελέσματα του ελέγχου της αντιμυκητιασικής δράσης, που πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της διάλυσης, φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα, όπου δίνονται οι τιμές MIC (σε mg/mL):

**Πίνακας 20:** αντιμυκητιασική δράση εκχυλισμάτων σε σύγκριση με πρότυπα αντιβιοτικά

<u>ΔΕΙΓΜΑ</u>	<u><i>C.albicans</i></u>	<u><i>C.tropicalis</i></u>	<u><i>C.glabrata</i></u>
κυκλοεξανικό εκχύλισμα	na	na	na
βουτανολικό εκχύλισμα	$3.34 \cdot 10^{-3}$	$3.20 \cdot 10^{-3}$	$3.14 \cdot 10^{-3}$
διγλωρομεθανικό εκχύλισμα	na	na	na
υδατικό εκχύλισμα	3.40	3.57	3.68
5-φλουοκυτοκίνη	$0.1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$10 \cdot 10^{-3}$
αμφοτερικίνη Β	$1 \cdot 10^{-3}$	$0.5 \cdot 10^{-3}$	$0.4 \cdot 10^{-3}$

na: ανενεργά (not active)

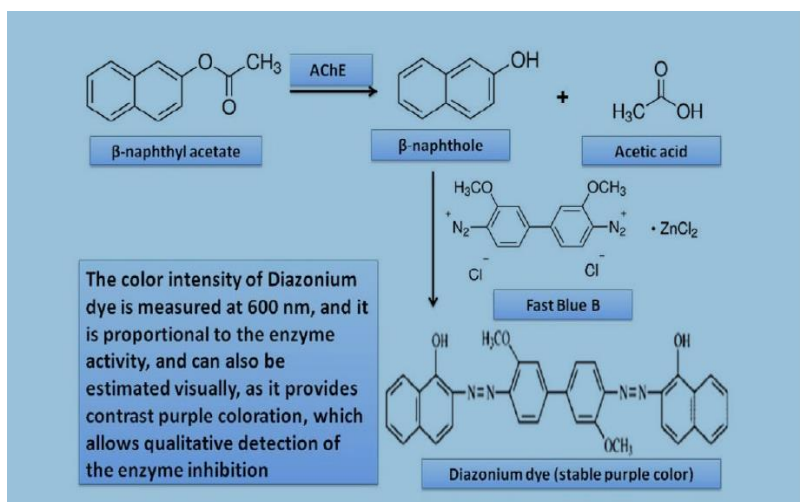
Η αντιμυκητιασική δράση του βουτανολικού εκχυλίσματος έναντι των τριών πρότυπων στελεχών είναι αρκετά ισχυρή, ενώ στην περίπτωση του *Candida glabrata* η δράση του εκχυλίσματος είναι αρκετά ισχυρότερη ακόμα και από αυτή της 5-φλουοκυτοκίνης. Το υδατικό εκχύλισμα έδειξε μια ασθενή δράση, σε αντίθεση με το διχλωρομεθανικό και κυκλοεξανικό εκχύλισμα που δεν είχαν καθόλου δράση έναντι των τριών παθογόνων μυκήτων.

### 5.3 Συμπεράσματα αντιμικροβιακών ελέγχων

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι το βουτανολικό εκχύλισμα παρουσιάζει μια ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι όλων των παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων που εξετάστηκαν που στις περισσότερες των περιπτώσεων ήταν συγκρίσιμη ή και καλύτερη από αυτή καθιερωμένων και ευρέως χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών και αντιμυκητιασικών φαρμάκων. Σε σύγκριση με προηγούμενη μελέτη πολυποικιλιακού δείγματος γύρης από το εργαστήριο μας, το βουτανολικό εκχύλισμα γύρης από *Cistus* sp. εμφανίζει αρκετά ισχυρότερη αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση (Graïkou et al,2011). Έτσι θα μπορούσαμε να προτείνουμε την χρήση τέτοιων εκχυλισμάτων γύρης ως μια νέα πηγή αντιμικροβιακών φαρμάκων, χωρίς αρνητικές συνέπειες για την υγεία ανθρώπων και ζώων και φιλικές ως προς το περιβάλλον.

### 5.4 Βιοαυτογραφική δοκιμασία αναστολής ακετυλοχολινεστεράσης σε TLC

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι ένα ένζυμο που υδρολύει την ακετυλοχολίνη σε οξικό οξύ και χολίνη. Επεμβαίνει στο μεταβολισμό της ακετυλοχολίνης και άλλων νευροδιαβιβαστών-εστέρων



που φέρουν χολίνη. Απαντάται στο νευρικό σύστημα, στους μυς και σε κεντρικούς και περιφερικούς ιστούς. Αναστολή του ενζύμου οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της ακετυλοχολίνης στο συναπτικό χάσμα. Αυτή η δράση είναι χρήσιμη σε μια σειρά παθολογικών καταστάσεων όπως η νόσος Alzheimer, όπου παρατηρείται μειωμένη συγκέντρωση ακετυλοχολίνης

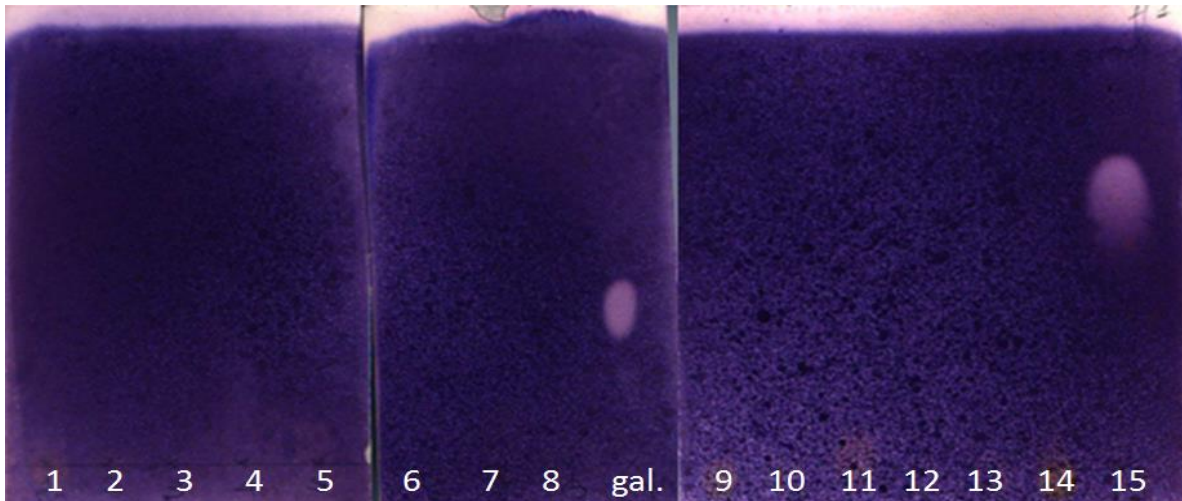
**Εικόνα 39:** οι χημικές αντιδράσεις στις οποίες βασίζεται η τεχνική ανίχνευσης των αναστολέων ακετυλοχολινεστεράσης

στον εγκέφαλο σε ποσοστό μέχρι και 90%. Συνεπώς, η δοκιμασία αυτή επιτρέπει τον εντοπισμό

μορίων που αναστέλλουν τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης όπως η γαλανθαμίνη, τα οποία πιθανώς να είναι αποτελεσματικά έναντι της νόσου του Alzheimer. Έχει αναπτυχθεί ένας απλός και γρήγορος βιοαυτογραφικός έλεγχος σε πλάκες TLC για την εξέταση της ικανότητας αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης από φυτικά εκχυλίσματα. Η ενζυμική δραστηριότητα ανιχνεύεται από τη μετατροπή του οξικού ναφθυλίου σε ναφθόλη και το σχηματισμό της ιώδους

χρωστικής διαζωνίου-άλατος Fast Blue B. Οι αναστολείς της χολινεστεράσης παράγουν λευκές κηλίδες πάνω στις πλάκες TLC που έχουν το ιώδες χρώμα της χρωστικής. Το αλκαλοειδές γαλανθαμίνη που είναι γνωστός αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας της ανάλυσης.

Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων καθώς και των πρότυπων διαλυμάτων έγινε όπως περιγράφεται στην βιβλιογραφία (Marston et al., 2002) στο εργαστήριο φαρμακογνωσίας του πενεπιστημίου του Lublin, υπό την καθοδήγηση του αναπληρωτή καθηγητή Tomasz Mroczek.



**Εικόνα 40:** ανάπτυξη των κλασμάτων της γύρης I καθώς και της γαλανθαμίνης σε TLC με τη βιοαυτογραφική μέθοδο ανίχνευσης αναστολέων ακετυλοχολινεστεράσης

Όπως φαίνεται και στη εικόνα 40, το διάλυμα 15 το οποίο προέρχεται από το κλάσμα D19.22 του βουτανολικού εκχυλίσματος της γύρης I έδωσε κηλίδα αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης, δίνοντας υποσχέσεις για πιθανή δράση κατά του Alzheimer. Αξίζει να σημειωθεί ότι από την LC-MS ανάλυση του κλάσματος διαπιστώθηκε ότι αποτελείται από τα φλαβονοειδή υποεροσίδη, τριφολίνη, ισοκερκετίνη και ισοραμνέτινο-3-γλυκοσίδη. .

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν τρία δείγματα γύρης μελισσών που προέρχονται σε μεγάλο ποσοστό από γύρη του φυτού *Cistus creticus* L. Όντας από τα κυριότερα μελισσοκομικά προϊόντα, η γύρη μελισσών είναι ένα εξαιρετικό συμπλήρωμα διατροφής, πλούσιο σε πρωτεΐνες, αμινοξέα, υδατάνθρακες, βιταμίνες και φαινολικά παράγωγα που παρουσιάζει ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις (αντιοξειδωτική, καρδιοπροστατευτική, ηπατοπροστατευτική, αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριδιακή, αντινεοπλασματική, ανοσοδιεγερτική και αντιαναιμική) επιβεβαιωμένες από επιστημονικές μελέτες, δράση.

Επιλέχθηκαν για μελέτη δείγματα γύρης με το υψηλότερο ποσοστό γυρεόκοκκων από *Cistus creticus* επειδή ο κίσθος είναι ένα μελισσοτροφικό φυτό με έντονο φαρμακευτικό ενδιαφέρον που έχει αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές και αντιϊκές ιδιότητες. Συνεπώς η μελέτη των ιδιοτήτων και της σύστασης της γύρης μελισσών που προέρχεται από αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Αρχικά έγινε γυρεολογικός έλεγχος των τριών δειγμάτων, όπου διαπιστώθηκε ότι το δείγμα από την Κρήτη αποτελείται σχεδόν εξολοκλήρου από γύρη *Cistus*. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός των ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και προσδιορισμός των ολικών φλαβονοειδών με τη μέθοδο του χλωριούχου αργιλίου ( $AlCl_3$ ) σε εκχυλίσματα γύρης, αλλά και σύγκριση της ικανότητας τους για εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών  $ABTS^+$  και  $DPPH^{\cdot}$ .

Το δείγμα από την Κρήτη εμφάνισε υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών σε σχέση με τα άλλα δυο δείγματα και έδειξε την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση.

Ακολούθησαν οι διαδικασίες εκχύλισης, απομόνωσης και καθορισμού της δομής φυσικών προϊόντων από την γύρη Κρήτης που έγιναν μέσω χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών μεθόδων. Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία του βουτανολικού και του υδατικού εκχυλίσματος της γύρης, απομονώνοντας συνολικά **δέκα** φυσικά προϊόντα που ανήκουν στην κατηγορία των γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών: κερκέτινο-3-γλυκοσίδης (ισοκερκετίνη), κερκέτινο-3-γαλακτοσίδης (υπεροσίδης), κερκέτινο-7-ραμνοσίδης, κερκέτινο-3-νεοεσπεριδοσίδης, καιμπφέρολο-3-Ο-γλυκοσίδης (αστραγαλίνη), καιμπφέρολο-3-γαλακτοσίδης (τριφολίνη), καιμπφέρολο-7-Ο-ραμνοσίδης, καιμπφέρολο-3-νεοεσπεριδοσίδης, μυρικέτινο-3-νεοεσπεριδοσίδης, ισοραμνέτινο-3-γλυκοσίδης.

Καθώς ο κίσθος είναι ένα φυτό πλούσιο σε πολυφαινόλες, θεωρήθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί κατά πόσο είναι δυνατόν αυτοί οι δευτερογενείς μεταβολίτες να περάσουν μέσω των γυρεόκοκκων του φυτού στη γύρη μελισσών. Στη γύρη μελισσών που μελετήσαμε εντοπίστηκαν δυο γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή του φυτού, ισοκερκετίνη και καιμπφέρολο-3-γλυκοσίδης (Demetzos et al.,1989) που σύμφωνα με την βιβλιογραφία έχουν βρεθεί στο φυτό *Cistus creticus*, καθώς και δυο ακόμα τα οποία έχουν βρεθεί σε εγχύματα του *C. creticus*, ο κερκέτινο-3-γαλακτοσίδης (Riehle et al.,2012) και ο καιμπφέρολο-3-γαλακτοσίδης (Wittpahl et al,2015).

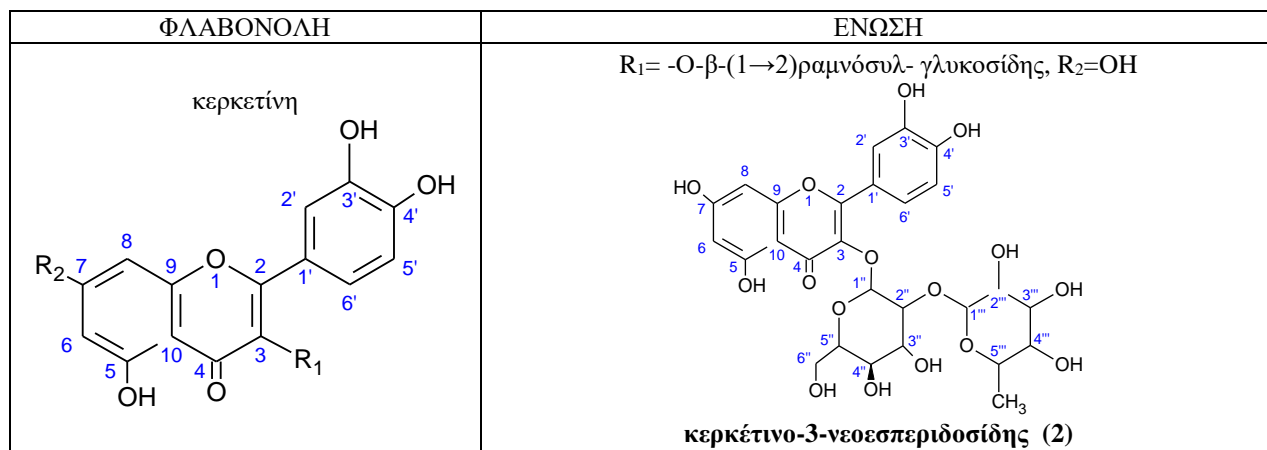
Επίσης, τα άγλυκα τμήματα όλων των γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών που βρέθηκαν είναι κοινά με τα φλαβονοειδή που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο *Cistus creticus*, δηλαδή τη κερκετίνη, τη καιμπερόλη και τη μυρικετίνη (Tomas-Lorente et al, 1992). Επίσης, γλυκοσίδες της ισοραμεντίνης έχουν βρεθεί σε φυτά του γένους *Cistus* (Kupeli et al., 2006, Tomas-Menor et al, 2013; Maggi et al.,2016).

