



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

“ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΤΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΛΑΜΙΑΣΕΑΕ ΩΣ ΠΡΟΣ
ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗ
ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ A_hR , ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΙΣ
ΔΕΡΜΑΤΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ”

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΑΛΛΙΜΑΝΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ
MSc ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2022

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΩΑΝΝΑ Β. ΧΗΝΟΥ

“ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΤΩΝ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ LAMIACEAE ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ A_hR , ΜΕ
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΙΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ”

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΑΛΛΙΜΑΝΗΣ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

MSc ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΙΩΑΝΝΑ Β. ΧΗΝΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΙΩΑΝΝΑ ΧΗΝΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΚΠΑ

ΠΡΟΚΟΠΙΟΣ ΜΑΓΙΑΤΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΒΕΛΕΓΡΑΚΗ ΑΡΙΣΤΕΑ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΙΩΑΝΝΑ ΧΗΝΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΚΠΑ

ΠΡΟΚΟΠΙΟΣ ΜΑΓΙΑΤΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΒΕΛΕΓΡΑΚΗ ΑΡΙΣΤΕΑ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΚΠΑ

ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΑΛΗΓΙΑΝΝΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΜΙΧΑΗΛ ΡΑΛΛΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΔΡΑΚΟΥΛΗΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΓΚΙΚΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2022

*“Η θέληση και η προσπάθεια είναι του ανθρώπου,
το αποτέλεσμα του Θεού”*
Άγιος Πάϊσιος

*Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται:
στον αείμνηστο πατέρα μου Δρ. Γεώργιο Καλλιμάνη
τον επιστημονικό μου φάρο που με έμαθε να ερευνώ,
στην μητέρα μου Μαρία Καλλιμάνη
τον άγιο άνθρωπο που με έμαθε να αγαπώ,
στην κόρη μου Μαρίλια-Θεοδώρα Καλλιμάνη
το δώρο του Θεού που με έμαθε να φιλοσοφώ.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής: την κ. Ιωάννα Χήνου, Καθηγήτρια Φαρμακευτικού Τμήματος ΕΚΠΑ, τον κ. Προκόπιο Μαγιάτη, Αναπληρωτής Καθηγητή Φαρμακευτικού Τμήματος ΕΚΠΑ και την κ. Αριστέα Βελεγράκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής σχολής του ΕΚΠΑ, που μου έδωσαν την ευκαιρία να βιώσω το υπέροχο ταξίδι γνώσεων και εμπειριών που ονομάζεται διδακτορική διατριβή στον Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την επιβλέπουσα της διδακτορικής διατριβής, την Καθηγήτρια κ. Ιωάννα Χήνου για την αμέριστη κατανόηση, την καθοδήγηση και συμπαράσταση της σε αυτό το μακρύ και ανηφορικό μονοπάτι έρευνας. Ήταν πάντα εκεί, διαθέσιμη και υποστηρικτική με αξιοθαύμαστο αλτρουισμό. Της είμαι ευγνώμων.

Οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Προκόπιο Μαγιάτη, Αναπληρωτή Καθηγητή, ο οποίος ήταν και ο εμπνευστής της παρούσας διδακτορικής έρευνας. Το σπουδαίο ήθος και η άριστη επιστημονική του κατάρτιση, μου μεταλαμπάδευσαν όλα όσα έπρεπε για να γίνω καλύτερος ως επιστήμων. Του είμαι ευγνώμων.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω προς τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της διατριβής, τον κ. Νεκτάριο Αληγιάννη Αναπληρωτή Καθηγητή ΕΚΠΑ, τον κ. Μιχαήλ Ράλλη, Αναπληρωτή Καθηγητή ΕΚΠΑ, τον κ. Νικόλαο Δρακούλη Αναπληρωτή Καθηγητή ΕΚΠΑ και τον κ. Ευάγγελο Γκίκα, Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας ΕΚΠΑ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αείμνηστο Καθηγητή Michael Denison και τον Dr Anatoly Soshilov του Εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου DAVIS της Καλιφόρνια των Η.Π.Α, για την διενέργεια των πειραμάτων που αφορούν τον υποδοχέα διοξίνων (AhR).

Ευχαριστώ τον Δρα Παναγιώτη Ζουμπουλάκη και την Δρα Θάλεια Τσιάκα του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ) για την πολύτιμη βοήθεια τους στα φάσματα NMR.

Ευχαριστώ την Δρα Ελένη Μέλλιου της Φαρμακευτικής σχολής του ΕΚΠΑ, για την αμέριστη βοήθεια της καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ευχαριστώ την Δρα Αγγελική Παναγιωτοπούλου του ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ για την πολύτιμη βοήθεια της στα φάσματα NMR.

Ευχαριστώ τον Δρα Ε. Καλπουτζάκη ΕΔΙΠ Φαρμακευτικού Τμήματος ΕΚΠΑ για τη συλλογή και ταυτοποίηση μέρους των φυτικών ειδών που μελετήθηκαν.

Ευχαριστώ τον κ. Ν. Χριστοδουλάκη, Καθηγητή Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ και την κ. Ι. Παπανικολάου, για τη συλλογή και ταυτοποίηση μέρους των φυτών από τον Βοτανικό κήπο «Ιουλίας και Αλεξάνδρου Ν. Διομήδους» του ΕΚΠΑ.

Ευχαριστώ όλους τους συναδέλφους του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων για την ευγένεια τους και την συμπαράσταση τους. Ιδιαίτερος δε την Δρα Νικητία Μέξια για την πολύτιμη βοήθεια της.

Ευχαριστίες οφείλω στους καθηγητές της Φαρμακευτικής σχολής του Πανεπιστημίου της Ρώμης, ROMA I "La Sapienza", που με έμαθαν να μελετώ και να

σκέπτομαι με «φαρμακευτικό» τρόπο. Ιδιαίτερα δε την Καθηγήτρια Φαρμακογνωσίας κ. Gabriela Mazzanti που ήταν η επιβλέπουσα της πτυχιακής μου εργασίας.

Επίσης ευχαριστώ οφείλω σε όλους τους καθηγητές του ΕΚΠΑ και τους συνεργάτες ιατρούς του μεταπτυχιακού διπλώματος της Κλινικής Φαρμακευτικής για τα τόσα πολλά που μου έμαθαν και κυρίως για την βοήθεια τους στο να εξελίξω των τρόπο σκέψης μου σε «κλινικό-φαρμακευτικό».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους πελάτες-φίλους του φαρμακείου μου για την συμπαράσταση και την κατανόηση όλων αυτών των ετών.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τον αείμνηστο πατέρα μου Γεώργιο, την μητέρα μου Μαρία, την κόρη μου Μαρίλια-Θεοδώρα, τη σύζυγο μου Μαίρη Γιαλαμά, τον αδελφό μου Δημήτρη και τις ανιψιές μου Μαρία και Γεωργία.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

[...] Η αρχή των όλων είναι η φιλοσοφία. Το σύμπαν ή τα παράλληλα σύμπαντα του Χόπκινς ή οι εφτά σφαίρες του τρισμέγιστου Ερμή αποτελούν ένα κλειστό σύστημα. Μέσα σε αυτό βρίσκουμε όλα τα αντίθετα ζεύγη: το όμορφο αλλά και το άσχημο, το καλό αλλά και το κακό, τη νόσο αλλά και την υγεία. Η φύση υπακούει στο νόμο της δυναμικής αρμονίας όπου όλα αλλάζουν και μεταλλάσσονται. Οι αλχημιστές δεν είχαν σα σκοπό τους να μετατρέψουν τα πάντα σε χρυσό αλλά έψαχναν ένα “καταλύτη” για να επιδράσουν σε αυτή τη δυναμική ισορροπία και να μετατρέψουν το “κακό” σε “καλό”, το “άσχημο” σε “όμορφο”, το παθολογικό σε υγιές. Ο “καταλύτης” αυτός είναι ένα κομμάτι του συστήματος, δηλαδή ένα κομμάτι της φύσης. Συνεπώς η φύση έχει την λύση, έχει τον “καταλύτη” για να μετατρέψει τη νόσο σε υγεία. Για να βρεθεί όμως ο “καταλύτης”-θεραπευτική ουσία χρειάζεται να ερευνήσουμε τη φύση στην ολότητα της σεβόμενοι τους νόμους της, τους μηχανισμούς που τη διέπουν τόσο στο μακρόκοσμο όσο και στο μικρόκοσμο.

Οι φυσικοί αυτοί “καταλύτες” προσφέρουν θεραπευτικές λύσεις με εξαιρετικά αποτελέσματα, ακόμα και σε δύσκολες περιπτώσεις, με ελάχιστες ανεπιθύμητες ενέργειες δεδομένου ότι σέβονται την ομοιόσταση και γενικότερα τη φύση του οργανισμού όσο κανένας άλλος. Πρέπει να επισημανθεί ότι για να γίνει αυτό θα πρέπει να υπάρχει η κατάλληλη θεραπευτική στρατηγική και δοσολογία. Δεν φταίει η φύση αν δεν χρησιμοποιούμε σωστά τους “καταλύτες” της! Δεν επαρκεί μόνο η **γνώση**, χρειάζεται και η **φαντασία**, η **παρατήρηση**, το **ήθος** και βέβαια υπέρμετρη **αγάπη!** [...]

Αν μπορούσα να βάλω ένα γενικό τίτλο στην παρούσα διδακτορική διατριβή θα ήταν:

Ταξίδι στην ανεύρεση “καταλυτών”.

Παναγιώτης Καλλιμάνης
Φαρμακοποιός
M.Sc Κλινικός Φαρμακοποιός

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σκοπός και σύνοψη της διατριβής.....	1
--------------------------------------	---

A. Θεωρητικό μέρος

1. Δρογοβοτανική Χειλανθών.....	5
1.1 Το γένος <i>Salvia</i>	5
1.1.1 <i>Salvia fruticosa</i> Miller (<i>syn. Salvia triloba</i> L.)	7
1.1.1.1 Δρογοβοτανική.....	7
1.1.1.2 Δρογοϊστορία.....	9
1.1.1.3 Δρογοχημεία.....	10
1.1.1.4 Δρογοφαρμακολογία.....	10
1.1.1.4.1 Στοιχεία από την παραδοσιακή ιατρική.....	10
1.1.1.4.2 Στοιχεία από μελέτες <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> σε πειραματόζωα.....	13
A. Κεντρικό νευρικό σύστημα.....	13
A1. Δράση κατά της νόσου Alzheimer.....	13
B. Νεοπλασίες.....	15
Γ. Στοματική κοιλότητα.....	19
Δ. Αντιοξειδωτική δράση.....	19
Ε. Αντιμικροβιακή δράση.....	21
Z. Επίδραση επί των λειών μυϊκών ινών.....	22
Η. Δράσεις επί του μεταβολισμού.....	23
Θ. Ανοσοποιητικό σύστημα.....	25
Ι. Αντιφλεγμονώδης δράση.....	25
1.1.1.4.3 Κλινικά στοιχεία.....	26
1.1.1.5 Τοξικότητα.....	26
1.1.1.6 Φαρμακευτικές μορφές: ενδείξεις και δοσολογία.....	27
1.1.2. <i>Salvia officinalis</i> L.	27
1.1.2.1 Δρογοβοτανική.....	27
1.1.2.2 Δρογοϊστορία.....	28
1.1.2.3 Δρογοχημεία.....	31
1.1.2.4 Δρογοφαρμακολογία.....	33
1.1.2.4.1 Στοιχεία από την παραδοσιακή ιατρική.....	33
1.1.2.4.2 Στοιχεία από μελέτες <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> σε πειραματόζωα.....	33
A. Στοματική κοιλότητα.....	33
B. Γαστροπροστατευτική δράση.....	33
Γ. Αντιδιαρροϊκή και αντισπασμωδική δράση.....	34
Δ. Δράση κατά νεοπλασιών.....	34
Ε. Αντιοξειδωτική δράση.....	36
Z. Αντιφλεγμονώδης και αναλγητική δράση.....	36
Η. Δράσεις επί του μεταβολισμού.....	37
Θ. Αντιμικροβιακές/ αντιπαρασιτικές ιδιότητες.....	37

I. Βελτίωση γνωστικής λειτουργίας και της μνήμης.....	38
1.1.2.4.3 Κλινικές μελέτες.....	38
1.1.2.5 Τοξικολογικά στοιχεία.....	43
1.1.2.6 Φαρμακευτικές μορφές: ενδείξεις και δοσολογία.....	45
1.1.3 <i>Rosmarinus officinalis</i> L (syn. <i>Salvia rosmarinus</i> Sinn.).....	50
1.1.3.1 Δρογοβοτανική.....	50
1.1.3.2 Δρογοϊστορία.....	52
1.1.3.3 Δρογοχημεία.....	53
1.1.3.4 Δρογοφαρμακολογία.....	54
1.1.3.4.1 Στοιχεία από την παραδοσιακή ιατρική.....	55
1.1.3.4.2 Στοιχεία από μελέτες <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> σε πειραματόζωα.....	56
A. Αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση.....	56
B. Αντιοξειδωτική δράση.....	57
Γ. Αντινεοπλασματική δράση.....	58
Δ. Αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση.....	59
E. Αντιδιαβητική δράση.....	59
Z. Γαστροπροστατευτική δράση.....	59
H. Αντικαταθλιπτική δράση.....	60
Θ. Αγχολυτική δράση.....	60
I. Αντιθρομβωτικά δράση.....	60
K. Αντιφθειρική δράση.....	60
Λ. Προστασία από την UV ακτινοβολία.....	60
M. Άλλες δράσεις.....	61
1.1.3.4.3 Κλινικά στοιχεία.....	61
1.1.3.5 Τοξικολογικά στοιχεία.....	64
1.1.3.6 Φαρμακευτικές μορφές: ενδείξεις και δοσολογία.....	65
2. Διτερπένια αβιετανίου.....	69
3. Πεντακυκλικά τριτερπένια.....	70
4. Ανίχνευση και ποσοτική ανάλυση των διτερπενίων αβιετανίου σε είδη της οικογένειας των Χειλανθών (Lamiaceae).....	71
4.1 Επιλογή φυτών της οικογένειας Lamiaceae που φύονται-καλλιεργούνται στην Ελλάδα για την ποιοτική και ποσοτική μελέτη των εξεταζόμενων ουσιών.....	73
5. Διοξίνες και τοξικότητα τους.....	77
5.1 Υποδοχέας των αρυλοϋδρογονανθράκων (AhR).....	79

B. Πειραματικό μέρος

B1. Γενικό Πειραματικό Μέρος

1. Όργανα και τεχνικές εκχύλισης, διαχωρισμού, απομόνωσης και ταυτοποίησης των δευτερογενών μεταβολιτών.....	83
1.1 Χρωματογραφικές τεχνικές.....	83
1.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC).....	83
1.2.2 Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης.....	83
1.3 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των φυτικών εκχυλισμάτων και ταυτοποίηση των απομονωμένων ουσιών.....	84
1.4 Υλικά-Συσκευές.....	85
2. Συλλογή, αποξήρανση και αποθήκευση των βοτάνων.....	85

B2. Ειδικό Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο I: Απομονώσεις των προς μελέτη δευτερογενών μεταβολιτών από τα φύλλα των φυτών *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia microphylla* Kunth και *Salvia fruticosa* Mill.

1. Διαδικασία εκχύλισης.....	88
2. Επεξεργασία φύλλων <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	88
2.1 Παρασκευή ξηρού εκχυλίσματος [ROS-7d] και διηθήματος [ΔΒ7] με εμβροχή <u>7 ημερών</u>	88
2.1.1 Επεξεργασία του διηθήματος [ΔΒ7].....	91
2.1.2 Επεξεργασία του ξηρού εκχυλίσματος [ROS- 7d].....	93
2.2 Παρασκευή ξηρού εκχυλίσματος [ROS-12h] και διηθήματος [ΔΒ12] με εμβροχή <u>12 ωρών</u>	100
2.2.1 Επεξεργασία του διηθήματος [ΔΒ12].....	100
2.2.2 Επεξεργασία του ξηρού εκχυλίσματος [ROS-12h].....	101
2.3 Παρασκευή ξηρού εκχυλίσματος [ROS-12h.7].....	106
2.3.1 Επεξεργασία του ξηρού εκχυλίσματος [ROS-12h.7].....	106
2.4 Παρασκευή ξηρού εκχυλίσματος [ROS-2m] με εμβροχή <u>2 μηνών</u>	109
2.4.1 Επεξεργασία του ξηρού εκχυλίσματος [ROS-2m].....	110
2.5 Παρασκευή ξηρού εκχυλίσματος [ROS-1y] με εμβροχή <u>1 έτους</u>	116
3. Επεξεργασία της <i>Salvia microphylla</i> Kunth.....	116
4. Επεξεργασία της <i>Salvia fruticosa</i> Mill.	121
5. Φασματοσκοπική μελέτη των απομονωθεισών μεταβολιτών.....	123
5.1 Φασματοσκοπική μελέτη καρνοσικού οξέος (CA).....	123
5.2 Φασματοσκοπική μελέτη καρνοσόλης (CS).....	125
5.3 Φασματοσκοπική μελέτη του 12-O-μεθυλοκαρνοσικού οξέος (12MCA).....	129
5.4 Φασματοσκοπική μελέτη 7-O-μεθυλ- <i>epi</i> -ροσμανόλης (7MER).....	133
5.5 Φασματοσκοπική μελέτη της ροσμανόλης (RO).....	136
5.6 Φασματοσκοπική μελέτη του ροσμαρινικού οξέος (RA).....	140

5.7 Φασματοσκοπική μελέτη της 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνης (DMA)	142
5.8 Φασματοσκοπική μελέτη του μπετουλινικού οξέος (BA)	144
5.9 Φασματοσκοπική μελέτη του ολεανολικού οξέος (OA)	147
5.10 Φασματοσκοπική μελέτη του ουρσολικού οξέος (UA)	150
6. Πρότυπες καμπύλες αναφοράς.....	152
6.1 Πρότυπη καμπύλη καρνοσικού οξέος	153
6.2 Πρότυπη καμπύλη καρνοσόλης	154
6.3 Πρότυπη καμπύλη 12-O-μεθυλοκαρνοσικού οξέος.....	154
6.4 Πρότυπη καμπύλη της 7-O-μεθυλ- <i>epi</i> -ροσμανόλης.....	154
6.5 Πρότυπη καμπύλη ροσμανόλης.....	155
6.6 Πρότυπη καμπύλη μπετουλινικού οξέος.....	155
6.7 Πρότυπη καμπύλη ροσμαρινικού οξέος.....	155
6.8 Πρότυπη καμπύλη 4',7-O-διμεθυλ-απιγενίνης	156
7. Όρια ανίχνευσης (LOD, Limit Of Detection) και όρια ποσοτικοποίησης (LOQ, Limit Of Quantification).....	156
8. Συζήτηση-συμπεράσματα.....	157

Κεφάλαιο II: Διερεύνηση του *Rosmarinus officinalis* L. και επλεγμένων μεταβολιτών του ως προς την συμπεριφορά τους έναντι του υποδοχέα των αρυλοϋδρογονανθράκων AhR (Aryl hydrocarbon Receptor)

1. Εισαγωγή.....	169
2. Εργαστηριακό μέρος.....	170
2.1 Χημικά.....	171
2.2 Δείγματα προς εξέταση.....	172
2.2.1 Εκχυλίσματα <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	172
2.2.2 Απομονωμένοι μεταβολίτες από τα φύλλα του <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	173
2.3 Πειραματόζωα-παρασκευή κυττοσολίου.....	173
2.4 Hydroxyapatite AhR Ligand Binding Assay.....	173
2.5 Gel retardation assay, GRA.....	174
2.6 AhR-Responsive Luciferase Reporter Gene Analysis.....	174
2.7 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction)	175
3. Αποτελέσματα.....	175
3.1 Τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα <i>Rosmarinus officinalis</i> L. αναστέλλουν την έκφραση του γονιδίου που επάγεται από την αγωνιστική δράση της TCDD στον AhR.	175
3.2 Τα εκχυλίσματα <i>Rosmarinus officinalis</i> L. αναστέλλουν τον επαγόμενο από την TCDD μετασχηματισμό του AhR και την ακόλουθη σύνδεση του στο DNA.....	178
3.3 Τα εκχυλίσματα <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ανταγωνίζονται τη [³ H]TCDD για την ειδική δέσμευση στο AhR.....	180
3.4 Το εκχύλισμα <i>Rosmarinus officinalis</i> L. R4 ανταγωνίζεται	

την επαγωγή του CYP1A1 από τη TCDD και από άλλους αγωνιστές του AhR.....	182
3.5 Διερεύνηση της δράσης των CA, CS, 7MER, BA και DMA έναντι του AhR.....	185
4. Συζήτηση-συμπεράσματα.....	189
4.1 <i>Rosmarinus officinalis</i> L., AhR και φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος.....	189
4.2 <i>Rosmarinus officinalis</i> L., AhR και καρκίνος του δέρματος.....	193
4.2.1 Ο ρόλος του AhR στην καρκινογένεση και στη διατήρηση της νεοπλασίας του δέρματος από περιβαλλοντικούς παράγοντες.....	192
4.2.2 Αναστολή της δράσης του AhR από το <i>Rosmarinus officinalis</i> L.: δυνητικά οφέλη στον καρκίνο του δέρματος.....	193
4.2.3 Εκχύλισμα φύλλων <i>Rosmarinus officinalis</i> L.: δυνητική δράση επί του άξονα IDO1-Kyn-AhR (Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase-Kynurenine-Aryl hydrocarbon receptor)	195
4.2.4 Εκχύλισμα φύλλων <i>Rosmarinus officinalis</i> L.: δυνητική επικουρική θεραπεία στο μελάνωμα σε περιπτώσεις χαμηλής αποτελεσματικότητας της ανοσοθεραπείας.....	197
4.2.5 Δυνητική εφαρμογή σε άλλες μορφές καρκίνου.....	197
4.3 <i>Rosmarinus officinalis</i> L. και διοξίνες.....	199
4.4 Το <i>Rosmarinus officinalis</i> L. και οι ενώσεις του CA, CS, BA ως αναστολείς της TCDD έναντι του AhR και ως ενεργοποιητές του Nrf-2.....	199
4.5 Ο ρόλος των υποκαταστατών σε συγκεκριμένες ενώσεις στην αλλαγή της συμπεριφοράς τους έναντι του AhR	200
4.6 Συμπεράσματα.....	200
4.7 Σύνοψη κεφαλαίου 2.....	202

Κεφάλαιο III: Ποιοτική και ποσοτική μελέτη των μεταβολιτών ροσμανόλη, 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη, καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ, 4',7-Ο-διμεθυλαπιγενίνη και μπετουλινικό οξύ σε 61 είδη της οικογένειας των Χειλανθών (Labiatae) που φύονται-καλλιεργούνται στην Ελλάδα

1. Εισαγωγή.....	204
2. Διαδικασία εκχύλισης.....	204
3. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων.....	204
4. Αποτελέσματα.....	206
4.1 Φυτά δεν που περιείχαν καμία από τις εξεταζόμενες ουσίες.....	206
4.2 Φυτά που περιείχαν έστω και μια από τις εξεταζόμενες ουσίες.....	209
5. 1D-πρωτονιακά φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR, Nuclear Magnetic Resonance spectra, ¹ H-NMR) ως χημικό αποτύπωμα των φυτικών εκχυλισμάτων.....	217
6. Συζήτηση-συμπεράσματα.....	227

Κεφάλαιο IV: Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση στα εγχύματα, αφεψημάτα, φαρμακευτικά βάμματα, φαρμακευτικούς οίνους και ελαιόλυτα των *R. officinalis* L. *Salvia officinalis* L. και *Salvia fruticosa* Mill.: διερεύνηση της αποδοτικότερης μεθόδου

1. Εισαγωγή.....	234
2. Επιλογή φυτών της οικογένειας Lamiaceae που φύονται στην Ελλάδα για την ποιοτική και ποσοτική μελέτη των φαρμακευτικών τους μορφών.....	235
3. Υδατικά εκχυλίσματα.....	235
3.1. Ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων ¹ H-qNMR.....	235
3.2 Εγχύματα.....	236
3.3 Αφεψημάτα.....	236
3.4 Εκχύλιση με τυρβώδη ροή, στροβιλισμό (Turbulent-extraction).....	236
3.5 Αποτελέσματα υδατικών εκχυλισμάτων.....	236
3.6 Σύγκριση μεταξύ της εκχύλισης τυρβώδους ροής-εγχυμάτων-αφεψημάτων.....	246
4. Φαρμακευτικά βάμματα.....	251
4.1 Διαδικασία παρασκευής και ανάλυσης των φαρμακευτικών βαμμάτων.....	252
4.2 Αποτελέσματα πειραμάτων φαρμακευτικών βαμμάτων.....	253
5. Οινόλυτα.....	255
5.1 Διαδικασία παρασκευής οινόλυτου.....	256
5.2 Μέθοδος ανάλυσης οινόλυτου και αποτελέσματα.....	257
6. Ελαιόλυτα.....	258
6.1 Διαδικασία παρασκευής ελαιολύτων.....	259
6.1.1 Εμβροχή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.....	259
6.1.2 Εμβροχή εν θερμώ (“Digestion, χώνευση”).....	259
6.1.3 Διάλυση εκχυλισμάτων στο έλαιο.....	260
6.2 Μέθοδος ανάλυσης των ελαιολύτων.....	260
6.2.1 Ελαιόλυτα με τη μέθοδο της εμβροχής.....	260
6.2.2 Διάλυση εκχυλισμάτων στο έλαιο.....	263
6.3 Σταθερότητα των εξεταζόμενων ουσιών στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο.....	265
7. Μελέτη της επίδρασης του χρόνου αποθήκευσης της δρόγης (φύλλα της <i>Salvia fruticosa</i> Mill.) στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των διτερπενίων αβιετανίου.....	267
8. Πτητικές ενώσεις: κάμφορα και θουγιόνη.....	269
9. Συζήτηση-συμπεράσματα.....	270

Παραρτήματα

Παράρτημα θεωρητικού μέρους

1. Φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος και AhR.....	275
2. Καρκίνος του δέρματος και AhR.....	279
2.1 Καρκίνος του δέρματος.....	279
2.2 Ο ρόλος του AhR στον καρκίνο του δέρματος.....	280

2.2.1 AhR και καρκινογένεση στο δέρμα.....	280
2.2.1.1 AhR και καρκίνος του δέρματος από την ηλιακή ακτινοβολία.....	280
2.2.1.2 AhR και καρκίνος του δέρματος από μεταβολίτες του γένους <i>Malassezia</i>	281
2.2.1.3 AhR και καρκίνος του δέρματος από ατμοσφαιρικούς ρύπους.....	282
2.2.2 AhR και διατήρηση του καρκίνου του δέρματος.....	282
2.2.2.1 AhR και PD-1, PD-L1.....	282
2.2.2.2 AhR και iBRAFI.....	286

Παράρτημα Πειραματικού μέρους

Παράρτημα κεφαλαίου 2

1. Δυνητική εφαρμογή του <i>Rosmarinus officinalis</i> L. και σε άλλες μορφές καρκίνου.....	287
2. Εκχύλισμα φύλλων <i>Rosmarinus officinalis</i> L.: δυνητική δράση επί των PAHs.....	287
3. Το <i>Rosmarinus officinalis</i> L. και οι ενώσεις του CA, CS, BA ως αναστολείς της TCDD έναντι του AhR και ως ενεργοποιητές του Nrf2: δυνητικά οφέλη στις δερματικές παθήσεις.....	289

Παράρτημα κεφαλαίου 4

1. Ποσοτική σύγκριση μεταξύ των φαρμακευτικών παρασκευασμάτων (εκχυλίσματα με τυρβώδη ροή-εγχύματα-αφεψήματα-φαρμακευτικά βάμματα).....	292
---	-----

Περίληψη.....	294
Summary.....	297
Βιβλιογραφία.....	300
Συνομογραφίες.....	331
Κατάλογος Εικόνων.....	333
Κατάλογος Πινάκων.....	337
Κατάλογος γραφημάτων.....	341
Δημοσιεύσεις.....	343
Επίλογος.....	344

Σ ΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΟΨΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Το καλοκαίρι του 2006, ήρθα σε επαφή με τον έγκριτο ιατρό Δερματολόγο κ. Σεραφείμ Προδρομίδα, λόγω εμφάνισης δερματικού προβλήματος σε πρόσωπο και στέρνο. Ο ιατρός διέγνωσε σημηγατοροϊκή δερματίτιδα (SD) και συνταγογράφησε την ενδεικνυόμενη θεραπεία: φλουκοναζόλη (150 mg, εφάπαξ, *per os*) και φλουτριμαζόλη 1% (σαμπουάν για πλύση στο τριχωτό της κεφαλής και το πρόσωπο) λόγω της συμβολής του μύκητα του γένους *Malassezia* στην SD, και κρέμα μεθύλπρεδνιζολόνης 0,1% για εφαρμογή στο πρόσωπο άπαξ το βράδυ. Μετά από 7 ημέρες τα κλινικά σημεία και συμπτώματα είχαν εξαφανιστεί, ωστόσο ύστερα από περίπου 10 ημέρες παρατηρήθηκε επανεμφάνιση της νόσου. Ακολούθησε επανέναρξη της θεραπείας με θετικό αποτέλεσμα, ωστόσο μετά υπήρξε πάλι υποτροπή με τη δημιουργία φαύλου κύκλου: ύφεση-υποτροπή. Τότε αποφάσισα να φτιάξω στο εργαστήριο του φαρμακείου μου ένα φυσικό προϊόν με αρχικό στόχο να αποφύγω την συνεχή τοπική εφαρμογή του κορτικοστεροειδούς. Μετά από μελέτη και πειράματα κατέληξα σε μια σύνθεση κρέμας με δραστικό συστατικό εκχύλισμα *Rosmarinus officinalis* L., το οποίο έδειξε πολύ καλά αποτελέσματα, δηλαδή ο απαιτούμενος χρόνος για την κλινική κάθαρση ήταν μικρότερος και η διάρκεια ύφεσης μεγαλύτερη συγκριτικά με τη συνήθη φαρμακοθεραπεία και χωρίς την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών. Όλα αυτά αξιολογήθηκαν από τον δερματολόγο και εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκε η κρέμα αυτή για να βοηθηθούν και άλλοι ασθενείς με SD.

Εν το μεταξύ οι κύριοι Μαγιάτης και Γαϊτάνης, καθηγητές του ΕΚΠΑ και του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων αντίστοιχα, δημοσίευσαν στις έρευνες τους (Gaitanis et al. 2008, Magiatis et al. 2013) ότι:

- ο στους ασθενείς με SD η 6-φορμυλινδολο[3,2b]καρβαζόλη (FICZ), η ιντιρουμπίνη (IND) και η πιτυριαζεπίνη (PZ) παράγονται από τη *Malassezia furfur* (προηγούμενη ονομασία *Pityrosporum ovale*) σε υψηλότερες ποσότητες στις πάσχουσες δερματικές περιοχές από ό,τι στο υγιές δέρμα
- ο η FICZ, η IND και η PZ συμπεριφέρονται ως ισχυροί αγωνιστές του AhR (Aryl hydrocarbon receptor, υποδοχέας των αρυλοϋδρογονανθράκων ή dioxin receptor, υποδοχέας διοξινών).
- ο η βαρύτητα της νόσου είναι ευθέως ανάλογη της με την ποσότητα των ουσιών-αγωνιστών του AhR που υπολογίστηκαν στις δερματικές φολίδες των ασθενών.

Συνεπώς οι προαναφερόμενοι ερευνητές θεώρησαν ότι οι ουσίες αυτές και ο AhR εμπλέκονται στην παθογένεια της SD.

Τα γεγονότα αυτά κάνουν κατανοητή την συνεργασία με το Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων όπου και αποφασίσθηκε, να γίνουν:

- ο ποσοτικές αναλύσεις επιλεγμένων φυτικών εκχυλισμάτων *Rosmarinus officinalis* L.
- ο απομονώσεις με καινοτόμες διαδικασίες των κύριων δευτερογενών μεταβολιτών με έμφαση στα διτερπένια αβιετανίου τα οποία βάσει

βιβλιογραφίας θεωρούνται φαρμακολογικά οι πιο σημαντικές ουσίες του *Rosmarinus officinalis* L.