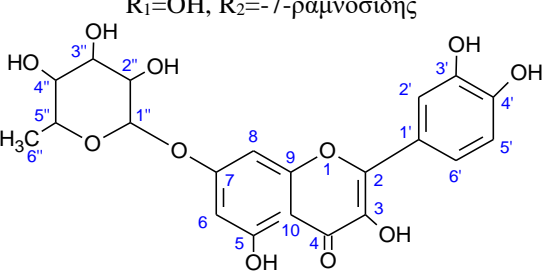
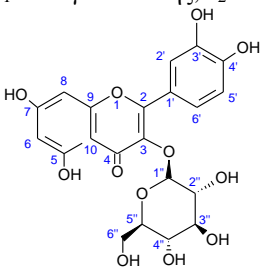
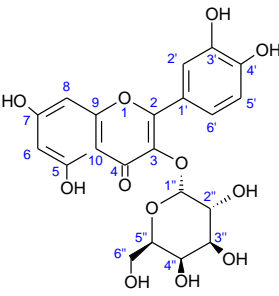
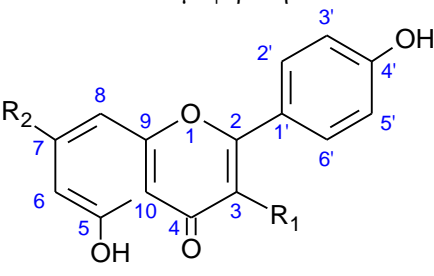
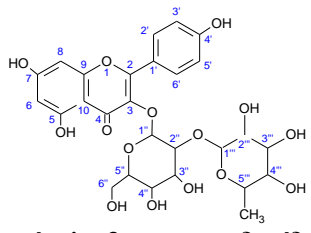
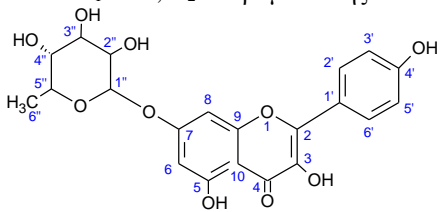
Συνεπώς θεωρούμε πηγή των φλαβονοειδών, των υπό μελέτη δειγμάτων γύρης μελισσών το φυτό προέλευσης της γύρης, καθώς η μέλισσα δεν είναι δυνατόν να συνθέσει τέτοια μόρια. Οι διαφορές που προκύπτουν στα τμήματα των σακχάρων των φλαβονοειδών πιθανώς να οφείλονται στην δράση των ενζύμων που εκκρίνει η μέλισσα, όπως και στην επαφή των γυρεόκοκκων με το μέλι που η μέλισσα χρησιμοποιεί για να πλάσει τα σφαιρίδια της γύρης που θα εναποθέσει στην κυψέλη.

Στα πλαίσια των βιολογικών μελετών, έγιναν αντιμικροβιακοί έλεγχοι στα εκχυλίσματα της γύρης, δίνοντας πολύ καλά αποτελέσματα για το βουτανολικό εκχύλισμα. Το συγκεκριμένο εκχύλισμα που είναι πλούσιο σε φλαβονοειδή, είχε πολύ ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση έναντι όλων των στελεχών στα οποία δοκιμάστηκε, καθώς και αρκετά ισχυρή αντιμυκητιασική δράση. Από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, μόνο το υδατικό είχε μια ελαφρά αντιμικροβιακή δράση.

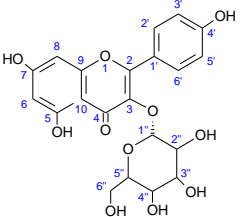
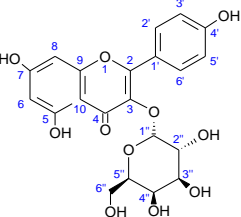
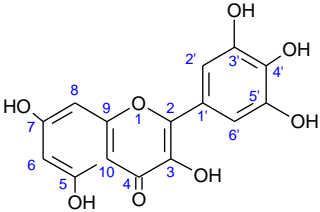
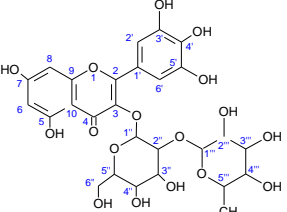
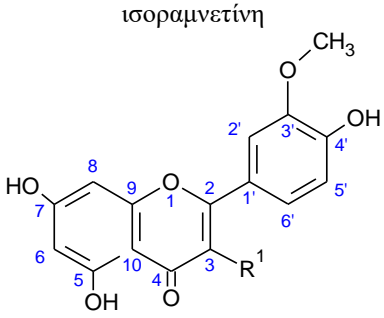
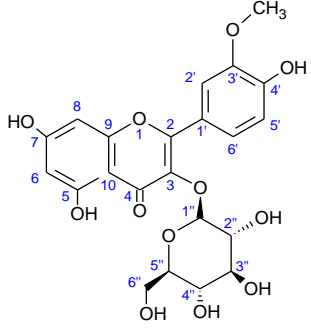
Τέλος, ένα κλάσμα του βουτανολικού εκχυλίσματος εμφάνισε αντιχολινεστερασική δράση με τη βιοαυτογραφική μέθοδο δίνοντας υποσχέσεις για πιθανή δράση κατά του Alzheimer.

Από το σύνολο της μελέτης συμπεραίνουμε ότι η γύρη από *Cistus creticus* θα μπορούσε να αποτελεί εξαιρετικό συμπλήρωμα διατροφής, θα μπορούσε να αποτελεί αντιμικροβιακό παράγοντα για την βιομηχανία τροφίμων ενώ περαιτέρω μελέτες των βιολογικών της δράσεων είναι αναγκαίες για μια ολοκληρωμένη αξιολόγησή της.