- ο έλεγχος ολικών εκχυλισμάτων και απομονωμένων μεταβολιτών ως προς την συμπεριφορά τους έναντι του AhR επί παρουσίας της TCDD ή των παραγόμενων ουσιών από την *Malassezia* σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος, σε κερατινοκύτταρα και σε ηπατικά κυττοσόλια ινδικού χοιριδίου σε συνεργασία με το UC DAVIS, USA.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- ο τα εκχυλίσματα *Rosmarinus officinalis* L. και οι απομονωμένοι μεταβολίτες ήταν σε θέση να ανταγωνίζονται τη δράση της TCDD στον AhR
- ο το εκχύλισμα *Rosmarinus officinalis* L. ανταγωνίζεται τη δράση των μεταβολιτών της *Malassezia* στο επίπεδο του AhR

ενισχύοντας συνεπώς την θεωρία των καθηγητών Μαγιάτη και Γαϊτάνη.

Το ότι βρέθηκαν παράγοντες που μπορούν να ανταγωνιστούν τη δράση των διοξινών είναι κάτι πολύ σημαντικό γιατί εκτός από τη SD, μπορεί να βρει εφαρμογή στην πρόληψη της τοξικότητας των διοξινών ή στην αντιμετώπιση εγκατεστημένης βλάβης όπως π.χ. συμβαίνει στην περίπτωση της χλωρακμής ή να μελετηθεί η δυναμική εφαρμογή τους έναντι του καρκίνου του δέρματος.

Εξαιτίας των πρώιμων θετικών αποτελεσμάτων αποφασίστηκε (σε συνεργασία με τα ερευνητικά κέντρα ΕΙΕ και ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ) να γίνει:

- ο φυτοχημική μελέτη σε 61 φυτά που φύονται-καλλιεργούνται στην Ελλάδα της οικογένειας των Χειλανθών ((Lamiaceae-Labiatae) σε σχέση με τη ποιοτική και ποσοτική τους σύσταση σε δραστικούς μεταβολίτες. Συμπερασματικά διαπιστώθηκε ότι οι ενδιαφέροντες μεταβολίτες βρίσκονται σε ικανοποιητικές ποσότητες μόνο σε λίγα φυτά.

Θέλοντας να δώσουμε μια πιο πρακτική διάσταση ακολουθήθηκε:

- ο σχεδιασμός σειράς πειραμάτων με διαφορετικές μεθόδους παρασκευής: εγχύματα, αφεψήματα, εκχυλίσματα με τυρβώδη ροή, ελαιόλυτα, βάμματα και οινόλυτα που αφορούσαν τα φυτά με την μεγαλύτερη περιεκτικότητα στους εν λόγω μεταβολίτες αλλά και την πιο σημαντική διάδοση τους παγκοσμίως, με απώτερο σκοπό να προσδιοριστεί η βέλτιστη και αποδοτικότερη μέθοδος παρασκευής (π.χ. είναι αποδοτικότερο να χρησιμοποιείται αφέψημα ή έγχυμα, για πόσο χρόνο πρέπει να μείνει σε επαφή η δρόγη με τον διαλύτη, ή ποια είναι η βέλτιστη αναλογία D/S, κ.α) δίνοντας με αυτό τον τρόπο απαντήσεις σε βασικά και χρόνια ερωτήματα που αφορούν τα φυτά που ερευνήθηκαν: *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., και *Salvia fruticosa* Mill.

Η διάρθρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής παρουσιάζεται στον πίνακα

1.

Πίνακας 1

Διάρθρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1 Απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών καρνοσικό οξύ (CA), καρνοσόλη (CS), 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ (12MCA), 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη (7MER), ροσμανόλη (RO), μπετουλινικό οξύ (BA), 4',7-διμεθυλαπιγενίνης (DMA) και ροσμαρινικό οξύ (RA) από επιλεγμένα φυτά της οικογένειας Lamiaceae-Labiatae (*R. officinalis* L., *S. microphylla* Kunth και *S. fruticosa* Mill.) με καινοτόμες διαδικασίες.



2 Διερεύνηση της δραστηριότητας εκχυλισμάτων *R. officinalis* L. και των βασικών μεταβολιτών έναντι του υποδοχέα AhR *in vitro* σε κύτταρα ινδικού χοιριδίου και σε ανθρώπινα κύτταρα (κερατινοκύτταρα και κύτταρα ηπατώματος):

- συγκεκριμένα εκχυλίσματα *R. officinalis* L. ανταγωνίζονται τη δράση των TCDD, FICZ, IND, PZ στον AhR
- οι ουσίες CA, CS, BA ανταγωνίζονται δράση της TCDD στον AhR

Δυνητικά, τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να βρουν εφαρμογή:

- σε φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος
- στην πρόληψη και αντιμετώπιση της τοξικότητας των διοξινών
- στον καρκίνο του δέρματος



3 Ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των μεταβολιτών ενδιαφέροντος σε 61 είδη της οικογένειας Lamiaceae/Labiatae του Ελλαδικού χώρου με φασματοσκοπία qNMR



4 Παρασκευή, ποσοτική-ποιοτική ανάλυση διάφορων εκχυλιστικών μεθόδων με πρακτικό ενδιαφέρον όπως εγχυμάτων, αφεψημάτων, εκχυλισμάτων με τυρβώδη ροή, φαρμακευτικών βαμμάτων, οινολύτων και ελαιολύτων των φυτών *R. officinalis* L., *S. officinalis* L. και *S. fruticosa* Mill., ως προς τους μεταβολίτες ενδιαφέροντος. Ανεύρεση και καταγραφή των βέλτιστων μεθόδων για την παρασκευή/παραλαβή των προαναφερόμενων εκχυλισμάτων.

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Δρογοβοτανική Χειλανθών

Η οικογένεια των Χειλανθών

Συστηματική ταξινόμηση της οικογένειας των Χειλανθών

Βασίλειο (Regnum):	Plantae
Υποβασίλειο (Subregnum):	Tracheobionta
Υπεράθροισμα (Superdivisio):	Spermatophyta
Άθροισμα (Divisio):	Magnoliophyta
Υποάθροισμα (Subdivisio):	Magnoliophytina
Κλάση (Classis):	Magnoliopsida
Υποκλάση (Subclassis):	Asteridae
Υπερτάξη (Superordo):	Lamianae
Τάξη (Ordo):	Lamiales
Οικογένεια (Familia):	Lamiaceae (Labiatae)

Η οικογένεια των Χειλανθών ή Χειλοστεφάνων ή Λαμπατών ή Λαμιϊδών (Labiatae/Lamiaceae) περιλαμβάνει τον μεγαλύτερο αριθμό αρωματικών φυτών στην Ελλάδα. Χαρακτηρίζεται από πολυάριθμα είδη των ξηρών και θερμών κλιματικών περιοχών, με πολλά χαρακτηριστικά γνωρίσματα.

Η οικογένεια περιλαμβάνει μονοετείς ή πολυετείς πόες, θαμνώδεις ή ημιθαμνώδεις, φρύγανα, λιγότερο συχνά θάμνους και σπανιότερα δέντρα ή αναρριχόμενα. Τα φυτά αυτά έχουν αδενώδεις τρίχες στα φύλλα και στους βλαστούς. Οι τρίχες αυτές εκκρίνουν αιθέρια έλαια. Οι βλαστοί των φυτών είναι ποώδεις, προς τη βάση τους αποξυλωμένοι, τετράγωνοι (εκτός από τα φυτά που έρπουν) και φέρουν φύλλα αντίθετα, σταυρωτά ή κατά σπονδύλους, συνήθως απλά χωρίς παράφυλλα. Τα άνθη φέρονται μεμονωμένα ή πολλά μαζί στις μασχάλες των φύλλων (συνήθως κατά διχασιά) ή επάκρια (κατά βότρες ή στάχεις). Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, σπάνια δίκλινα, ζυγόμορφα, σπάνια ακτινόμορφα, με βράκτια ή χωρίς βράκτια. Ο κάλυκας είναι κωδωνοειδής ή σωληνοειδής και αποτελείται από 5, σπάνια 4-12 οδόντες ή είναι δίχειλος. Η στεφάνη είναι δίχειλη (σπάνια μονόχειλη ή ακτινόμορφη), σωληνοειδής, συμπέταλη, αποτελούμενη από 5 λοβούς. Οι στήμονες είναι 2-4 βραχείς περιβάλλονται από το σωλήνα της στεφάνης και είναι διδύναμοι, δηλ. σχηματίζουν δυο ανισοϋπή ζεύγη. Οι ανώτεροι έχουν 2 γυρεοσάκκους και οι κατώτεροι ατροφικούς ή δύσμορφους ανθήρες. Επίσης, συχνά παρατηρούνται στημονώδη στα άνθη. Η ωθήκη είναι επιφυής, σύγκαρπη, τετράλοβη, αποτελούμενη από 2 καρπόφυλλα τα οποία σχηματίζουν 4 χώρους. Σε κάθε χώρο περιέχεται μια ανάτροπη σπερματοβλάστη. Ο στύλος είναι απλός και καταλήγει σε 1 δισχιδές στίγμα (Harley 2004, Καββαδάς 1936, Kintzios 2000, Clebsch et al. 2003)

1.1 Το γένος *Salvia*

Συστηματική ταξινόμηση του γένους *Salvia*

Οικογένεια: Labiatae (Lamiaceae)

Υποοικογένεια: Nepetoideae

Φυλή: Mentheae

Το γένος *Salvia* είναι το μεγαλύτερο της οικογένειας Lamiaceae, με σχεδόν 1000 είδη θάμνων, ποωδών, πολυετών και ετήσιων. Είναι ένα από τα διάφορα γένη που συνήθως αναφέρονται ως φασκόμηλο και περιλαμβάνει το ευρέως παραγόμενο βότανο, τη *Salvia officinalis* L. (κοινό φασκόμηλο, ή απλώς το "φασκόμηλο"). Το γένος διανέμεται σε όλο τον Παλαιό Κόσμο και την Αμερική, με τρεις περιοχές διαφορετικότητας:

- 1) την Κεντρική και Νότια Αμερική (περίπου 500 είδη).
- 2) Την κεντρική Ασία και τη Μεσόγειο (250 είδη)
- 3) και την Ανατολική Ασία (90 είδη) (Harley 2004, Clebsch et al. 2003, Kintzios 2000)

Τα είδη *Salvia* περιλαμβάνουν ετήσιες, διετείς ή πολυετείς πόες, φρυγανώδεις ή θαμνώδεις, με φύλλα αντίθετα, ακέραια, οδοντωτά, πριονωτά, έλλοβα ή πτεροσχιδή, συνήθως μεγάλα, έμμοια. Τα στελέχη είναι συνήθως γωνιακά όπως τα άλλα μέλη της οικογένειας των Lamiaceae. Τα άνθη είναι κιτρινωπά, κόκκινα, κυανά, ιώδη, λευκά, συνήθως μεγάλα, κατά σπονδύλους σχηματίζοντας μακρούς επακρίους ή μασχαλιαίους σταχυόμορφους βότρεις ή φόβας. Ο κάλυκας είναι σωληνοειδής ή κωδωνοειδής, δίχειλος, με άνω χείλος τριδοντωτό ή ακέραιο και το κάτω δισχιδές. Η στεφάνη είναι δίχειλος, με το χείλος κυρτό, θλωτό, πεπιεσμένο, ακέραιο ή ακρόκοιλο και το κάτω τρίλοβο, με το μεσαίο λοβό μεγαλύτερο, ακέραιο ή ακρόκοιλο. Στήμονες 2 με νήματα βραχέα και ανίσως διχαλωτά. Τα κάρυα είναι ωσειδή, τριγωνικά, λεία. Τα είδη *Salvia* καλλιεργούνται εύκολα. Πολλαπλασιάζονται με σπορά και τα πολυετή με μοσχεύματα (Καββαδάς 1936, Kintzios 2000, Clebsch et al. 2003, Harley 2004).

Πολλά μέλη του γένους *Salvia* έχουν τριχώματα (τρίχες) που αναπτύσσονται στα φύλλα, τους μίσχους και τα άνθη. Το τριχώμα αυτό σε ορισμένα είδη, συμβάλλει στη μείωση της απώλειας νερού, ενώ σε άλλα είδη οι τρίχες είναι αδενικές και εκκρίνουν πιτητικά έλαια που συνήθως δίνουν ένα ξεχωριστό άρωμα στο φυτό. Όταν οι τρίχες τρίβονται, οι ελαιώδεις κυψέλες θραύονται, απελευθερώνοντας το αιθέριο έλαιο που περιέχουν. Αυτό συχνά έχει ως αποτέλεσμα το φυτό να είναι ελκυστικό για τη βροσκή ζώων καθώς και σε μερικά έντομα προάγοντας τη διαδικασία της επικονίασης (Sutton 1999).

Η περιγραφή μεμονωμένων ειδών του γένους *Salvia* έχει υποστεί συχνά βοτανική αναθεώρηση. Πολλά είδη είναι παρόμοια μεταξύ τους και πολλά είδη έχουν ποικιλίες στις οποίες έχουν δοθεί διαφορετικά ονόματα. Συνολικά έχουν καταγραφεί περί τα 2.000 ονόματα ειδών και υποειδών. Με την πάροδο του χρόνου, ο αριθμός μειώθηκε σε λιγότερα από 1000. Μια σύγχρονη και περιεκτική μελέτη του είδους *Salvia* έγινε από τον Gabriel Alziar, στον κατάλογο *Synonymique des Salvia du Monde* (1989) (παγκόσμιος κατάλογος *Salvia Synonyms*), που διαπίστωσε ότι ο αριθμός των ξεχωριστών ειδών και υποειδών θα μπορούσε να μειωθεί σε λιγότερο από 700 (Clebsch et al. 2003, Alziar 1989).

Στην παρούσα διατριβή το φυτό *Rosmarinus officinalis* L. συγκαταλέχθηκε στο γένος *Salvia* βάσει των τελευταίων επιστημονικών εξελίξεων, δεδομένου ότι το προαναφερόμενο φυτό άλλαξε επιστημονική ονομασία σε *Salvia rosmarinus* Spreng. και ταξινομείται πλέον στο γένος *Salvia*.

1.1.1 *Salvia fruticosa* Miller (syn. *Salvia triloba* L.) (Ελληνικό φασκόμηλο, Greek Sage)

1.1.1.1 Δρογοβοτανική

Η *Salvia fruticosa* Mill. (συνώνυμο της *Salvia triloba* L., *S. libanotica* Boiss and Gaill., *S. cypria* Unger and Kotschy, *S. lobryana* Aznav) είναι ένας αειθαλής θάμνος με πολύ πυκνό ριζικό σύστημα, ημιξυλώδεις βλαστούς με λευκό χνούδι, με έντονη διακλάδωση και ύψος έως 1 μέτρο. Τα φύλλα είναι φαιοπράσινα, χνουδωτά, λογχοειδή ή προμήκη, με μήκος περίπου 8 -50 mm και πλάτος 4 mm έως 20 mm, ελαφρά ρυτιδώδη, αβαθώς οδοντωτά. Τα φύλλα στη βάση τους φέρουν δύο λοβούς, ένα από κάθε πλευρά ώστε το φύλλο να φαίνεται τρίλοβο. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, ρόδινα, ιώδη, σπάνια λευκά, 2-6 ανά σπόνδυλο, τα οποία σχηματίζουν ταξιανθία μακρού αραιού βότρου. Αυτοφύεται σε υψόμετρο έως 1000 m , σε χέρσα ή πετρώδη ασβεστολιθικά εδάφη και σε ξέφωτα αραιών δασών. Συλλέγονται τα φύλλα νωρίς το πρωί κατά την ανθοφορία του φυτού και αποξηραίνονται σε δροσερό μέρος ώστε να διατηρήσει το άρωμα του. Ανθίζει από Μάιο-Ιούνιο (Καββαδάς 1936, Clebsch et al. 2003).

Στον Ελλαδικό χώρο συναντούμε την *Salvia fruticosa* Mill. με διάφορα ονόματα, όπως αλιφασκιά, αλισφακιά, σφακιά, φασκομηλιά (Καββαδάς 1936).



Εικόνα 1

Λεπτομέρεια ταξιανθίας και φύλλων της *Salvia fruticosa* Mill. (καλλιεργημένη, Αθήνα).

Η *Salvia fruticosa* Mill. είναι ένα ενδημικό είδος της λεκάνης της Ανατολικής Μεσογείου, από τη Σικελία και τη Νότια Ιταλία, την Κυρηναϊκή, το νότιο τμήμα της Βαλκανικής χερσονήσου και την Ελλάδα μέχρι τη Δυτική Συρία. Επιπλέον, είναι αυτοφύες στην περιοχή της Δυτικής Μεσογείου, ειδικά στην Ισπανία και την Πορτογαλία, όπου πιθανότατα εισήχθη από αρχαίους Έλληνες ή Φοίνικες ναυτικούς.

έχει χρησιμοποιηθεί στις παραδοσιακές ιατρικές πρακτικές (Rivera et al. 1994, Kintzios 2000). Η *Salvia fruticosa* Mill. ονομάζεται και Ελληνικό φασκόμηλο (Greek sage). Λόγω της μεγάλης ποικιλίας στο σχήμα του φύλλου της *Salvia fruticosa* Mill., υπήρξε μεγάλη σύγχυση όσον αφορά την ταξινόμηση της, με αποτέλεσμα οι παραλλαγές του φύλλου της να οδηγήσουν λανθασμένα στην αναγνώριση και ονομασία ξεχωριστών ειδών, όπως η *S. libanotica*, η *S. triloba*, η *S. lobryana* και η *S. cypria*, τα οποία θεωρούνται πλέον *Salvia fruticosa* Mill. (Karousou et al. 1999).

Η ποικιλία των φύλλων εξαρτάται από τη γεωγραφική περιοχή. Για παράδειγμα, ενώ τα φυτά που αναπτύσσονται στη δυτική Κρήτη έχουν ολόκληρα φύλλα με επίπεδη λεπίδα και περιθώρια και βαθύ πράσινο χρώμα στην επιφάνεια, τα φυτά που αναπτύσσονται στην ανατολική πλευρά του νησιού έχουν πολύ μικρότερα φύλλα, έντονα τρίλοβα, κιτρινοπράσινα με κυματιστά περιθώρια. Η διακύμανση συνεχίζεται σε διάφορα μέρη της Ελλάδας (Kintzios 2000).



Εικόνα 2

Αποικία καλλιεργημένης *S. fruticosa* Mill. (φωτογραφία από το βοτανικό κήπο Διομήδους ΕΚΠΑ)

Στο φυσικό της περιβάλλον αναπτύσσει συχνά χνουδωτές κηκίδες, διαμέτρου περίπου 1 ίντσας που ονομάζονται «μήλα». Αυτά τα «μήλα» ξεφλουδίζονται και τρώγονται όταν είναι μαλακά και περιγράφονται ως αρωματικά, ζουμερά και γευστικά (Clebsch et al. 2003). Αρχικά ο σχηματισμός των κηκίδων θεωρήθηκε ότι περιοριζόταν στην *Salvia pomifera*, άποψη που οδήγησε σε εσφαλμένη αναγνώριση της *Salvia fruticosa* Mill. που έφεραν κηκίδες ως *Salvia pomifera* (Tsekos et al. 1998). Το 2001 αποκαλύφθηκε ότι οι κηκίδες της *Salvia fruticosa* Mill. προκλήθηκαν από ένα, προηγουμένως ανεξερευνήτο, είδος σφήκας (Dmitrievna et al. 2003). Αυτού του είδους οι κηκίδες δεν έχουν παρατηρηθεί στην περιοχή της Ισπανίας (Rivera et al. 1994).

1.1.1.2 Δρογοϊστορία

Πιθανών η *Salvia fruticosa* Mill. να χρησιμοποιούνταν τουλάχιστον από το 1400 π.Χ., δεδομένου ότι υπήρχε ζωγραφισμένη σε τοιχογραφία στο παλάτι της Κνωσσού στην Κρήτη (Clebsch et al. 2003, Rivera et al. 1994). Κεραμικά του 400 π.Χ., πιθανότατα υπό την Ελληνική επιρροή, που βρέθηκαν σε περιοχές της Ιβηρικής χερσονήσου (στο Tossal de Manises και στην Alcuia) απεικονίζουν κλαδιά με τρίλοβα, αντίθετα φύλλα, στοιχεία που συνηγορούν στην αναγνώριση της *S. fruticosa* Mill. (Rivera et al. 1994). Οι αρχαίοι Φοίνικες και Έλληνες, πιθανώς εισήγαγαν το φυτό για καλλιέργεια στην Ιβηρική χερσόνησο (Kintzios 2000).

Ο Θεόφραστος περιέγραψε δύο είδη σάλβιας-*Salvia*, το σφακό και τον ελελίσφακο, το μεν πρώτο άγριο είδος το δε δεύτερο καλλιεργήσιμο. Ο Desfontaines (1830) θεωρεί ότι ο ελελίσφακος και ο σφάκος του Θεόφραστου είναι η *S. fruticosa* Mill., που μπορεί να υπάρχει στην άγρια ή την καλλιεργημένη μορφή (Diaz 1988). Η ερμηνεία αυτή είναι πιο εύλογη δεδομένου ότι το σύνηθες άγριο είδος στην Ελλάδα είναι η *S. fruticosa* Mill. ενώ η *S. officinalis* L. είναι εξαιρετικά σπάνια στο φυσικό περιβάλλον, ιδιαίτερα νότια της Αλβανίας και της πρώην Γιουγκοσλαβίας (Polunin 1980). Ο ελελίσφακος του Διοσκουρίδη θα μπορούσε πιθανότατα να ταυριάζει με εκείνα ενός συνόλου ειδών που περιλαμβάνει την *S. fruticosa* Mill., την *S. officinalis* L. και την *S. pomifera* L. (Gunther 1968). Κατά άλλους συγγραφείς η ιστορία της *S. fruticosa* Mill. ξεκινά με αυτή της *S. officinalis* L. Σύμφωνα με τον Καββαδά (1936) ο ελελίσφακος του Θεόφραστου ήταν μάλλον η *S. fruticosa* Mill., ενώ ο ελελίσφακος του Διοσκουρίδη είναι η *S. officinalis* L. Συνεπώς είναι πιθανό, σε κάποια περίοδο της ιστορίας να έγινε μίξη μεταξύ των φυτών, γεγονός που οδήγησε στο να συμπεριληφθούν φαρμακευτικές εφαρμογές της *S. fruticosa* Mill. λανθασμένα στο σύνολο των χρήσεων της *S. officinalis* L. Προσθέτοντας στη σύγχυση σχετικά με το όνομα, το φυτό ονομάστηκε επίσης *Salvia triloba*, από τον Carl Linnaeus το 1781, μέχρι να ανακαλυφθεί ότι ήταν το ίδιο φυτό που ονομάστηκε από τον Philip Miller το 1768, με το τελευταίο όνομα να προτιμάται σύμφωνα με τις βοτανικές συμβάσεις ονομασίας των φυτών (Clebsch et al. 2003). Παράδειγμα της σύγχυσης που υπάρχει ανάμεσα στην *S. fruticosa* Mill. και *S. officinalis* L. είναι ότι περίπου το 50% του φασκόμηλου που εξάγεται στις Ηνωμένες Πολιτείες ως κοινό φασκόμηλο (*S. officinalis* L.) είναι στην πραγματικότητα το Ελληνικό φασκόμηλο (Greek Sage, *S. fruticosa* Mill.) (Rivera et al. 1994).

Η *S. fruticosa* Mill. φαίνεται πως δεν είχε χρησιμοποιηθεί από τους Εβραίους στην αρχαιότητα, γιατί δεν περιγράφεται ούτε αναφέρεται στη Βίβλο και σε σχετικά κείμενα (Moldenke et al. 1986, Zohary 1983).

Η *S. fruticosa* Mill. και το δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis* L.) βρέθηκαν συστηματικά στα μουσουλμανικά νεκροταφεία στο βόρειο Ισραήλ. Πράγματι, η *S. fruticosa* Mill. είναι το κύριο φυτό που χρησιμοποιείται σε όλες τις ανθρώπινες ιεροτελεστίες μετάβασης που συμβολίζουν τον ανθρώπινο κύκλο ζωής. Επίσης η χρήση της έχει μακρά παράδοση και σε άλλες μουσουλμανικές τελετουργίες που αφορούν τα νεογέννητα παιδιά και τους γάμους, ενώ συνηθίζεται να καίγεται και ως θυμίαμα (Amots et al. 2006).

1.1.1.3 Δρογοχημεία

Η δρόγη της *S. fruticosa* Mill. είναι τα αποξηραμένα της φύλλα, ολόκληρα ή θρυμματισμένα, που περιέχουν τουλάχιστον 18mL αιθέριου ελαίου ανά kg άθικτων φύλλων ή 12mL αιθέριου ελαίου ανά kg θρυμματισμένων φύλλων (Ph. Eur. 8th Edition 2014).

Έχουν αναφερθεί τα ακόλουθα χημικά συστατικά :

- Πτητικές ενώσεις: Το αιθέριο έλαιο που απομονώθηκε από τα φύλλα αποτελείται κατά κύριο λόγο από μονοτερπένια που περιέχουν οξυγόνο, [1,8-κινεόλη (40-67%), καμφορά (2-25%), α-,β-θουγιόνη, μονοτερπένια και σεοκιτερπένια (καμφένιο, μυρκένιο, α-πινένιο, β-πινένιο, Ε-καρνοφυλλένιο).
- Φλαβονοειδή: συμπεριλαμβανομένων των 7-Ο-γλυκοζιτών και 7-Ο-γλυκουρονιδίων της απιγενίνης, χρυσοεριόλης, ισπιδουλίνης, λουτεολίνης, 6-μεθυλο-λουτεολίνης, σαλβιγενίνης και ισαοσιδίνης.
- Φαινολικά οξέα: ροσμαρινικό οξύ (1,0 έως 2,5%)
- Διτερπένια αβιτανίου: καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη (0,5%)
- Τριτερπένια : κυρίως ουρσολικό οξύ και ολεανολικό οξύ.
- Πικρά συστατικά : πικροσαλβίνη

(Shaiq Ali et al. 2000, Gruenwald et al. 2000, Proença 2008, Al-Kalaldeh et al. 2010, Mossi et al. 2011, Dincer et al. 2012, Kaliora et al. 2014)

1.1.1.4 Δρογοφαρμακολογία

1.1.1.4.1 Στοιχεία από την παραδοσιακή ιατρική

Μια συστηματική μελέτη των φαρμακευτικών χρήσεων της *S. fruticosa* δημοσιεύθηκε από τους Rivera et al., (1994). Οι συγγραφείς αναφέρουν την παραδοσιακή της χρήση στις χώρες της νότιας ΕΕ, ιδίως Ισπανία και Πορτογαλία. Το έγχυμα των φύλλων χρησιμοποιείται στην Μαδέρα της Πορτογαλίας για την ανακούφιση από τον πονοκέφαλο (πριν από το 1990) και ως αποτοξινωτικό του αίματος που συνιστάται για προβλήματα του κυκλοφορικού. Στην Ισπανία, το έγχυμα και το αφέψημα των φύλλων ή των ανθοφόρων βλαστών φημολογούνται ως στομαχικά (που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια δύο ή εννέα συνεχόμενων ημερών), αποτοξινωτικά του αίματος και ως ηρεμιστικά. Σε άλλες, μη μεσογειακές χώρες της ΕΕ, το έγχυμα ή το αφέψημα χρησιμοποιούνται στον μετεωρισμό του στομάχου, ενώ ο χυμός χρησιμοποιείται ως ορεκτικό σε περιπτώσεις μειωμένης όρεξης. Έχει επίσης καταγραφεί στην Ισπανία η επούλωτική της δράση για εξωτερική χρήση.

Μια εθνοφαρμακολογική έρευνα (Dokos et al. 2009) των ενδημικών φαρμακευτικών φυτών στην περιοχή Πάφου της Κύπρου, αναφέρει και άλλες θετικές χρήσεις της *S. fruticosa* Mill. όπως στη βοήθεια της πέψης, καθώς το τσάι της προσφέρεται για να βοηθήσει μετά από βαριά γεύματα. Αναφέρεται επίσης ως υπογλυκαιμικό. Επιπλέον, το έγχυμα έχει θετική δράση στη μείωση του βήχα, του κρυολογήματος, του πονόλαιμου και της αμυγδαλίτιδας. Έχει αναφερθεί συχνά η δράση του φυτού κατά της εφίδρωσης, διάρροιας, πυρετού, σπασμών των λείων μυϊκών ινών, αλλά και ως τονωτικού.

Στην εργασία των Proenca da Cunha et al., (2008) αναφέρεται η τοπική χρήση του εγχύματος (3 έως 4 g δρόγης σε 100 mL νερού) ως στοματοπλύματος, για την ανακούφιση των φλεγμονών και των λοιμώξεων του στόματος και του φάρυγγα.

Στην μονογραφία του ESCOP *S. triloba* L. (2014), οι Stahl-Biskup (2008) και Benedum (2006) αναφέρουν ως ωφέλιμη την τοπική χρήση του εγχύματος (3 g αποξηραμένων φύλλων σε 125 mL νερού ως στοματικό διάλυμα) για την ανακούφιση από τις φλεγμονές και τις λοιμώξεις του στόματος και του λαιμού. Στην ίδια μονογραφία οι Stahl-Biskup (2008) και Böhme (2010) περιγράφουν τη *per os* χρήση του εγχύματος (1 έως 1,5 g αποξηραμένης δρόγης σε 150 mL νερού, μία ή περισσότερες φορές ημερησίως) για ανακούφιση από πεπτικές διαταραχές, όπως η δυσπεψία.

Μια εθνοφαρμακολογική μελέτη σε Κύπριους πολίτες που μιλούν τουρκικά (TSC), τόσο στην Κύπρο όσο και σε μια από τις μεγαλύτερες κοινότητες μεταναστών TSC στο Λονδίνο του Ηνωμένου Βασιλείου, έδειξε ότι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη φυτών για την αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων ήταν τα: *Mentha spicata* L., *S. fruticosa* Mill. και *Pimpinella anisum* L. (Yöney et al. 2010).

Η αυτοθεραπεία με φυτικά φάρμακα είναι μια κοινή πρακτική μεταξύ των Παλαιστινίων. Το 33,9% των ερωτηθέντων ανέφερε ότι χρησιμοποίησε βότανα για αυτοθεραπεία. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φυτά ήταν: *S. fruticosa* Mill., χαμομήλι (*Chamaemelum nobile* L.), γλυκάνισος (*Pimpinella anisum* L.) και θυμάρι (*Thymus vulgaris* L.). Οι φυτικές θεραπείες χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για την αντιμετώπιση πονοκέφαλου, γρίπης, πόνων της μέσης και πονόλαιμου. Ο κύριος παράγοντας για τη χρήση φυτοθεραπείας ήταν η ηπιότητα και απλότητα των συμπτωμάτων (Sawalha et al. 2008).

Η παραδοσιακή χρήση της *S. fruticosa* Mill. στην Παλαιστίνη περιλαμβάνει κυρίως τα προβλήματα του πεπτικού συστήματος και δευτερευόντως τα νοσήματα του δέρματος, του προστάτη, την ηπατίτιδα, τις φλεγμονές των πνευμόνων και τη φυματίωση (Ali-Shtayeh et al. 2000, Kaileh et al. 2007).

Μια άλλη εθνοφαρμακολογική έρευνα φαρμακευτικών φυτών που χρησιμοποιήθηκαν για τη θεραπεία της διάρροιας στη Δυτική Όχθη/Παλαιστίνη έγινε από τους Jaradat et al., (2016). Πληροφορίες για 50 φαρμακευτικά φυτά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της διάρροιας, συμπεριλαμβανομένων των ονομασιών των φυτών, των χρησιμοποιημένων τμημάτων (δρογών), του τρόπου και των μεθόδων παρασκευής, λήφθηκαν από 100 παραδοσιακούς θεραπευτές και βοτανολόγους. Αυτή η έρευνα ήταν η πρώτη επιστημονική μελέτη στη Μέση Ανατολή για τη συλλογή δεδομένων σχετικά με τα φυτά που χρησιμοποιούνται από αυτούς και τα αποδεδειγμένα αποτελέσματά τους κατά της ασθένειας αυτής. Τα επίπεδα πιστότητας ήταν 97% για την *S. fruticosa* Mill., το δηλητηριώδες *Teucrium polium* L. και τη μπανανιά *Musa paradisiaca* L., το 95% για το τειόδενδρο *Camellia sinensis* L. και το *Aegle marmelos* L., το 79% για το ρύζι *Oryza sativa* L. και την πατάτα *Solanum tuberosum* L., το 77% για το *Quercus boissieri* Reut., το 66% για τη γκουάβα *Psidium guajava*, 54% για το *Solanum nigrum* L. και 52% για το *Juglans regia* L. Τα υψηλότερα ποσοστά επιλογής, αποδοχής και χρήσης ήταν για τα φυτά: *S. fruticosa* Mill., *T. polium* L. και *M. paradisiaca* L. καθώς και ο συντελεστής της συναίνεσης του πληροφοριοδότη για τα φαρμακευτικά φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τη θεραπεία της διάρροιας. Τα φύλλα

ήταν τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μέρη, ακολουθούμενα από καρπούς, ρίζες/ριζώματα, ενώ η αφέψηση και η έγχυση ήταν οι προτιμώμενες μέθοδοι παρασκευής.