	<p><math>R_1=OH, R_2=-7\text{-ραμνοσίδης}</math></p>  <p><b>κερκέτινο-7-ραμνοσίδης (7)</b></p>
	<p><math>R_1= -O\text{-γλυκοσίδης}, R_2=OH</math></p>  <p><b>ισοκερκετίνη (9)</b></p>
	<p><math>R_1= -O\text{-γαλακτοσίδης}, R_2=OH</math></p>  <p><b>υπεροσίδης (8)</b></p>
<p>καμπφερόλη</p> 	<p><math>R_1= -O\text{-}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{2)ραμνόσυλ- γλυκοσίδης}, R_2=OH</math></p>  <p><b>καμπφερόλο-3-νεοεσπεριδοσίδης (1)</b></p> <p><math>R_1=OH, R_2=-7\text{-ραμνοσίδης}</math></p>  <p><b>καμπφερόλο -7-ραμνοσίδης (4)</b></p>



	<p><math>R_1 = -O\text{-}\beta\text{-}\text{D}\text{-}\text{glucopyranosyl}, R_2 = \text{OH}</math></p>  <p><b>αστραγαλίνη (6)</b></p>
	<p><math>R_1 = -O\text{-}\beta\text{-}\text{D}\text{-}\text{galactopyranosyl}, R_2 = \text{OH}</math></p>  <p><b>τριφολίνη (5)</b></p>
<p><b>μυρικετίνη</b></p> 	<p><math>R_1 = -O\text{-}\beta\text{-}(1\rightarrow2)\text{-}\text{D}\text{-}\text{rhamnosyl-glucopyranosyl}, R_2 = \text{OH}</math></p>  <p><b>μυρικέτινο-3-νεοεσπεριδοσίδη (3)</b></p>
<p><b>ισοραμνετίνη</b></p> 	<p><math>R_1 = -O\text{-}\beta\text{-}\text{D}\text{-}\text{galactopyranosyl}, R_2 = \text{OH}</math></p>  <p><b>ισοραμνέτινο-3-γαλακτοσίδη (10)</b></p>

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abramov, V, Bulahova E, Cherkasova A, Kulikova N Influence of natural products of beekeeping on the immune reactivity of sportsmen (in Russian) *Apitherapy and Beekeeping*, Vilnius, **1993**

Aliyazicioglu, Y., Deger, O., Ovali, E., Barlak, Y., Hosver, I., Tekelioglu, Y., & Karahan, S. C. Effects of Turkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines. *International immunopharmacology*, **2005**, 5(11), 1652-1657.

Almaraz-Abarca, N. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia*, **2004**, 29(10), 574-578.

Ananeva, T. V., & Dvoretiskii, A. I. Effect of beta-carotene oil and bee pollen on ion transport in rat brain slices following radiation-chemical exposure. *Radiatsionnaia biologiya, radioecologiya*, **1999** 39(2-3), 341-344.

Ανάσης Εμμανουήλ, *Τα φαρμακευτικά βότανα της Ελλάδος*, **1976**, 95-96.

Asafova, N., Orlov, B., & Kozin, R. Physiologically active bee products. *YA Nikolaev, Nizhny Novgorod, Russia*. **2001**.

Attaguile G, Caruso A, Pennisi G, Savoca F. Gastroprotective effect of aqueous extract of *Cistus incanus* L. in rats. *Pharmacol Res* **1995**, 31(1): 29-32.

Attaguile G, Perticone G, Mania G, Savoca F, Pennisi G, Salomone S. *Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle. *J Ethnopharmacol* **2004**, 92(2-3): 245-255.

Attia, Y. A., Al-Hanoun, A., Tag El-Din, A. E., Bovera, F., & Shewika, Y. E. Effect of bee pollen levels on productive, reproductive and blood traits of NZW rabbits. *Journal of animal physiology and animal nutrition* ,**2011**, 95(3), 294-303.

Barros, L., Dueñas, M., Alves, C. T., Silva, S., Henriques, M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Ind CropsProd*, **2013** 41, 41-45.

Βαρσάνη Μ, Χημική ανάλυση και βιολογικοί έλεγχοι δειγμάτων πρόπολης της ελληνικής αγοράς. Μεταπτυχιακή εργασία, Αθήνα ,**2016**

Barrajón-Catalán E, Fernández-Arroyo S, Roldán C, Guillén E, Saura D, Segura-Carretero A *et al*. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochem. Anal.* **2011**, 22(4): 303–312.

- Bashir, M. E. H., Lui, J. H., Palnivelevu, R., Naclerio, R. M., & Preuss, D. Pollen lipidomics: lipid profiling exposes a notable diversity in 22 allergenic pollen and potential biomarkers of the allergic immune response. *PLoS One*, **2013** 8(2), e57566.
- Boesch-Saadatmandi, C., Loboda, A., Wagner, A. E., Stachurska, A., Jozkowicz, A., Dulak, J., . & Rimbach, G. Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *J nutr biochem*,**2011** 22(3), 293-299.
- Bevzo, V. V., & Grygoreva, N. P. Effect of bee pollen extract on glutathione system activity in mice liver under X-ray irradiation. *Ukr biokhim zhurn* **1996**, 69(4), 115-117.
- Bin, L., & Yunru, L. Study on the Chemical Constituents of the Pollen of *Typha orientalis* [J]. *J beij univ trad chin med*, **1998** 2, 013.
- Bogdanov S; Bieri K; Gremaud G, Iff D, Känzig A, Seiler K, Stöcklic H, Zürcher K. Swiss Food Manual: Pollen *Bienenprodukte* ,**2004** BAG (Swiss Federal Office for Public Health); Berne
- Bouamama H, Noel T, Villard J, Benharref A, Jana M. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. Species. *J Ethnopharmacol* **2006**, 104(1–2):104-107.
- Bruneton, J. Pharmacognosie Phytochimie plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc, Paris.**1999**.
- Buck, A. C., R. W. M. Rees, and L. Ebeling. Treatment of chronic prostatitis and prostatodynia with pollen extract. *BJU International*, **1989**, 64(5), 496-499.
- Campisi, J. Cancer, aging and cellular senescence. *In vivo (Athens, Greece)*,**2000** 14(1), 183-188.
- Campos, M. D. G. R. *Caracterização do pólen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas atividades biológicas* (Doctoral dissertation). **1997**.Faculty of Pharmacy,University of Coimbra, Coimbra
- Campos, M. G., Cunha, A. P., Navarro, M. C., & Utrilla, M. P. Free radical scavenger activity of bee-pollen. *BULL LIAIS-GROUPE POLYPHEN*, **1994**, 17, 415-416.
- Campos, M. G., Webby, R. F., Markham, K. R., Mitchell, K. A., & Da Cunha, A. P. (2003). Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *J Agricult Food Chem*, **2003**, 51(3), 742-745.
- Carpes, S. T., Begnini, R., Alencar, S. M. D., & Masson, M. L. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência e agrotecnol*, **2007** 31(6), 1818-1825.

Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M. V., Velders, A. H., & Hermosín-Gutiérrez, I. Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* cv. Petit Verdot red wine grapes. *J Agricult Food Chem*, **2008** 57(1), 209-219.

Chevalier, G., Mousain, D., & Couteaudier, Y. Associations ectomycorhiziennes entre Tubercées et Cistacées. *Ann Phytopathol*, **1975** 7, 355-356.

Chambliss, W. G. (2003). A critical review of Graminex flower pollen extract for symptomatic relief of lower urinary tract symptoms (LUTS) in men. *Flower Pollen Extract and its Effect for Prostate Health*, **2003**, 4.

Chauvin R. (1968). Action physiologique et therapeutique des produits de la ruche Traite de biologie de l'abeille. *Tome III: Les produits de la ruche/ed. par Rémy CHAUVIN Paris: Masson*, **1968**, 116-154.

Chinou I, Demetzos C, Harvala C, Roussakis C, Verbist JF. Cytotoxic and antibacterial labdane type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Planta Med*. **1994**, 60(1):34-36

Chinou I, Chemistry and biological activities of propolis and royal jelly of greek origin. 4<sup>th</sup> international symposium on chromatography of natural products. Lublin, Poland (presentation), June 14-17, **2004**

Chinou I, Chemical analysis of propolis and royal jelly. Evaluation of their biological activities. HMPC informal meeting, German presidency, Bonn, Germany (oral presentation) March 28-30, **2007**

Choi, E. M. Antinociceptive and antiinflammatory activities of pine (*Pinus densiflora*) pollen extract. *Phytother Res* , **2007**, 21(5), 471-475.