Η μελέτη των Gürdal et al., (2013) αποσκοπούσε στην τεκμηρίωση των παραδοσιακών χρήσεων των φαρμακευτικών φυτών στην περιοχή Μαρμαρά, και στη σύγκριση αυτών των πληροφοριών με τις τρέχουσες γνώσεις για τη φυτοθεραπεία στην Τουρκία και εν γένει τις μεσογειακές χώρες. Αναφέρθηκαν οι ιατρικές χρήσεις 64 φυτικών ειδών που ανήκουν σε 35 οικογένειες, συμπεριλαμβανομένων των χρήσεων 9 αιθέριων ελαίων. Τα περισσότερα από τα φαρμακευτικά φυτά που χρησιμοποιούνται στην περιοχή του Μαρμαρά ανήκουν στις οικογένειες Lamiaceae (13 είδη) και Asteraceae (4 είδη). Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φυτικά είδη είναι τα *S. fruticosa* Mill., *Origanum onites* L., *Lavandula stoechas* L., *Mentha pulegium* L. και *Satureja thymra* L. Η μελέτη έδειξε ότι η *S. fruticosa* Mill., χρησιμοποιείται ευρέως για το κοινό κρυολόγημα και για τον στομαχόπονο. Την ίδια χρήση έχει και σε άλλες περιοχές της Τουρκίας και την Κύπρο.

Παραδοσιακά, ως έγχυμα, αναφέρεται η χρήση της *S. fruticosa* Mill. σε κοινό κρυολόγημα, βήχα, στομαχόπονο, μετεωρισμό, δυσκοιλιότητα, σε ασθένειες του καρδιαγγειακού, ως διουρητικό, αντισηπτικό, σε δυσπεψία, προστατίτιδα, παθήσεις του ήπατος, έλκη, ως ορεξιογόνο, άφυσσο, αντιγηραντικό, για τον πονοκέφαλο, ως επουλωτικό, στον έρπητα, σε εγκαύματα, ως αντιφλεγμονώδες, σε νευρολογικά προβλήματα, σε παθήσεις του αναπνευστικού, του δέρματος και του μυοσκελετικού συστήματος, στη βελτίωση της μνήμης, ως ηρεμιστικό, υπνωτικό, για την αντιμετώπιση της κατάθλιψης, ως βελτιωτικό της κυκλοφορίας του αίματος, για την αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας, ως αποτοξινωτικό του αίματος, ως στυπτικό, έναντι δυσμηνόρροιας, νεφρολιθίασης και έναντι του άσθματος. Η εξωτερική χρήση υδατικών εκχυλισμάτων έχει αναφερθεί σε πονόλαιμο, μολύνσεις της στοματικής κοιλότητας, άφθες, αιμορραγία των ούλων, για πλύση των οφθαλμών σε περιπτώσεις φλεγμονής καθώς και ως εντομοαπωθητικό (Schilcher 1985, Baser et al. 1986, Karim et al. 1986, Valnet 1990, Perfumi et al. 1991, Grolier 1992, Kbayssi 1993, Laude et al. 1994, Akalın et al. 1994, Riviera et al. 1994, Honda et al. 1996, Hilan, et al. 1997, Dapkevicus et al. 1998, Gali-Muhtasib 2000, Everest et al. 2005, Aslan et al. 2007, Ugurlu et al. 2008, Gonzalez-Tejero et al. 2008, Sawalha 2008, Fakir et al. 2009).

Οι Todorov et al., (1984) μελέτησαν την επίδραση 15 εκχυλισμάτων τριών ειδών *Salvia*: 2 από *S. officinalis* L., 7 από *S. triloba* L. και 6 από *S. verbenaca* L., *in vivo* στην αρτηριακή πίεση υγείων και υπερτασικών αρουραίων. Η δράση των εκχυλισμάτων ερευνήθηκε επί του τόνου και της φασικής συσταλτικής δραστηριότητας απομονωμένων τμημάτων από ειλεό ινδικού χοιριδίου. Επίσης, διερευνήθηκε η επίδραση εκχυλισμάτων στην αναισθησία από εξοβαρβιτάλη. Η χορήγηση ενδοπεριτοναϊκά ή στο δωδεκαδάκτυλο, υδατοαλκοολικού (1:2, 70% αιθανόλη) εκχυλισματος της *S. officinalis* L. προκαλεί μέτρια αλλά παρατεταμένη μείωση της αρτηριακής πίεσης στους αρουραίους. Το αφέψημα της *S. triloba* L. έχει επίσης παρόμοιο αποτέλεσμα σε αυθόρμητα υπερτασικούς αρουραίους. Τα περισσότερα από τα εκχυλισματα *S. officinalis* L. και *S. triloba* L. αναστέλλουν σε διάφορους βαθμούς τη συστολή των λείων μυϊκών ινών που προκαλείται από: ακετυλοχολίνη, ισταμίνη,

σεροτονίνη και BaCl₂, ενώ τα εκχυλίσματα της *S. verbenaca* L. συνήθως την ενισχύουν. Οι μεταβολίτες από *S. triloba* L. παρατείνουν τον ύπνο που επάγεται από εξαβαρβιτάλη.

Σε άλλη μελέτη, το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα *S. triloba* L. έδειξε *in vitro* ασθενή δράση στην αναστολή ακετυλοχολινεστεράσης. Το αιθανολικό εκχύλισμα *S. triloba* L. είχε μέτρια δράση έναντι του υποδοχέα GABA (A)-βενζοδιαζεπίνης, ενώ δεν είχε σημαντική επίδραση στον φορέα επαναπρόσληψης της σεροτονίνης (Salah et al. 2005).

Οι Senol et al., (2010) μελέτησαν τη δράση 3 διαφορετικών εκχυλισμάτων (μεθανόλης, διχλωρομεθανίου και οξικού αιθυλεστέρα) 55 ειδών του γένους *Salvia* ως προς την εσπεράση της ακετυλοχολίνης. Από τα 165 συνολικά εκχυλίσματα που δοκιμάστηκαν, μόνο το ξηρό εκχύλισμα διχλωρομεθανίου *S. fruticosa* Mill. (13,4: 1) ξεπέρασε το 25% αναστολής (έδειξε 27% αναστολή σε δόση 25 μg/mL και 51% στα 100 μg/mL).

1.1.1.4.2 Στοιχεία από μελέτες *in vitro* και *in vivo* σε πειραματόζωα

A. Κεντρικό νευρικό σύστημα

A1. Δράση κατά της νόσου Alzheimer

Η νόσος του Alzheimer (AD) είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή. Το αυξημένο οξειδωτικό στρες έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα σημαντικό πρόωμο χαρακτηριστικό στην AD. Οι Mahdy et al., (2012) εξέτασαν την πιθανή δράση εκχυλισμάτων *S. triloba* L. και *P. nigrum* L. στη νόσο Alzheimer (AD). Για το σκοπό αυτό προκάλεσαν AD σε αρουραίους κατόπιν χορήγησης AlCl₃, τους χώρισαν σε ομάδες και τους υπέβαλαν σε θεραπεία με ριβαστιγμίνη (Rivastigmine) σε δόση 0,3 mg/kg βάρους σώματος, καθημερινά για τρεις μήνες, με ολικό μεθανολικό εκχύλισμα *S. triloba* L. σε δόση 750 ή 375 mg/kg βάρους σώματος, και με ολικό μεθανολικό εκχύλισμα *P. nigrum* L. σε δόση 187,5 ή 93,75 mg/kg βάρους σώματος, αντίστοιχα, καθημερινά για τρεις μήνες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα *S. triloba* L. και *P. nigrum* L. καθώς και η ριβαστιγμίνη προκάλεσαν σημαντική αύξηση της ακετυλοχολίνης (ACh) στον εγκέφαλο, της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στον ορό του αίματος και της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) στα ερυθροκύτταρα, ενώ παρατηρήθηκαν σημαντικές μειώσεις στην ακετυλοχολινεστεράση (AChE) εγκεφάλου, στην μηλονική αλδεΐδη (MDA) και στο μονοξειδίο του αζώτου (NO) στον ορό. Επιπλέον, η ιστολογική εξέταση των τμημάτων του εγκεφάλου έδειξε σχεδόν φυσιολογική ιστολογική δομή του υποκάμπου. Η θεραπεία με *S. triloba* L. σε δόση 750 mg/kg βάρους σώματος, ήταν ισχυρότερη στην προστασία από τη νόσο από το *P. nigrum* L., όπως υποδεικνύεται τόσο από τα βιοχημικά όσο και από τα ιστοπαθολογικά ευρήματα. Αυτή η μελέτη αποκάλυψε ότι η θεραπεία των AD-επαγόμενων αρουραίων με ολικά φυτικά εκχυλίσματα *S. triloba* L. και *P. nigrum* L., μείωσαν σημαντικά την κατάσταση του οξειδωτικού στρες και βελτίωσαν το χαρακτηριστικό νευροεκφυλισμό της νόσου. Αξίζει να σημειωθεί ότι το εκχύλισμα *S. triloba* L. εμφάνισε το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τη βελτίωση της νόσου Alzheimer *in vivo* σε αρουραίους.

Η μελέτη των Ahmed et al., (2012) σε ενήλικες αρσενικούς αρουραίους Sprague-Dawley, που προκλήθηκαν πειραματικά οι βλάβες της νόσου Alzheimer, έδειξε ότι η

ομάδα που έλαβε αγωγή από του στόματος, με μεθανολικό (ξηρό) εκχύλισμα *S. triloba* L. σε δόση 750 και 375 mg/kg βάρους σώματος, καθημερινά για 3 μήνες, και η ομάδα που έλαβε εκχύλισμα *Piper nigrum* L. 187,5 και 93,75 mg/kg βάρους σώματος, καθημερινά για 3 μήνες, παρουσίασαν αύξηση στα επίπεδα της ακετυλοχολίνης εγκεφάλου (ACh), μείωση της δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) ορού και εγκεφάλου, μείωση των επιπέδων της CRP (C-αντιδρώσας πρωτεΐνης), γενικού δείκτη φλεγμονής, του NF-κΒ (πυρηνικού παράγοντα κάπα-B) και της MCP-1 (χημειοελκτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα *S. triloba* και *P. nigrum* ασκούν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση έναντι νευροφλεγμονών που χαρακτηρίζουν τη νόσο Alzheimer.

Τα υδατοαλκοολικά εκχυλίσματα (75° αλκοόλη, υπέργεια τμήματα των αποξηραμένων φυτών) τριών παραδοσιακά χρησιμοποιούμενων ειδών Lamiales για ενίσχυση της μνήμης, των: *S. triloba* L., *Melissa officinalis* L. και *Teucrium polium* L., αξιολογήθηκαν *in vivo*, σε ποντικούς, για την δράση τους κατά της αμνησίας, που προκαλείται μετά την χορήγηση σκοπολαμίνης, και *in vitro* για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και την ανασταλτική τους δράση έναντι του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Υπολογίστηκε και η περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες των φυτικών εκχυλισμάτων. Η *S. triloba* L. ήταν το πιο αποτελεσματικό φυτό στο αντιμνησιακό πείραμα. Σε δόσεις των 100, 200 και 400 mg/kg βάρους σώματος το εκχύλισμα της *S. triloba* L. είχε 22,7, 57,1 και 71,4% σχετική επίδραση ενίσχυσης της μνήμης, αντίστοιχα. Το *T. polium* L. παρουσίασε επίσης δοσοεξαρτώμενη δράση, ενώ η *M. officinalis* L. ήταν εντελώς ανενεργή. Στο ίδιο πείραμα 10 mg/kg βάρους σώματος του φαρμάκου donepezil (Donepezil), που χρησιμοποιείται ευρέως στη φαρμακευτική αγωγή των ασθενών με Alzheimer, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός έλεγχος, με σχετική επίδραση ενίσχυσης της μνήμης ρυθμισμένη στο 100%, ενώ η σκοπολαμίνη σε δόση 1mg/kg βάρους σώματος είχε 0% (ομάδα ελέγχου). Τα εκχυλίσματα έδειξαν παρόμοια ικανότητα αναστολής έναντι της ακετυλοχολινεστεράσης, με το *T. polium* L. να έχει την υψηλότερη αναστολή (65,8% σε συγκέντρωση 1,0 mg/mL). Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση, όλα τα εκχυλίσματα εκδήλωσαν υψηλή δραστηριότητα με τιμές IC50 όλων των εκχυλισμάτων μεταξύ 0,227 και 0,428 mg/mL. Η μέτρηση των ολικών πολυφαινολών κατά φθίνουσα σειρά ήταν: *T. polium* L. > *M. officinalis* L. > *S. triloba* L. (Orhan et al. 2009).

Η ανασταλτική δράση έναντι της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) διαφόρων εκχυλισμάτων από *S. trichoclada* L., *S. verticillata* L., *S. fruticosa* Mill. και του κυριότερου μεταβολίτη τους, του ροσμαρινικού οξέος, προσδιορίστηκε με την μέθοδο Ellman και σε ελεό ινδικού χοιριδίου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορίστηκε με DPPH. Το εκχύλισμα μεθανόλης της *S. trichoclada* έδειξε την υψηλότερη αναστολή στην AChE. Το ίδιο εκχύλισμα και το ροσμαρινικό οξύ, προκάλεσαν σημαντική συστολή σε απομονωμένο ελεό ινδικού χοιριδίου και παρουσίασαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Τα αποτελέσματα πρόσδεσης του ροσμαρινικού οξέος έδειξαν υψηλή συγγένεια με την AChE, με αποτέλεσμα να προταθεί ως υποψήφιο μόριο στη θεραπεία της νόσου Alzheimer (AD) (Demirezer et al. 2015).

B. Νεοπλασίες

Η αγγειογένεση είναι ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων. Η ύπαρξη της νεοπλασίας εξαρτάται από την αγγειογένεση. Πράγματι, κάθε σημαντική αύξηση στο μέγεθος του όγκου πρέπει να είναι συγχρονισμένη με την αύξηση της παροχής του αίματος. Τα νέα αιμοφόρα αγγεία προμηθεύουν τα νεοπλασματικά κύτταρα με επιπλέον ποσότητα οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών και διευκολύνουν τη μετάσταση των κυττάρων αυτών. Όλοι οι συμπαγείς όγκοι εξαρτώνται από την αγγειογένεση για την ανάπτυξη του μεγέθους τους και την εν δυνάμει μετάσταση τους (Folkman et al. 2002). Το αιθανολικό εκχύλισμα *S. triloba* έδειξε πολύ ελπιδοφόρες, άμεσες και έμμεσες, αντιαγγειογενετικές δραστηριότητες. Η *S. triloba* αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ανθρώπινων κυττάρων ενδοθηλίου των φλεβών του ομφαλού (HUVEC Human umbilical vein endothelial cell line) με IC50 στα 90 µg/mL και την μετανάστευση των HUVEC κατά 82% στα 150 µg/mL. Περαιτέρω, η *in vivo* δοκιμασία CAM απεκάλυψε επίσης την υψηλή επίδραση της *S. triloba* έναντι του νεοσυσταθέντος αγγείου στην εμβρυϊκή μεμβράνη κοτόπουλου. Είναι ενδιαφέρον ότι η *S. triloba* αναστέλλει την έκφραση του VEGF (αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, Vascular endothelial growth factor) σε mRNA επίπεδο, και το mRNA του HIF-1α (επαγόμενος από την υποξία παράγοντας-1α Hypoxia-inducible factor-1) στα κύτταρα καρκίνου του μαστού MCF7, τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου όσο και υποξίας. Συνολικά, όλα αυτά τα ευρήματα των άμεσων και έμμεσων αντιαγγειογενετικών αποτελεσμάτων της έρευνας υποδεικνύουν το αιθανολικό εκχύλισμα *S. triloba* ως ένα παράγοντα με ισχυρή αντιαγγειογενετική δράση, που μπορεί, εν δυνάμει, να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη ή/και για τη θεραπεία νεοπλασιών (Zihlif et al. 2013).

Το εκχύλισμα αιθανόλης που λήφθηκε από τη *S. triloba* συλλεχθέν στην Ιορδανία, αξιολογήθηκε για την αντι-πολλαπλασιαστική του δράση στις κυτταρικές σειρές MCF7 και T47D του καρκίνου του μαστού, με τη δοκιμασία της σουλφοροδαμίνης B. Το εκχύλισμα αιθανόλης ήταν βιολογικά ενεργό με τιμές IC50 29,89±0,92 και 38,91±2,44 µg/mL έναντι των κυττάρων MCF7 και T47D αντίστοιχα. Η ανάλυση κυτταρομετρίας ροής και η δοκιμή ιωδιούχου AnnexinV-προπιδίου (PI) έδειξε ότι το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού προκαλεί κυτταρικό θάνατο κυρίως μέσω απόπτωσης και σε μικρότερο βαθμό μέσω νέκρωσης. Το εκχύλισμα από *S. triloba* προκάλεσε αύξηση των μονο- και ολιγονουκλεοσωματιδίων στο κυτταρόπλασμα. Η αποπτωτική δράση δεν ρυθμίστηκε από το p21. Το εκχύλισμα της *S. triloba* δεν αύξησε τα επίπεδα του p53 και η απόπτωση που προκλήθηκε από αυτό δεν ήταν εξαρτώμενη από την κασπάση-8 ή την sFas/FasL. Τα ευρήματά της μελέτης υπέδειξαν ότι το αιθανολικό εκχύλισμά *S. triloba* μπορεί να είναι χρήσιμο στη διαχείριση/θεραπεία του καρκίνου του μαστού μέσω αποπτωτικών και κυτταροτοξικών μηχανισμών (Abu-Daḥab et al. 2014).

Οι Atmaca et al., (2016) μελέτησαν την αποπτωτική και αντιαγγειογενετική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος της *S. triloba* σε κυτταρικές σειρές νεοπλασίας του προστάτη. Το φυτικό εκχύλισμα εμφάνισε δόσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική και αποπτωτική δράση στις κυτταρικές σειρές που εφαρμόστηκε. Ωστόσο, δεν ήταν κυτταροτοξικό στα φυσιολογικά κύτταρα. Η κυτταρική κινητικότητα μειώθηκε στα PC-3, DU-145 και HUVEC κύτταρα με το μεθανολικό εκχύλισμα *S. triloba*. Τα

αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν ότι το μεθανολικό εκχύλισμα του φυτού μπορεί να αποτελέσει έναν πολλά υποσχόμενο παράγοντα στη θεραπεία της νεοπλασίας του προστάτη (Atmaca et al. 2016).

Η αντι-πολλαπλασιαστική δράση των αιθερίων ελαίων, των αιθανολικών (70°, 2,5 gr δρόγης σε 50 mL διαλύτη) και υδατικών (ως αφέψημα: 2,5 gr δρόγης σε 50 mL ύδατος) εκχυλισμάτων των φυτών *Laurus nobilis* L., *Origanum syriacum* L., *Origanum vulgare* L. και *Salvia triloba* της Ιορδανίας, διερευνήθηκε στο αδενοκαρκίνωμα του μαστού MCF7. Το κύριο συστατικό στα πιητικά έλαια των φυτών *L. nobilis* και *S. triloba* ήταν η 1,8-κινεόλη (ευκαλυπτόλη) με συγκεντρώσεις 40,91% και 45,16% αντίστοιχα, του *O. syriacum* L. ήταν η καρβακρόλη (47,10%), ενώ στο *O. vulgare* ήταν το ένυδρο trans-σαβινένιο (27,19%). Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν ότι το αιθανολικό εκχύλισμα φύλλων *O. syriacum* και τα αιθανολικά εκχυλίσματα νωπών φύλλων *L. nobilis* και *S. triloba*, εμφάνισαν αντι-πολλαπλασιαστική δράση στα κύτταρα MCF7, (IC50: 6,40, 24,49 και 25,25 μg/mL, αντίστοιχα). Ωστόσο, κανένα από τα αιθέρια έλαια και τα υδατικά εκχυλίσματα των φυτών που μελετήθηκαν δεν έδειξε κυτταροτοξική δράση (Al-Kalaldeh et al. 2010).

Σε άλλη μελέτη, σε ανθρώπινα κύτταρα HT-29 αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου, διερευνήθηκαν *in vitro* οι επιδράσεις *S. fruticosa* Mill. και της κύριας φαινολικής ένωσης της, του ροσμαρινικού οξέος (RA), όσον αφορά στην έκφραση του mRNA των CYP1A2, CYP2E1, NQO1, GPx και GSTm1, αλλά και οι ενζυμικές δραστηριότητες των GPx και GSTs. Οι ξενοβιοτικές ουσίες μεταβολίζονται από τα ένζυμα φάσης I, CYP1A2 και CYP2E1, που παράγουν δραστικούς μεταβολίτες οι οποίοι εξαλείφονται από τη δράση των ενζύμων φάσης II, NQO1, GPx και S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GSTs). Η ανάλυση έκφρασης του mRNA αποκάλυψε ότι τα επίπεδα των CYP1A2 και CYP2E1 μειώθηκαν ενώ τα επίπεδα των NQO1, GPx και GSTm1 αυξήθηκαν μετά από τις αγωγές με *S. fruticosa* και RA. Παράλληλα με τις γονιδιακές εκφράσεις, οι ενζυμικές δράσεις των GPx και GST από το *S. fruticosa* αυξήθηκαν 1,68 και 1,48 φορές αντίστοιχα. Επιπλέον, το RA αύξησε τις δραστηριότητες του GPx και της GSTs 1,67 και 1,94 φορές αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι η *S. fruticosa* και το ροσμαρινικό οξύ φαίνεται ότι μπορούν να επηρεάσουν τον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών, λόγω μεταβολών τόσο στην παραγωγή των εμπλεκόμενων ενζύμων όσο και στη δραστηριότητα τους (Altay et al. 2017).

Οι Abu-Dahab et al., (2012) μελέτησαν την κυτταροτοξική δράση των ολικών αιθανολικών ξηρών (5 g δρόγης σε 50 mL 70% EtOH) εκχυλισμάτων 9 ειδών *Salvia*: *S. ceratophylla* L., *S. dominica* L., *S. hormium* L., *S. hierosolimitana* Boiss., *S. indica* L., *S. spinosa* L., *S. syriaca* L., *S. fruticosa* Mill. και *S. verbeneca* L. από την Ιορδανία, σε ανθρώπινα κύτταρα του καρκίνου του μαστού MCF-7, T47D, ZR-75-1 και BT 474 με τη δοκιμασία σουλφοροδαμίνης Β. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας μη μετασηματισμένη κυτταρική γραμμή (Vero) και φυσιολογικά κύτταρα ινοβλαστών, προκειμένου να αποδειχθεί η εκλεκτικότητα και η ασφάλεια τους. Από τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν, αυτά των *S. dominica* και *S. fruticosa* έδειξαν ανασταλτική συγκέντρωση 50% των κυττάρων (IC50) σε συγκεντρώσεις < 30 μg/mL έναντι των τεσσάρων κυτταρικών σειρών που εξετάστηκαν. Η *S. syriaca* και *S.*

hormium εμφάνισαν $IC_{50} < 30 \mu\text{g}/\text{mL}$ για δύο από τις τέσσερις κυτταρικές σειρές. Οι *S. fruticosa*, *S. hormium* και *S. syriaca* έδειξαν εκλεκτικότητα στην αντι-πολλαπλασιαστική τους δράση έναντι κυτταρικών σειρών θετικών σε υποδοχείς οιστρογόνων και ελάχιστη τοξικότητα έναντι φυσιολογικών ανθρώπινων ινοβλαστών. Ο φυτοχημικός έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας έδειξε την παρουσία τερπενοειδών, φλαβονοειδών και κουμαρινών σε όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα. Σύμφωνα με τους συγγραφείς τα τρία από τα εξεταζόμενα φυτικά εκχυλίσματα που επέδειξαν αντι-πολλαπλασιαστική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων του μαστού και ταυτόχρονα αποδείχθηκαν ασφαλή και εκλεκτικά, θα μπορούσαν δυνητικά να θεωρηθούν πιθανή πηγή για νέα αντικαρκινική θεραπεία.

Η βλάβη που προκαλείται από οξειδωτικούς και αλκυλιωτικούς παράγοντες στο DNA, οδηγούν σε πιθανές μεταλλάξεις που μπορούν να συμβάλλουν στην καρκινογένεση. Ωστόσο, μερικοί αλκυλιωτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου λόγω της ικανότητάς τους να προκαλούν βλάβη στο DNA και στη συνέχεια απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Σε αυτή τη μελέτη εξετάστηκαν οι γονοτοξικές επιδράσεις των παραγόντων οξειδωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και των αλκυλιωτικών παραγόντων N-μεθυλ-N-νιτροζουρία (MNU) και 1,3-δισ-(2-χλωροαιθυλ)-1-νιτροουρία (BCNU) σε δύο κυτταρικές γραμμές του παχέος εντέρου (HCT15 και CO115). Επίσης προσδιορίστηκαν τα πιθανά προστατευτικά αποτελέσματα των εκχυλισμάτων τριών ειδών *Salvia*: *S. officinalis* L. (SO), *S. fruticosa* Mill. (SF) και *S. lavandulifolia* Vahl. (SL), έναντι της βλάβης του DNA προκαλούμενης από οξειδωτικούς και αλκυλιωτικούς παράγοντες. Η SO και η SF προστατεύουν από την οξειδωτική βλάβη του DNA στα κύτταρα HCT15. Η SO και η SL μείωσαν την καταστροφή του DNA που προκλήθηκε από το MNU σε κύτταρα CO115. Εκτός από τα προληπτικά αποτελέσματα των φυτικών εκχυλισμάτων, ήταν επίσης σημαντικό να ερευνηθεί εάν αυτά τα φυτικά εκχυλίσματα μπορεί να παρεμβαίνουν με αλκυλιωτικούς παράγοντες, όπως ο BCNU που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του καρκίνου, μειώνοντας την αποτελεσματικότητά τους. Τα αποτελέσματά έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα φασκόμηλου που ελέγχθηκαν και το ροσμαρινικό οξύ (RA), ως κύριο συστατικό, προστατεύουν τα κύτταρα CO115 από βλάβες στο DNA που προκαλούνται από την BCNU. Στα κύτταρα HCT15, μόνο το SF προκάλεσε μια μείωση στην προκαλούμενη από BCNU βλάβη του DNA. Τα υδατικά εκχυλίσματα φασκόμηλου και το RA δεν άλλαξαν σημαντικά την έκφραση της πρωτεΐνης αποκατάστασης του DNA σε οποιαδήποτε κυτταρική γραμμή. Τα δεδομένα έδειξαν ότι τα υδατικά εκχυλίσματα *Salvia* είναι ικανά να προστατεύσουν τα κύτταρα του παχέος εντέρου από την οξειδωτική και αλκυλιωτική βλάβη του DNA. Επίσης, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί, διότι μπορεί να παρεμβαίνουν στην αποτελεσματικότητα των αλκυλιωτικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου (Ramos et al. 2012).

Άλλη μελέτη αξιολόγησε την ικανότητα των υδατικών εκχυλισμάτων τριών ειδών *Salvia*: *S. officinalis* L. (SO), *S. fruticosa* Mill. (SF) και *S. lavandulifolia* Vahl. (SL), και των κυριότερων φαινολικών συστατικών τους: του ροσμαρινικού οξέος (RA) και του λουτεολίνο-7-γλυκοσίδη (L-7-G), να προστατεύσουν το DNA που εκτίθενται σε οξειδωτικούς παράγοντες σε κύτταρα Caco-2 και HeLa και την ικανότητα τους να διορθώσουν βλάβες του DNA σε κύτταρα Caco-2. Η τελική συγκέντρωση εκάστου

εκχυλίσματος φασκόμηλου ήταν 50 µg/mL ενώ οι συγκεντρώσεις RA και L-7-G ήταν 50 και 20 µM αντιστοίχως. Μετά από σύντομη επώαση (2 ώρες), η L-7-G έδειξε ότι προστατεύει το DNA, σε κύτταρα Caco-2, από βλάβη που προκλήθηκε από H₂O₂ (75 µM). Επίσης, μετά από μακρά επώαση (24 ώρες), τα SF, RA και L-7-G είχαν προστατευτικά αποτελέσματα στα κύτταρα Caco-2. Στα κύτταρα HeLa, μετά από 24 ώρες επώασης, τα SO, SF και RA προστατεύουν από βλάβες που προκλήθηκαν από το H₂O₂. Η μελέτη διόρθωσης του DNA έδειξε ότι στα κύτταρα Caco-2 που υποβλήθηκαν σε αγωγή με H₂O₂, τα SO, SF και L-7-G αύξησαν την ταχύτητα της επιδιόρθωσης του. Συμπερασματικά, τα εκχυλίσματα SO και SF, και οι απομονωμένες ενώσεις RA και L-7-G απέδειξαν ότι προστατεύουν τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη του DNA αλλά και ότι τα SO, SF και L-7-G σε περίπτωση βλάβης του DNA είναι ικανά να διεγείρουν την επιδιόρθωση του (Ramos et al. 2010).

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η διατροφή είναι βασικός παράγοντας στη διαμόρφωση του σποραδικού κινδύνου για καρκίνωμα του παχέος εντέρου (CRC). Στην μελέτη των Xavier et al., (2009) αξιολογήθηκαν η αντιπολλαπλασιαστική και αποπτωτική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων των *S. fruticosa* (SF), *S. officinalis* (SO) και της κύριας φαινολικής τους ένωσης, το ροσμαρινικό οξύ (RA), σε δύο κυτταρικές σειρές προερχόμενες από καρκίνωμα του ανθρώπινου παχέος εντέρου, την HCT15 και την CO115, οι οποίες έχουν διαφορετικές μεταλλάξεις στις οδούς σηματοδότησης MAPK/ERK και PI3K/Akt. Αυτές οι οδοί μεταβάλλονται συνήθως στο CRC, οδηγώντας σε αυξημένο πολλαπλασιασμό και αναστολή της απόπτωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι SF, SO και RA επάγουν την απόπτωση και στις δύο κυτταρικές σειρές, ενώ ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αναστέλλεται από τα δύο εκχυλίσματα μόνο στην κυτταρική σειρά HCT15. SO, SF και RA αναστέλλουν την φωσφορυλίωση του ERK στα κύτταρα HCT15, αλλά δεν είχαν καμία δράση στην φωσφορυλίωση του Akt στα κύτταρα CO115. Η δρατικότητα των εκχυλισμάτων φασκόμηλου φαίνεται να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην αναστολή της οδού MAPK/ERK.

Η *S. fruticosa* έδειξε αξιοσημείωτη αντινεοπλασματική δράση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού, της σειράς MDA-MB231 και MCF7, και σε κύτταρα ινοσαρκώματος ποντικού της σειράς L929sA, ανάμεσα σε 24 εξεταζόμενα φυτά που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική της Παλαιστίνης. Στην συγκεκριμένη μελέτη έγινε χρήση του μεθανολικού κλάσματος του αρχικού εκχυλίσματος (μεθανόλη: διχλωρομεθάνιο= 1: 1) των αποξηραμένων φύλλων και βλαστών της *S. fruticosa*. Αναλυτικότερα, στα κύτταρα L929sA η *S. fruticosa* είχε την τέταρτη κατά σειρά μικρότερη τιμή IC₅₀, 180 µg/mL, μετά την *Psidium guajava* L. 55 µg/mL (το πιο δραστικό), την *Withania somnifera* Dunal 150 µg/mL και την *Laurus nobilis* 175 µg/mL, στα κύτταρα MCF7 η *S. fruticosa* Mill. είχε την δεύτερη μικρότερη τιμή IC₅₀, 250 µg/mL, μετά την *Withania somnifera* 60 µg/mL, ενώ στα κύτταρα MDA-MB231 η *S. fruticosa* παρουσίασε την μικρότερη τιμή IC₅₀, 290 µg/mL από τα 24 εξεταζόμενα φυτά. Επίσης αξιοσημείωτο είναι ότι σε πείραμα για την ανασταλτική δράση των φυτικών εκχυλισμάτων στην ενεργοποίηση του nF-κB (πυρηνικού παράγοντα κB), η *S. fruticosa* είχε την 8^η θέση στη σειρά κατάταξης της ανασταλτικής ισχύος (Kaileh et al. 2007).