Chondrogianni, N., Stratford, F. L., Trougakos, I. P., Friguet, B., Rivett, A. J., & Gonos, E. S. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *Journal of Biological Chemistry*, **2003** 278(30), 28026-28037.

Christenhusz, M. J., & Byng, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, **2016** 261(3), 201-217.

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

Costantini, F., and G. Ricciardelli. "Pollen as an additive to the chicken diet." *International Apicultural Congress, 23d, Moscow, 1971 (Proceedings)*. **1972**.

Crane, E. *Bees and beekeeping: Science, Practice and World Resources*. Cornstock Publ., Ithaca, NY., USA. **1990**.

Cristea, E., Sommer, L., Trifan, C., & Tudor, N. (1976). Antihepatotoxisches Präparat auf der Basis von Carduus-Extrakt und Pollen. *Neues in der Apitherapie*, **1976**, 285-289.

Dania F, Baziledze N, Melliou E, Rallis M, Papaioannou G. In vivo antidiabetic activity of greek propolis and royal jelly, Joint meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF, Athens, august 3-8, **2008**

Dauguet, J. C., Bert, M., Dolley, J., Bekaert, A., & Lewin, G. 8-Methoxykaempferol 3-neohesperidoside and other flavonoids from bee pollen of *Crataegus monogyna*. *Phytochemistry*, **1993** 33(6), 1503-1505.

Demetzos CN, Homatidou VI, Loukis AE, Philianos SM. The essential oil of *Cistus creticus*: Comparison with five other species of the genus *Cistus*. (poster abstract). *Planta medica*, **1989**, 55(7):633

Demetzos C, Harvala C, Philianos SM, Skaltsounis AL. A new labdane type diterpene and other compounds from the leaves of *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53(5):1365-1367

Demetzos, C., & Dimas, K. S. . Labdane-type diterpenes: chemistry and biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, **2001** 25, 235-292.

Dietz, A., & Stephenson, S. P. effect of long term storage on the nutritive value of pollen for brood rearing of honeybees. *American bee journal*. **1975**.

Dimas, K., Papadaki, M., Tsimplouli, C., Hatziantoniou, S., Alevizopoulos, K., Pantazis, P., Demetzos, C.. Labd-14-ene-8, 13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anticancer drugs. *Biomed & pharmacother*, **2006** 60(3), 127-133.

Dustmann, J. H., and E. Gunst. Inhibins and bacteriostatic action of beebread. *Apiacta; an international technical magazine of apicultural and economic information*, **1982**

Droebner K, Ehrhardt C, Poetter A, Ludwig S, Planz O. CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice, *Antiviral res* **2007**, 76(1):1-10.

Duran, G., Duran, N., Culha, G., Ozcan, B., Oztas, H., & Ozer, B. In vitro antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. *Parasitol res*, **2008** 102(6), 1217-1225.

Dutkiewicz, S. Usefulness of Cernilton in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Int urol nephrol*, **1996**, 28(1), 49-53.

- Ehrhardt, C., Hrinčius, E. R., Korte, V., Mazur, I., Droebner, K., Poetter, A., ... & Ludwig, S. . 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*, **2007** 76(1), 38-47.
- Elist, J. Effects of pollen extract preparation Prostat/Poltit on lower urinary tract symptoms in patients with chronic nonbacterial prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Urology*, **2006** 67(1), 60-63.
- Eraslan, G., Kanbur, M., Silici, S., Liman, B. C., Altınordulu, Ş., & Sarıca, Z. S. Evaluation of protective effect of bee pollen against propoxur toxicity in rat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2009**, 72(3), 931-937.
- Fathiazad, F., Delazar, A., Amiri, R., & Sarker, S. D. Extraction of flavonoids and quantification of rutin from waste tobacco leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **2010** 222-227.
- Feás, X., Vázquez-Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A., & Iglesias, A. Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, **2012** 17(7), 8359-8377.
- Ferrandis, P., Herranz, J. M., & Martínez-Sánchez, J. Effect of fire on hard-coated Cistaceae seed banks and its influence on techniques for quantifying seed banks. *Plant Ecology*, **1999** 144(1), 103-114.
- Francis, J. N., Till, S. J., & Durham, S. R. (2003). Induction of IL-10+ CD4+ CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allerg Clin Immunol*, **2003**, 111(6), 1255-1261.
- Fragkaki E. The tradition medicine of Crete. Publisher Athens, **1978**; p. 121
- Gjiovannetti, G., & Fontana, A.. Mycorrhizal synthesis between Cistaceae and Tuberaceae. *New Phytol*, **1982** 92(4), 533-537.
- Graikou K, Gortzi O, Lalas S, Chinou I, Chemical composition, biological activities of selected samples of propolis from south Greece. 58<sup>th</sup> Annual congress of GA, Berlin, Germany, **2010**
- Graikou K, Popova M, Gortzi O, Bankova V, Chinou I, Qualitative analysis and biological evaluation of selected propolis samples all over the world. 8<sup>th</sup> joint meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF, New York, USA, july 28, **2012**
- Graikou, K., Kapeta, S., Aligiannis, N., Sotiroudis, G., Chondrogianni, N., Gonos, E., & Chinou, I. (Chemical analysis of Greek pollen-Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. *Chemistry Central Journal*, **2011** 5(1), 33.

Guzmán B, Vargas P. Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, trnL-trnF, and matK sequences. *Mol Phylogen Evol* **2005**, 37(3): 644–660

Guzmán B, Vargas P. Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid rbcL and trnL-trnF sequences *Organisms, Divers & Evol* **2009**, 9(2):83–99

Habib, F. K., Ross, M., Buck, A. C., Ebeling, L., Lewenstein, A. (1990). In vitro evaluation of the pollen extract, cernitin T-60, in the regulation of prostate cell growth. *Br J Urol*, **1990**, 66(4), 393-7.

Hamamoto R, Ishiyama, K, Hashimoto K, Yamaguchi M (2006) Characterization of the active component in bee pollen *Cistus ladaniferus* extract in stimulating bone calcification and in inhibiting bone resorption in vitro. *J Health Sci*, **2006**, 52 (5): 607-612.

Hamamoto R, Ishiyama K, Yamaguchi M (2006) Inhibitory effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone resorption in femoral tissues and osteoclast-like cell formation in bone marrow cells *in vitro*. *J Health Sci*, **2006**, 52 (3): 268-275.

Hayflick, L., & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp cell res*, **1961** 25(3), 585-621.

Hatziantoniou, S., Dimas, K., Georgopoulos, A., Sotiriadou, N., & Demetzos, C. . Cytotoxic and antitumor activity of liposome-incorporated sclareol against cancer cell lines and human colon cancer xenografts. *Pharmacol res*, 2006, 53.1: 80-87.

Havakis E, Φυτά και Βοτάνια της Κρήτης, **1978**

Herbert, E. W., Svoboda, J. A., Thompson, M. J., & Shimanuki, H. Sterol utilization in honey bees fed a synthetic diet: Effects on brood rearing. *J Insect Physiol*, **1980** 26(5), 287-289.

Huang, Z. M. In vivo and in vitro antiviral activity of hyperoside extracted from *Abelmoschus manihot* (L) medik. *Acta Pharm Sinica*, **2007** 28(3), 404-409.

Howes, F. N. *Vegetable gums and resins*. Chronica Botanica Company.; Waltham Mass. **1949**

Ialomiteanu, M., Daghie, V., Nicolau, N., & Radulescu, M. (1976). Behandlung von Hepatitiden mit Pollen und Bienenbrot. *Neues Apither* ,**1976**, 292-302.

Ishiguro, K., Nagata, S., Fukumoto, H., Yamaki, M., Takagi, S., & Isoi, K. A flavanonol rhamnoside from *Hypericum japonicum*. *Phytochemistry*, **1991** 30(9), 3152-3153.

Ishikawa, Y, Tokura T, Nakano N, Hara M, Niyonsaba F, Ushio H, Yamamoto Y, Tadokoro T, Okumura K, Ogawa H (2008) . Inhibitory effect of honeybee-collected pollen on mast cell degranulation in vivo and in vitro. *J medl food*, **2008**, 11(1), 14-20.

Izuta, H., Shimazawa, M., Tsuruma, K., Araki, Y., Mishima, S., & Hara, H. (2009). Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC complem altern med* , **2009** 9(1), 45.

Jacques, B. Hedrick UP (éditeur).—Sturtevant's edible plants of the world. *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée*, **1974** 21(10), 374-374.

Junior, A. G., Gasparotto, F. M., Lourenço, E. L. B., Crestani, S., Stefanello, M. E. A., Salvador, M. J., ... & Kassuya, C. A. L. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *Journal of ethnopharmacology*,**2011** 134(2), 363-372

Juźwiak, S. Experimental evaluation of the effect of pollen extract on the course of paracetamol poisoning. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*, **1992** 39, 57-69.

Kalus U, Grigorov A, Kadecki O, Jansen J, Kesewetter H, Radke H. *Cistus incanus* (CYSTUS052) for treating patients with infection of the upper respiratory tract A prospective, randomised, placebo- controlled clinical study. *Antiviral Res* **2009**, 84(3):267-271

Kaifa, W. Zhang Shenglong 1 The Application and Prospect of Pollen Cosmetics *Flavour Fragrance Cosmetics*,**2002** 3.

Kahler, H., Stüwe, H. T., Cromwell, O., & Fiebig, H. (1999). Reactivity of T cells with grass pollen allergen extract and allergoid. *Int archiv allerg immunol*,**1999**, 120(2), 146-157.

Kaplan, M., Karaoglu, Ö., Eroglu, N., & Silici, S. Fatty Acid and Proximate Composition of Bee Bread. *Food technology and biotechnology*, **2016** 54(4), 497

Kaškonienė, V., Kaškonas, P., Maruška, A., & Kubilienė, L. Chemometric analysis of volatiles of propolis from different regions using static headspace GC-MS. *Open Chem*,**2014** 12(6), 736-746.

Kazuma, K., Noda, N., & Suzuki, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*,**2003** 62(2), 229-237.

Kędzia, B. (2008). Chemical composition and adaptogenic activity of honeybee-collected pollen. part i. chemical composition. *Postępy Fitoterapii*.**2008**.

Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2015**.



- Küpeli, E., Orhan, D. D., & Yesilada, E. Effect of *Cistus laurifolius* L. leaf extracts and flavonoids on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J ethnopharmacol*, **2006** 103(3), 455-460.
- Kuruüzüm-Uz, A., Güvenalp, Z., Kazaz, C., & Demirezer, L. Ö. Phenolic compounds from the roots of *Anchusa azurea* var. *azurea*. *Turkish J Pharm Sciences*, **2013** 10(2).
- Lambrou S., Τα βότανα και οι θεραπευτικές τους ιδιότητες, Εκδόσεις Σπύρος Σπύρου Ε. Ε, Αθήνα, **1984**
- Larsen, T. H., Poulsen, L. K., Melac, M., Combebias, A., Andre, C., & Malling, H. J. (2006). Safety and tolerability of grass pollen tablets in sublingual immunotherapy—a phase-1 study. *Allergy* ,**2006** 61(10), 1173-1176.
- Lardos, A. The botanical materia medica of the Iatrosophikon—a collection of prescriptions from a monastery in Cyprus. *J Ethnopharmacol*, **2006** 104(3), 387-406.
- LeBlanc, B. W., Davis, O. K., Boue, S., DeLucca, A., & Deeby, T. (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chem* ,**2009** , 115(4), 1299-1305.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J., & Czekońska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chem* ,**2007** , 100(1), 237-240.
- Li, S., Zhang, Z., Cain, A., Wang, B., Long, M., & Taylor, J. Antifungal activity of camptothecin, trifolin, and hyperoside isolated from *Camptotheca acuminata*. *J agricult food chem*,**2005** 53(1), 32-37.
- Lin, X. L., Zhu, L. Q., Yuan, Y. Y., & Li, L. M. (1990). Morphological changes in aged canine prostatic hyperplasia treated with bee pollen. *Chin Trad Herbal Drugs* ,**1990** , 21, 164-166.
- Maeda, N., Kawasaki, T., Nakade, S., Yokota, N., Taguchi, T., Kasai, M., & Mikoshiba, K. Structural and functional characterization of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum. *Journal of Biological Chemistry* , **1991** 266(2), 1109-1116.
- Maggi, F., Lucarini, D., Papa, F., Peron, G., & Dall'Acqua, S. Phytochemical analysis of the labdanum-poor *Cistus creticus* subsp. *eriocephalus* (Viv.) Greuter et Burdet growing in central Italy. *Biochem Syst Ecol*,**2016** 66, 50-57.
- Manning, R. Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees. *Bee World* , **2001** 82(2), 60-75.
- Mărgăoan, R., Mărghitaș, L. A., Dezmirean, D., Mihai, C. M., & Bobiș, O. Bee collected pollen—General aspects and chemical composition. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*,**2010** 67(1-2).

- Marghitas, L. A., Stanciu, O. G., Dezmirean, D. S., Bobiș, O., Popescu, O., Bogdanov, S., & Campos, M. G. (2009). *In vitro* antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chem*, **2009**, 115(3), 878-883.
- Marston, A., Kissling, J., & Hostettmann, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis*, **2002** 13(1), 51-54.
- Maruyama, H., Sakamoto, T., Araki, Y., & Hara, H. (2010). Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus* sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. *BMC complem altern med* ,**2010**, 10(1), 30.
- Maughan, R. J., & Evans, S. P. (1982). Effects of pollen extract upon adolescent swimmers. *Brit j sports med*,**1982**, 16(3), 142-145.
- Medeiros, K. C. P., Figueiredo, C. A. V., Figueredo, T. B., Freire, K. R. L., Santos, F. A. R., Alcântara-Neves, N. M., ... & Piuvezam, M. R. (2008). Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. *J ethnopharmacol* ,**2008**, 119(1), 41-46.
- Melliou E, Chinou I, Chemical analysis and antimicrobial activity of greek propolis, *Planta Med*. 70: 515-519,**2004**
- Moingeon, P., Hrabina, M., Bergmann, K. C., Jaeger, S., Frati, F., Bordas, V., & Peltre, G. (2008). Specific immunotherapy for common grass pollen allergies: pertinence of a five grass pollen vaccine. *Int arch allergy immunol* ,**2008**, 146(4), 338-342.
- Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & Estevinho, L. M. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem Toxicol* ,**2011** 49(5), 1096-1101.
- Muniategui, S., Simal, J., Huidobro, J. F., & Garcia, M. C. et al. Study of fatty acids of bee-collected pollen. *Grasas y Aceites (Spain)* ,**1989**.
- Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N., Tanoue, Y., Kai, N., & Nagashima, T. (2007). Antihypertensive activities of enzymatic hydrolysates from honeybee-collected pollen of *Cistus ladaniferus*. *Int j food agricult environm* ,**2007**, 5(3-4), 86-89.
- Nair, H. K., Rao, K. V., Aalinkeel, R., Mahajan, S., Chawda, R., & Schwartz, S. A. (2004). Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clin Diagn Lab Immunol* ,**2004**, 11(1), 63-69.
- Nechaeva, N. Changes of functional and sport medicine after intake of bee products. *Ryazan State Medical University Ryazan* ,**2009**, 1-250.