Γ. Στοματική κοιλότητα

Τα επιμέρους συστατικά των *Syzygium aromaticum* L. και *Cinnamomum zeylanicum* L. που περιέχονται σε οδοντιατρικά υλικά, πολλές φορές προκαλούν υπερευαισθησία και ερεθισμούς. Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα στην οδοντιατρική για τη χρήση ολόκληρων των εκχυλισμάτων αυτών των φυτών ή άλλων νέων, πολλά υποσχόμενων όπως η *Salvia triloba*, ένα πολύ γνωστό αντιφλεγμονώδες φυτό με παραδοσιακή χρήση σε οδοντιατρικά προβλήματα. Με αυτό το σκεπτικό οι Mendi et al., (2017) έκαναν μια μελέτη με στόχο να ερευνηθεί και να συγκριθεί η δράση τριών φυτικών αιθανολικών εκχυλισμάτων, των *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum* και *S. triloba*, όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την ανοσολογική απόκριση των βλαστοκυττάρων του οδοντικού πολφού (DPSCs). Χρησιμοποιήθηκε το xCELLigence, ένα σύστημα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο, δημιουργώντας μια καμπύλη ανάπτυξης των DPSCs με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Μια δόση των 10 µg/mL ήταν η πλέον αποτελεσματική συγκέντρωση για τη ζωτικότητα. Η οστεογενής διαφοροποίηση και οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας ELISA για την ανίχνευση πρώιμων και όψιμων δεικτών διαφοροποίησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το επίπεδο οστεονεκτίνης (ON, πρώιμος οστεογονικός δείκτης) μειώθηκε που σημαίνει ότι η οστεογενής διαφοροποίηση μπορεί να επιταχυνθεί με την προσθήκη των εκχυλισμάτων. Ωστόσο, το επίπεδο οστεοκαλσίνης (OCN, όψιμος οστεογονικός δείκτης και σημάδι κοκκιοποίησης ασβεστίου) διέφερε μεταξύ των εκχυλισμάτων, όπου το *S. aromaticum* παρουσίασε την υψηλότερη τιμή, ακολουθούμενο από τα *S. triloba* και *C. Zeylanicum*. Παραδόξως, τα προσδιορισθέντα κοκκία ασβεστίου μειώθηκαν στα *S. aromaticum* και *S. triloba*. Σε απόκριση του παράγοντα νέκρωσης όγκου άλφα (TNF-α), τα DPSC που υπέστησαν αγωγή με *S. triloba* έδειξαν το μικρότερο επίπεδο της κυτοκίνης IL-6. Οι συγγραφείς πρότειναν το *C. zeylanicum* ως έναν ελπιδοφόρο οστεογονικό επαγωγέα και τη *S. triloba* ως ισχυρό αντιφλεγμονώδη παράγοντα, που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια στην οδοντιατρική. Επίσης, σημείωσαν ότι επειδή ο σχηματισμός κοκκίων ασβεστίου και η βιωσιμότητα των κυττάρων διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό σκληρών ιστών, το *S. aromaticum* στην οδοντιατρική πρέπει να ελέγχεται αυστηρά και πρέπει να διερευνηθεί ο μηχανισμός που οδηγεί στον σχηματισμό κόκκων ασβεστίου. Ως δρόγη χρησιμοποίησαν τα άγουρα άνθη (μπουμπούκια).

Δ. Αντιοξειδωτική δράση

Οι Ciesła et al., (2013) μελέτησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα των κλασμάτων των *S. officinalis* και *S. triloba* καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι έχουν το ίδιο αποτύπωμα ως εκκαθαριστές (scavenger) ελευθέρων ριζών.

Οι εκκαθαριστές (scavenger) ελευθέρων ριζών που προέρχονται από βότανα έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονου επιστημονικού ενδιαφέροντος. Πρόσφατα, η έννοια της σύνδεσης των χημικών χρωματογραφικών αποτυπωμάτων με τα αποτυπώματα βιολογικής ανάλυσης απέκτησε μεγάλη προσοχή για τον ποιοτικό έλεγχο των φυτικών εκχυλισμάτων. Εντούτοις, η ταυτοποίηση της scavenger δράσης κάθε μεμονωμένης ένωσης σε ένα πολύπλοκο μίγμα είναι ένα δύσκολο έργο. Η

μεταχρωματογραφική επεξεργασία χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας με διάλυμα μεθανόλης του DPPH, μπορεί να αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο σε τέτοιες αναλύσεις. Οι Ciesła et al., (2011) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο αυτή για την ανάπτυξη των χρωματογραφικών αποτυπωμάτων, αλλά και για την αξιολόγηση της scavenger δράσης κατά των ελευθέρων ριζών, με σκοπό να μελετήσουν δεκαεννέα είδη *Salvia* που καλλιεργούνται στην Πολωνία. Διεξήχθη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας για την ανάλυση των λιγότερο πολικών ενώσεων και ουσιών μέσης και μεγάλης πολικότητας. Οι πλάκες ψεκάστηκαν με αντιδραστήριο βανιλίνης-θεικού οξέος για την παραγωγή χημικών αποτυπωμάτων και με μεθανολικό διάλυμα DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) για να παραχθούν αποτυπώματα scavenger ελευθέρων ριζών. Σε τέσσερα είδη *Salvia*, αποκαλύφθηκε ότι οι ισχυρές ιδιότητες απομάκρυνσης ελεύθερων ριζών δεν οφείλονται μόνο στην παρουσία πολικών φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων, αλλά και λόγω της παρουσίας αρκετών σαρωτών ελεύθερων ριζών στο λιγότερο πολικό κλάσμα. Λόγω των ομοιοτήτων τόσο στα χρωματογραφικά αποτυπώματα όσο και σε αυτά των ελεύθερων ριζών, η *S. triloba* μπορεί να θεωρηθεί ισοδύναμο της *S. officinalis*. Τα χρωματογραφικά αποτυπώματα που αναπτύχθηκαν στα πειράματα αποδείχθηκαν χρήσιμα για την ανάλυση σύνθετων εκχυλισμάτων των διαφόρων ειδών *Salvia*.

Σε άλλη μελέτη συγκρίθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ των υδατικών εκχυλισμάτων *Tilia argentea* Desf ex DC, *Salvia triloba* L. και δύο τουρκικών εμπορικών προϊόντων μαύρου τσαγιού, *Camellia sinensis* L. Όλα τα δείγματα παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αντιοξειδωτική δράση, με τα δύο εκχυλίσματα *C. sinensis* να εμφανίζουν την υψηλότερη. Ωστόσο, οι διαφορές μεταξύ *Tilia argentea* και *Salvia triloba* καθώς και τίλιου έναντι *Camellia sinensis* δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (και για τις δύο περιπτώσεις $p > 0,05$). Η αντιοξειδωτική δράση και η αναγωγική ισχύς του υδατικού εκχυλίσματος *Tilia argentea* ήταν εξαρτώμενες από τη συγκέντρωση. Ακόμα και παρουσία 50 μg εκχυλίσματος, η αναγωγική ισχύς ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνη του μάρτυρα ($p < 0,05$) στην οποία δεν υπήρχε εκχύλισμα. Σε αντίθεση με την αντιοξειδωτική δράση, την υψηλότερη αναγωγική ισχύ την εμφάνισε το εκχύλισμα *S. triloba* L. Από αυτά τα αποτελέσματα, οι συγγραφείς προτείνουν ότι αν και η αναγωγική ισχύς μιας ουσίας μπορεί να είναι ένας δείκτης της πιθανής αντιοξειδωτικής της δράσης, μπορεί να μην υπάρχει πάντα μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ αυτών των δύο δραστηριοτήτων (Yildirim et al. 2000).

Οι Boukhary et al., (2016) μελέτησαν την αντιοξειδωτική ικανότητα, το περιεχόμενο σε ολικές πολυφαινόλες και την αντιφλεγμονώδη δράση του αποξηραμένου υπέργειου τμήματος αλλά και των αποξηραμένων ριζών της *S. fruticosa* σε τέσσερα διαφορετικά εκχυλίσματα: χλωροφορμικό, μεθανολικό, οξικό αιθυλεστερικό και βουτανολικό. Όσον αφορά την αντιοξειδωτική ικανότητα στα υπέργεια τμήματα του φυτού, την καλύτερη απόδοση είχε το μεθανολικό και το χλωροφορμιακό εκχύλισμα, ενώ χρησιμοποιώντας τις ρίζες την υψηλότερη τιμή την εμφάνισε το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστερά. Οι μεγαλύτερες τιμές στο περιεχόμενο των ολικών πολυφαινόλων βρέθηκαν στο μεθανολικό εκχύλισμα του υπέργειου τμήματος, και στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστερά στην περίπτωση των ριζών. Η ρουτίνη και η λουτεολίνη ήταν τα πλέον άφθονα συστατικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν οι

συγγραφείς μελέτησαν τη σχέση μεταξύ αντιοξειδωτικής δράσης και περιεχομένου σε ολικές πολυφαινόλες, διαπίστωσαν μια ισχυρή συσχέτιση ($R^2=0,0559$, $r=0,24$).

Η αντιφλεγμονώδης δράση, τόσο των ριζών όσο και του υπέργειου τμήματος της *S. fruticosa* προσδιορίστηκαν *in vivo* σε οίδημα πέλματος ποντικού που προκαλείται από την καρραγενάνη. Τόσο οι ρίζες όσο και τα εναέρια μέρη εμφάνισαν σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση, συγκρίσιμη με τη δικλοφενάκη (Boukhary et al. 2016).

Μελέτη που έγινε σε μεθανολικό εκχύλισμα *Salvia fruticosa*, απέδειξε ότι η αντιοξειδωτική του δράση συσχετίζεται με την συνολική περιεκτικότητα των φαινολών που περιέχει (Parageorgiou et al. 2008).

21 δείγματα φυτών συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ιορδανίας και χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας και τον υπολογισμό του περιεχομένου τους σε ολικές πολυφαινόλες. Το επίπεδο αντιοξειδωτικής δραστηριότητας προσδιορίστηκε με αναλύσεις DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) και ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)) σε σχέση με το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο της εκάστοτε δρόγης. Η συνολική φαινολική περιεκτικότητα στα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα, κυμάνθηκε από 6,6 έως 103,0 και από 3,0 έως 98,6 GAE (ισοδύναμο γαλλικού οξέος) mg/g βάρους της αποξηραμένης δρόγης, αντίστοιχα. Τα DPPH-TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) των εκχυλισμάτων μεθανόλης κυμαίνονταν από 4,1 έως 365,0 mg/g βάρους της αποξηραμένης δρόγης έναντι 0,6 έως 267,0 mg/g στα υδατικά εκχυλίσματα. Επιπλέον, οι μέσες τιμές των ABTS-(IC50) κυμάνθηκαν από 6,9 έως 400,0 μg/mL ABTS σε εκχυλίσματα μεθανόλης έναντι 9,8 έως 580,5 μg/mL σε υδατικά εκχυλίσματα. Σύμφωνα με την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, τα φυτά χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες: υψηλή (DPPH-TEAC \geq 80 mg/g), όπως το περικάρπιο της *Punica granatum* L. κ.α, μέτρια (DPPH-TEAC από 20 έως 80 mg/g), όπως η *Salvia fruticosa*, *Thymus capitatus* κ.α, και χαμηλή (DPPH-TEAC $<$ 20 mg/g) όπως το *Teucrium polium* κ.α. (Al-Mustafa et al. 2008).

Σε καλλιεργημένα ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα 293 (HEK 293) διερευνήθηκε ο ρόλος του υδατικού εκχυλίσματος των αποξηραμένων φύλλων της *Salvia fruticosa* στη μείωση τόσο της ενδογενούς κυτταρικής όσο και της προκαλούμενης από H_2O_2 οξείδωσης του DNA. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το φυτικό εκχύλισμα προστατεύει τόσο από την H_2O_2 -επαγόμενη, όσο και από την ενδογενή κυτταρική οξείδωση του DNA στα κύτταρα HEK 293 (Hani et al. 2014).

Ε. Αντιμικροβιακή δράση

Αρκετά είδη *Salvia* είναι ενδημικά στην Ιορδανία και χρησιμοποιούνται ευρέως σε ποτά, ως μπαχαρικά αλλά και για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Οι Al-Bakri et. al., μελέτησαν την αντιβακτηριακή και την αντιμυκητιασική δράση των αιθανολικών εκχυλισμάτων (υπέργεια αποξηραμένα τμήματα των φυτών σε αιθανόλη 70°) 7 ειδών *Salvia*, *S. ceratophylla* L., *S. dominica* L., *S. hierosolymitana* Boiss, *S. indica* L., *S. syriaca* L., *S. triloba* L., και *S. verbenaca* L., καθώς και του αιθερίου ελαίου *S. triloba* L. έναντι των: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* και δύο κλινικά στελέχη *S. aureus* ανθεκτικού στη μεθικιλίνη (MRSA). Το αιθανολικό εκχύλισμα *S. triloba* L. έδειξε την υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση και ήταν το μόνο

δραστικό έναντι του *S. aureus* και του MRSA (λιγότερο δραστικό) από όλα τα είδη *Salvia* που εξετάστηκαν (ελάχιστη βιοκτόνος συγκέντρωση για *S. aureus*: 1,0±0,35 mg/mL). Η δραστικότητα του πιητικού ελαίου *S. triloba* ήταν υψηλότερη από εκείνη του εκχυλίσματος αιθανόλης. Το πιητικό έλαιο επέδειξε αντιμικροβιακή δράση που καλύπτει όλους τους δοκιμασμένους μικροοργανισμούς με εξαίρεση την *P. aeruginosa*. Τόσο το αιθανολικό εκχύλισμα *S. triloba* (2,5 mg/mL) όσο και το αιθέριο έλαιο (0,1%) έδειξαν δόσοξεαρτώμενη αντι-προσκολλητική δράση έναντι της *E. coli* (66,7% και 76,0%, αντίστοιχα) αλλά όχι κατά των *P. aeruginosa* και *C. albicans*. Το αιθανολικό εκχύλισμα έδειξε αντι-biofilm δράση έναντι του *S. aureus* (60,9%) και ενός από τα στελέχη του MRSA (37,2%) ενώ το αιθέριο έλαιο δεν εμφάνισε αντίστοιχη δράση έναντι αυτών των στελεχών. Η αντιμικροβιακή δράση των άλλων δοκιμαζόμενων ειδών *Salvia* ήταν αμελητέα (Al-Bakri et al. 2010).

Οι παθογόνοι μύκητες των φυτών θεωρούνται σημαντικής οικονομικής σημασίας για την αρνητική επίδραση τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά στα φρέσκα και μεταποιημένα προϊόντα. Διάφορα εκχυλίσματα της *S. fruticosa* εξετάστηκαν για την πιθανή αντιμυκητιακή δράση τους. Το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα ήταν το πλέον δραστικό και αναλύθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας HPLC-SPE-NMR. Οι μεταβολίτες: ισπιδουλίνη, σαλβιγενίνη, καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη και 12-μεθοξυκαρνοσικό οξύ, αναγνωρίστηκαν ως τα κύρια συστατικά του εκχυλίσματος. Η αντιμυκητιακή δράση του ολικού εκχυλίσματος και επιλεγμένων φυτοχημικών εκτιμήθηκε έναντι των ειδών *Aspergillus tubingensis*, *Botrytis cinerea* και *Penicillium digitatum*. Οι εκτιμώμενες τιμές MIC και MFC του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα της *S. fruticosa* Mill., καθώς και των τριών κύριων συστατικών τους, δηλαδή το καρνοσικό οξύ, η καρνοσόλη και η ισπιδουλίνη, υποστηρίζουν την αντιμυκητιασική δράση τους, ιδιαίτερα έναντι του *B. cinerea* και *P. digitatum* και την πιθανή χρήση τους στα τρόφιμα και γεωργικά συστήματα (Exarchou et al. 2015).