Oliveira, K. C., Moriya, M., Azedo, R. A., Almeida-Muradian, L. B. D., Teixeira, E. W., Alves, M. L., & Moreti, A. C.. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. *Química Nova*,**2009** 32(5), 1099-1102.

Orfali, G., Duarte, A. C., Bonadio, V., Martinez, N. P., de Araújo, M. E. M. B., Priviero, F. B. M., & Priolli, D. G. Review of anticancer mechanisms of isoquercitin. *World j clin oncol* **2016** 7(2), 189.

Paolini J, Falchi A, Quilichini Y, Desjobert JM, Cian MC, Varesi L *et al.* Chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*). *Phytochemistry* **2009**, 70(9):1146–1160

Papaefthimiou D, Papanikolaou A, Falara V, Givanoudi S, Kostas S, Kanellis A. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties *Frontiers Chem* **2014**, 2: 33

Papachroni D, Χημική ανάλυση επιλεγμένων δειγμάτων αφρικανικής πρόπολης. Μεταπτυχιακή εργασία, Αθήνα **2014**

Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, **2014** 63, 233-239.

Percie Du Sert, P *Ces pollens qui nous soignent.* Paris ; **2002** , pp211 (Guy Trédaniel. edition)

Percie Du Sert, P. P. Les pollens apicoles. *Phytothérapie*,**2009** 7(2), 75.

Percie Du Sert, P. Probiotic effect of lactic acid bacteria in fresh pollen. *41st Apimondia Congress Montpellier*.**2009**.

Petereit F, Kolodziej H, Nahrstedt A. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry* **1991** 30(3):981-985

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, **2008** 4(2), 89.

Pinto, B., Caciagli, F., Riccio, E., Reali, D., Šarić, A., Balog, Scarpato, R. Antiestrogenic and antigenotoxic activity of bee pollen from *Cystus incanus* and *Salix alba* as evaluated by the yeast estrogen screen and the micronucleus assay in human lymphocytes. *Eur j med chem*,**2010** 45(9), 4122-4128.

Polunin, O., & Huxley, A. Flowers of the Mediterranean. *London: Chatto and Windus xii, 260p.- Illus., col. illus., maps.. First publ.***1965**

Punt, W., Blackmore, S., Hoen, P. P., & Stafford, P. J. (Eds.). (2003). *The northwest European pollen flora*. Elsevier, **2003** vol.121

Punyakin A. Biochemical evaluation of the use of bee products in sport medicine (in Russian). University of Ryazan, Ryazan, **2001**.

Puzanowska-Tarasiewicz, H., Kuźmicka, L., & Tarasiewicz, M. Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu. *Bromat. Chem. Toksykol*, **2010** 43(1), 9-14.

Riehle, P., Vollmer, M., & Rohn, S. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions—antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food research international*, **2013** 53(2), 891-899.

Rogerio, A. P., Kanashiro, A., Fontanari, C., Da Silva, E. V. G., Lucisano-Valim, Y. M., Soares, E. G., & Faccioli, L. H. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflamm res*, **2007** 56(10), 402-408.

Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Kabała-Dzik, A., Kubina, R., Buszman, E. Polyphenols from bee pollen: structure, absorption, metabolism and biological activity. *Molecules*, **2015** 20(12), 21732-21749.

Saden-Krehula, M., & Tajić, M. Vitamin D and its metabolites in the pollen of pine. Part 5: Steroid hormones in the pollen of pine species. *Die Pharmazie*, **1987** 42(7), 471-472.

Šarić, A., Balog, T., Sobočanec, S., Kušić, B., Šverko, V., Rusak, G. Marotti, Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food Chem Toxicol*, **2009** 47(3), 547-554.

Schmidt, J. O., & Buchmann, S. L. Other products of the hive. *The Hive and the Honey Bee, Hamilton, Illinois*, **1992** 928-977

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer j Enology Viticult*, **1965** 16(3), 144-158.

Sharaf, M., El-Ansari, M. A., & Saleh, N. A. Flavonoids of four *Cleome* and three *Capparis* species. *Biochem Syst Ecol*, **1997** 25(2), 161-166.

Skorić, Marijana, et al. Cytotoxic activity of ethanol extracts of *in vitro* grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines. *Ind Crops Prod*, **2012**, 38: 153-159

Skrzypczak-Jankun, E., Zhou, K., & Jankun, J. Inhibition of lipoxygenase by (-)-epigallocatechin gallate: X-ray analysis at 2.1 Å reveals degradation of EGCG and shows soybean LOX-3 complex with EGC instead. *International journal of molecular medicine*, **2003n** 12(4), 415-420.

Σκρέκη Α, Χημική ανάλυση επιλεγμένων δειγμάτων πρόπολης Αρμενίας και Κιργιστάν, διπλωματική εργασία, Αθήνα, **2016**

Sotiroudis, T. G., Kyrtopoulos, S. A., Xenakis, A., & Sotiroudis, G. T. Chemopreventive potential of minor components of olive oil against cancer. *Italian Journal of Food Science (Italy)*.**2003**

Stanley, R. G., & Linskens, H. F. Pollen: Biology. *Biochemistry, management*, **1974** 33-36.

Standifer, L. N. A comparison of the protein quality of pollens for growth-stimulation of the hypopharyngeal glands and longevity of honey bees, *Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae). *Insectes sociaux*, **1967** 14(4), 415-425.

Stratis E, Kretsi E., Chinou I. In vitro antimicrobial activity of the essential oils of greek propolis. 12<sup>th</sup> European congress of clinical microbiology and infectious diseases. Milan, Italy, 24-27 April. **2002**

Svoboda, J. A., Herbert, E. W., & Thompson, M. J. Definitive evidence for lack of phytosterol dealkylation in honey bees. *Experientia*, **1983** 39(10), 1120-1121.

Thanos, C. A., Georghiou, K., Kadis, C., & Pantazi, C. Cistaceae: a plant family with hard seeds. *Israel J Botany*,**1992** 41(4-6), 251-263.

Thompson, I. M. Pharmacologic agents in complementary medicine in prostatic disease. *Drugs Today*, **2001** 37(6), 427.

Tikhonov, A. I., Sodsavichniy, K., Tichonov, C. A., Yarnich, T. G., Bodnarchuk, L. I., & Kotenko, A. M. (2006). Bee Pollen in Pharmacy and Medicine. *NFU Original Harkov*.**2006**.

Tomás-Menor, L., Morales-Soto, A., Barraji3n-Catal3n, E., Rold3n-Segura, C., Segura-Carretero, A., & Micol, V. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food chem toxicol*, **2013** 55, 313-322.

Torres, F., Quintana, J., D3az, J. G., Carmona, A. J., & Est3vez, F. Trifolin acetate-induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspase-6 and activates the MAPK pathway. *Apoptosis*, **2008** 13(5), 716-728.

Τσιφτσόγλου, Ο. Μελέτη Του Φυτου *Allysum alyssoides* της οικογένειας *Brassicaceae* (*Cruciferae*) Master dissertation, **2013** Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ). Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Φαρμακευτικής. Τομέας Φαρμακογνωσίας-Φαρμακολογίας. Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας.

Turner, K. K., Nielsen, B. D., O'Connor, C. I., & Burton, J. L. Bee pollen product supplementation to horses in training seems to improve feed intake: a pilot study. *J animal physiol animal nutr*, **2006** 90(9-10), 414-420.

Truchado, P., Ferreres, F., Bortolotti, L., Sabatini, A. G., & Tomás-Barberán, F. A. Nectar flavonol rhamnosides are floral markers of acacia (*Robinia pseudacacia*) honey. *J Agricult Food Chem*, **2008** 56(19), 8815-8824.

Usher, G. *A dictionary of plants used by man*. Constable and Company Ltd., **1974**

Uzbekova, D. G., Makarova, V. G., Khvoynitskaya, L. G., & Slepnev, A. A. Evaluation of bee-collected pollen influence on lipid peroxidation, antioxidant system and liver function in old animals. *J Hepatol*, **2003** 38, 203.

Vaya, J., & Aviram, M. Nutritional antioxidants mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. *Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*, **2001** 1(1), 99-117.

Vitali F, Pennisi G, Attaguile G, Savoca F, Tita B. Antiproliferative and cytotoxic activity of extracts from *Cistus incanus* L and *Cistus monspeliensis* L on human prostate cell lines. *Natural Prod Re* **2011**, 25(3):188–202

Vogt, T., & Taylor, L. P. Flavonol 3-O-glycosyltransferases associated with petunia pollen produce gametophyte-specific flavonol diglycosides. *Plant physiology*, **1995** 108(3), 903-911.

Wachholz, P. A., Soni, N. K., Till, S. J., & Durham, S. R. Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, **2003** 112(5), 915-922.

Wang, B., Diao, Q., Zhang, Z., Liu, Y., Gao, Q., Zhou, Y., & Li, S. Antitumor activity of bee pollen polysaccharides from *Rosa rugosa*. *Molecular medicine reports*, **2013** 7(5), 1555-1558.

Wang, J., Li, S., Wang, Q., Xin, B., & Wang, H. Trophic effect of bee pollen on small intestine in broiler chickens. *J Med Food*, **2007** 10(2), 276-280.

Wang, M. S., Fan, H. F., & Xu, H. J. Effects of bee pollen on blood and hemopoietic system in mice and rats. *Chin Trad Herbal Drugs*, **1993** 24, 588-91.

Winston M., *The Biology of the Honey Bee*, Harvard University Press, **1991**

Wittpahl, G., Kölling-Speer, I., Basche, S., Herrmann, E., Hannig, M., Speer, K., & Hannig, C.. The polyphenolic composition of *Cistus incanus* herbal tea and its antibacterial and anti-adherent activity against *Streptococcus mutans*. *Planta medica*, **2015** 81(18), 1727-1735.

Woodhouse, M. L., Williams, M., & Jackson, C. The effects of varying doses of orally ingested bee pollen extract upon selected performance variables. *Athletic Training*, **1987** 22(1), 26-28.

Wortmann, F. Oral hyposensitization of children with pollinosis or house-dust asthma. *Allergol et immunopathol*, **1976** 5(1), 15-26.

Wu, Y. D., & Lou, Y. J. A steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of *Brassica campestris* induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Phytother Res*, **2007** 21(11), 1087-1091.

Χατζόπουλος Οδυσσέας, Διοσκουρίδης, Απαντα Ι: *Περί Ύλης Ιατρικής*, , μετάφραση στα Νέα Ελληνικά από τον Οδυσσέα Χατζόπουλο, εκδόσεις Καστος **2000** τόμος Α, σελ. 184-187

Xie, Y., Wan, B., & Li, W. Effect of bee pollen on maternal nutrition and fetal growth. *J West China Univ Med Scie*, **1994** 25(4), 434-437.

Xue X, Zhao J, Chen L, Zhou J, Yue B, Li Y, Wu L, Liu F . Analysis of coenzyme Q10 in bee pollen using online cleanup by accelerated solvent extraction and high performance liquid chromatography. *Food chem*, **2012** 133(2), 573-578.

Yakusheva, E. Pollen and bee bread: physico-chemical properties. Biological and pharmacological effects. Use in medical practice. *Theor Pract Basics Apither*, **2010** 84-97.

Yamaguchi, M., Hamamoto, R., Uchiyama, S., Ishiyama, K., & Hashimoto, K. Anabolic effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone components in the femoral-diaphyseal and-metaphyseal tissues of rats *in vitro* and *in vivo*. *J health sci*, **2006** 52(1), 43-49.

Yamaguchi, M., Hamamoto, R., Uchiyama, S., Ishiyama, K., & Hashimoto, K. Preventive effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone loss in streptozotocin-diabetic rats *in vivo*. *J health sci*, **2007** 53(2), 190-195.

Yasumoto, R., Kawanishi, H., Tsujino, T., Tsujita, M., Nishisaka, N., Horii, A., & Kishimoto, T. Clinical evaluation of long-term treatment using cernitin pollen extract in patients with benign prostatic hyperplasia. *Clin Therap*, **1995** 17(1), 82-87.

Yıldız, O., Can, Z., Saral, Ö., Yuluğ, E., Öztürk, F., Aliyazıcıoğlu, R., Kolaylı, S. Hepatoprotective potential of chestnut bee pollen on carbon tetrachloride-induced hepatic damages in rats. *E-based compl altern med*, **2013**.

Yildiz, O., Karahalil, F., Can, Z., Sahin, H., & Kolayli, S. (2014). Total monoamine oxidase (MAO) inhibition by chestnut honey, pollen and propolis. *J enzyme inh med chem*, **2014** 29(5), 690-694.

Yook, H. S., Lim, S. I., & Byun, M. W. . Changes in microbiological and physicochemical properties of bee pollen by application of gamma irradiation and ozone treatment. *J Food Prot*, **1998** 61(2), 217-220.

Youdim, K. A., Martin, A., & Joseph, J. A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **2000** 18(4), 383-399.

Zeng, Z. J., Wang, L. G. B., Fan, Z. B., Xie, G. X. A Study on the Effect of Honeybee Pollen Polysaccharide on Decreasing Lipoidemia in Rat [J]. *Acta Agricult Univ Jiangx*,**2004** 3, 021.

Zhang, X., Habib, F. K., Ross, M., Burger, U., Lewenstein, A., Rose, K., & Jatton, J. C. Isolation and characterization of a cyclic hydroxamic acid from a pollen extract, which inhibits cancerous cell growth *in vitro*. *J med chem*,**1995** 38(4), 735-738.

Zhang, R., Yao, Y., Wang, Y., & Ren, G. Antidiabetic activity of isoquercetin in diabetic KK-A y mice. *Nutr & metabol* **2011** 8(1), 85

Zhang, N., Ying, M. D., Wu, Y. P., Zhou, Z. H., Ye, Z. M., Li, H., & Lin, D. S. Hyperoside, a flavonoid compound, inhibits proliferation and stimulates osteogenic differentiation of human osteosarcoma cells. *PloS one*,**2014** 9(7), e98973.

Διαδικτυακή βιβλιογραφία

[www.ladano.blogspot.gr-5/10/2017](http://www.ladano.blogspot.gr-5/10/2017)

[www.alamy.com-5/10/2017](http://www.alamy.com-5/10/2017)

[www.wikipedia.com-5/10/2017](http://www.wikipedia.com-5/10/2017)