Τα υδατικά εκχυλίσματα (15 mg/mL, υπέργεια αποξηραμένα τμήματα των φυτών) από 22 φυτά που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική στην Παλαιστίνη, διερευνήθηκαν για την αντιμυκητιασική τους δράση υπολογίζοντας τις ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs) έναντι 9 απομονωμένων στελεχών των *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* και *Trichophyton violaceum*, που ενοχοποιούνται για την ζωνόση tineae capitis. Η *S. fruticosa* Mill. ήταν δραστική έναντι όλων των ειδών δερματόφυτων που ελέγχθηκαν. Ειδικότερα έναντι του *M. canis* παρουσίασε μέσο ποσοστό μυκηλιακής αναστολής 82,1%, έναντι του *T. mentagrophytes* και *T. violaceum* 62,5% και 100% αντίστοιχα (ως φάρμακο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η γκριζοφουλβίνη) (Ali-Shtayeh et al. 1999).

Z. Επίδραση επί των λειών μυϊκών ινών

Η *S. fruticosa* (SF) χρησιμοποιείται παραδοσιακά για την αντιυπερτασική της δράση. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για το μηχανισμό αυτής της φαρμακολογικής δράσης. Για το λόγο αυτό ερευνήθηκε η επίδραση του ξηρού αιθανολικού (70°) εκχυλίσματος των αποξηραμένων φύλλων SF σε δακτυλίους απομονωμένης θωρακικής αορτής αρουραίων Sprague-Dawley. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με άθικτο ενδοθήλιο το εκχύλισμα SF αύξησε την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου

(NO) και επιτεύχθηκε χάλαση του δακτυλίου με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -1 mg/mL). Επίσης, η μέγιστη αρτηριακή χάλαση (R_{max}) μειώθηκε σημαντικά με την αποδυναμωση του ενδοθηλίου. Η προεργασία ακέραιων δακτυλίων ενδοθηλίου με L-NAME (έναν μη εκλεκτικός αναστολέας της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου, 100 μM) ή με ODQ (έναν αναστολέας της διαλυτής γουανυλοκυκλάσης, 10 μM) μείωσε σημαντικά την αγγειοδιαστολή που προκύπτει μετά την επίδραση της SF. Επιπλέον, το εκχύλισμα SF προκάλεσε τη φωσφορυλίωση του Akt καθώς και αυξημένα επίπεδα cGMP σε δακτυλίους που υποβλήθηκαν σε αγωγή με αυξανόμενες δόσεις SF. Προηγούμενη έκθεση σε αναστολείς PI3K όπως wortmannin (0.1 μM) ή LY294002 (10 μM), μείωσε τη συσσώρευση του cGMP και εξασθένησε την προκαλούμενη από SF αγγειοχάλαση κατά περίπου 50% (R_{max}). Η χάλαση που προκαλείται από το εκχύλισμα SF δεν επηρεάστηκε από την ινδομεθακίνη, την βεραπαμίλη, την γλιβενκλαμίδη, το τετρααιθυλαμμώνιο, την πυριλαμίνη ή την ατροπίνη. Λαμβανόμενα μαζί, τα αποτελέσματά δείχνουν ότι το SF επάγει την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή, μέσω της οδού σηματοδότησης PI3K/Akt/eNOS/NO/sGC/cGMP. Σύμφωνα με τα δεδομένα της μελέτης η κατανάλωση SF μπορεί να λειτουργήσει ως αντι-υπερτασικό μέσο για τη μείωση των καρδιαγγειακών επιπλοκών (Anwar et al. 2017).

H. Δράσεις επί του μεταβολισμού

Ένα έγχυμα 10% των αποξηραμένων φύλλων της *S. fruticosa* παρασκευασμένο σύμφωνα με τις οδηγίες της επίσημης Ιταλικής φαρμακοποιίας του 1985, δοκιμάστηκε, από του στόματος, σε δόση 2,5 mL/Kg (που αντιστοιχεί σε 0,250 g/kg, γραμμάρια αποξηραμένης δρόγης/Kg βάρους σώματος), σε υγιή κουνέλια και σε κουνέλια που έγιναν υπεργλυκαιμικά με χορήγηση αλλοξάνης. Η εφάπαξ χορήγηση *per os* των 2,5 mL/Kg βάρους σώματος, στα υγιή και υπεργλυκαιμικά κουνέλια, δεν έδειξε καμία διαφορά στην γλυκαιμία και των δύο ομάδων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, η συγκεκριμένη δόση *per os*, μία φορά την ημέρα για 7 συνεχόμενες ημέρες, προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των υπεργλυκαιμικών κουνελιών, χωρίς καμία επίδραση στις τιμές γλυκαιμίας των υγιών ζώων που είχα αρχικά κανονικές τιμές γλυκαιμίας. Ύστερα από 18 ώρες νηστείας, χορηγήθηκε γλυκόζη, 1 g/Kg βάρους σώματος, από το στόμα στα πειραματόζωα (και στις δύο ομάδες), και ταυτόχρονα μια εφάπαξ δόση (2,5 mL/Kg) *per os* του εγχύματος της *S. fruticosa*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το φυτικό έγχυμα άσκησε υπογλυκαιμική δράση τόσο στα υγιή κουνέλια, όσο και στα υπεργλυκαιμικά κουνέλια. Ωστόσο, σε αυτά τα ζώα το έγχυμα *S. fruticosa* δεν τροποποίησε τα επίπεδα ινσουλίνης στο πλάσμα. Επιπλέον, η υπογλυκαιμική δράση του εγχύματος δεν παρουσιάστηκε σε κουνέλια που έλαβαν το ίδιο φορτίο γλυκόζης ενδοφλεβίως, 30 λεπτά μετά την εφάπαξ χορήγηση *per os* (2,5 mL/Kg) του εγχύματος της *S. fruticosa*. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν τους συγγραφείς στη διαπίστωση ότι η *S. fruticosa* ασκεί υπογλυκαιμική δράση μειώνοντας κυρίως την εντερική απορρόφηση γλυκόζης (Perfumi et al. 1991).

Σε μελέτη που έγινε *in vivo* σε αρουραίους, με έγχυμα του αποξηραμένου υπέργειου τμήματος της *S. triloba* (SFT) (2 g δρόγης σε 150 mL βραστό νερού για 5 λεπτά) και του κύριου συστατικού του, ροσμαρινικού οξέος (RA), ερευνήθηκαν τα

επίπεδα του εντερικού Na^+ /γλυκόζης συν-μεταφορέα-1 (SGLT1), του μεταφορέα γλυκόζης 2 και του παρόμοιο με το γλυκαγόνο πεπτιδίο-1 (GLP-1). Για το λόγω αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο μοντέλα επαγωγής SGLT1 σε αρουραίους: μέσω επαγωγής του διαβήτη με στρεπτοζοτοκίνη (STZ) και μέσω διατροφής με υδατάνθρακες. Το πόσιμο νερό αντικαταστάθηκε με SFT ή RA και υπολογίστηκαν οι παράμετροι του αίματος, το γλυκογόνο ήπατος και τα επίπεδα διαφόρων πρωτεϊνών στα κύτταρα του εντέρου. Δύο εβδομάδες θεραπείας με SFT σταθεροποίησαν τα επίπεδα γλυκόζης αίματος νηστείας σε διαβητικά ζώα STZ. Η αύξηση του SGLT1 που εντοπίστηκε στην μεμβράνη των εντερικών λαχνών (BBM brush-border membrane) που προκαλείται από τη χορήγηση STZ, μειώθηκε σημαντικά με τη θεραπεία με SFT, χωρίς σημαντικές μεταβολές στα συνολικά επίπεδα κυτταρικών πρωτεϊνών μεταφοράς. Δεν παρατηρήθηκαν επιδράσεις στον μεταφορέα γλυκόζης 2, στην αντλία Na^+/K^+ -ATPase ή στα επίπεδα του GLP-1 από το SFT. Επιπλέον, το SFT και το RA για 4 ημέρες αναστέλλουν σημαντικά την επαγόμενη από υδατάνθρακες προσαρμοστική αύξηση της SGLT1 στο BBM. Συνεπώς, τόσο το έγχυμα όσο και το RA ρυθμίζουν τον εντερικό συν-μεταφορέα-1 της γλυκόζης (SGLT1), συμβάλλοντας έτσι στον έλεγχο της γλυκόζης στο πλάσμα (Azevedo et al. 2011).

Η *S. fruticosa* είναι ένα από τα φαρμακευτικά φυτά που χρησιμοποιούνται στο παραδοσιακό ιατρικό σύστημα της Ιορδανίας για τη θεραπεία των συμπτωμάτων διαβήτη (Al-Mustafa et al. 2008).

Σε μια εκτεταμένη εθνοβοτανική έρευνα των φαρμακευτικών φυτών του Ισραήλ, βρέθηκαν να χρησιμοποιούνται για υπογλυκαιμικές θεραπείες 16 είδη φυτών, εκ των οποίων και η *Salvia fruticosa*, με τη μορφή εγχύματος των αποξηραμένων φύλλων της (Yaniv et al. 1987).

Η *Salvia libanotica* (συνώνυμο *S. fruticosa*) είναι ένα συχνά χρησιμοποιούμενο βότανο στην παραδοσιακή ιατρική στον Λίβανο και τη Μέση Ανατολή. Οι Bassil et al., (2015) εξέτασαν την πιθανή θεραπευτική χρήση της *S. libanotica* στο μεταβολισμό της γλυκόζης και αξιολόγησαν την επίδραση της στη λιπαιμία και το κοιλιακό λίπος. Για το λόγω αυτό χρησιμοποιήθηκαν μια ομάδα ελέγχου και τρεις πειραματικές ομάδες (GI, GII και GIII) αρουραίων, που τράφηκαν με διαίτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Οι πειραματικές ομάδες έλαβαν αυξανόμενες δόσεις του λυοφιλοποιημένου υδατικού εκχυλίσματος των αποξηραμένων φύλλων της *S. libanotica* σε πόσιμο νερό (50, 150 και 450 mg/kg λυοφιλοποιημένου εκχυλίσματος/βάρους σώματος αντίστοιχα) για 6 εβδομάδες. Η αρχική αναλογία σε βάρος μεταξύ αποξηραμένης δρόγης και ύδατος ήταν 6,5 g δρόγης/100 g βραστό ύδατος. Η διάρκεια έγχυσης ήταν 30 min. Η λυοφιλοποίηση του εγχύματος απέδωσε 8,3% β/β βάρους αποξηραμένης δρόγης. Η πρόσληψη εκχυλίσματος *S. libanotica* συσχετίστηκε με σημαντική μείωση στη γλυκόζη ορού νηστείας ($102,9 \pm 10,8$ σε GII και $87,5 \pm 6,4$ σε GIII έναντι $152,1 \pm 7,9$ mg/dl στους μάρτυρες) και με διπλάσια αύξηση στην ινσουλίνη ορού νηστείας (GIII) και στην περιεκτικότητα γλυκογόνου στο ήπαρ (GII και GIII). Η ομάδα III είχε επίσης καλύτερη ανοχή στη γλυκόζη μετά από ενδοπεριτοναϊκές προκλήσεις γλυκόζης (ένεση 300 g γλυκόζης/L σε φυσιολογικό αλατούχο διάλυμα σε δόση 5,83 mL/kg βάρους σώματος, σε αρουραίους νηστικούς για 3 ώρες). Επιπλέον, με την πρόσληψη του φυτικού εκχυλίσματος επιτεύχθηκε

σημαντική βελτίωση στην HDL ορού (34,4±2,4 στο GIII έναντι 27,2±1,9 mg/dl στους μάρτυρες) και στην αναλογία HDL/LDL χοληστερόλης (2,79±0,32 σε GII και 3,02±0,31 σε GIII έναντι 1,74±0,18 στους μάρτυρες), καθώς και στην μείωση του κοιλιακού λίπους. Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που δείχνει ότι η χρόνια πρόσληψη εγχύματος της *S. libanotica* βοηθά στην πρόληψη της υπεργλυκαιμίας και της δυσλιπιδαιμίας που προκαλούνται από την υψηλή πρόσληψη λιπαρών. Η ασφάλεια του φυτού επιβεβαιώθηκε περαιτέρω όταν μια ξεχωριστή ομάδα αρουραίων επέζησε κατόπιν αυξητικών χορηγήσεων *per os* του φυτικού εκχυλίσματος φθάνοντας τα 8000 mg/kg σωματικού βάρους. Συνεπώς, υποστηρίζεται ότι η χρήση του φυτού ως δυνητική προσέγγιση στην πρόληψη διαβήτη τύπου 2 και εν γένει καρδιαγγειακών παθήσεων.

Θ. Ανοσοποιητικό σύστημα

Μελέτη που έγινε *in vivo* σε BALB/c ποντικούς έδειξε ότι το υδατικό εκχύλισμα (αφέψημα) των φύλλων της *S. libanotica* (συνώνυμο *S. fruticosa*) είναι σε θέση να ενεργοποιήσει τα μακροφάγα κύτταρα και τα κύτταρα T helper-1 (Th-1) και να αυξήσει την έκφραση των γονιδίων των προφλεγμονωδών κυτοκινών IL-12 και της IFN-γ (Ghaoui et al. 2008).

I. Αντιφλεγμονώδης δράση

Οι El-Sayed et al., (2006), εξέτασαν σε αρουραίους Wistar, την αντιφλεγμονώδη και ελκογόνο δράση 4 ξηρών εκχυλισμάτων των αποξηραμένων φύλλων της *Salvia triloba*: χλωροφορμίου (απόδοση: 6,75%), αιθανόλης (απόδοση: 4%), βουτανόλης (απόδοση: 1%) και ύδατος (απόδοση: > 20%). Όλα τα εκχυλίσματα χορηγήθηκαν *per os* στους αρουραίους σε δόση 25 mg/kg σωματικού βάρους, ενώ ως μέτρο σύγκρισης χρησιμοποιήθηκε η δικλοφαινάκη στα 10 mg/kg σωματικού βάρους. Εξετάστηκε τόσο η οξεία όσο και η χρόνια αντιφλεγμονώδης δράση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης το εκχύλισμα χλωροφορμίου ήταν το πιο δραστικό στο πείραμα πελματικού οιδήματος επαγόμενο από καραγενάνη (οξεία αντιφλεγμονώδης δράση), και ακολουθούσαν κατά σειρά το βουτανολικό, το υδατικό και τέλος το αιθανολικό εκχύλισμα. Την ίδια σειρά δραστικότητας είχαν τα εκχυλίσματα και όσον αφορούσε το cotton pellet granuloma (χρόνια αντιφλεγμονώδης δράση). Η σύγκριση με την δικλοφαινάκη, έδειξε ότι η τελευταία ήταν πιο δραστική από όλα τα εκχυλίσματα της *S. triloba* και στα δύο πειράματα. Η ελκογόνος δράση όλων των εκχυλισμάτων της *S. triloba* ήταν κατά πολύ μικρότερη από αυτή της δικλοφαινάκης. Η ελκογόνος δράση των εκχυλισμάτων και της δικλοφαινάκης, συγκρίθηκε με αυτή που προκαλείται από την χορήγηση *per os* 1mg/Kg βάρους σώματος του ακετυλοσαλικυλικού οξέος. Όσον αφορά τα εκχυλίσματα της *S. triloba*, η φθίνουσα σειρά της ελκογόνου δράσης, είχε ως εξής: βουτανολικό (2,4±0,1) > χλωροφορμικό (1,3±0,2) > υδατικό (1,2±0,1) > αιθανολικό (0). Η δικλοφαινάκη είχε τιμή 12,3±2,1 (οι τιμές αναφέρονται ως δείκτης έλκους ± τυπική απόκλιση). Στην μελέτη πήραν μέρος 10 αρουραίοι από κάθε ομάδα.

1.1.1.4.3 Κλινικά στοιχεία

Η τοπική εφαρμογή εκχυλίσματος φύλλων *S. fruticosa* Mill. με την μορφή κρέμας (Λ/Ν), έδειξε ότι ήταν αποτελεσματική σε ασθενείς με κοινή ψωρίαση (psoriasis vulgaris), σταγονοειδής ψωρίαση (guttate psoriasis) και σημηματορροϊκή δερματίτιδα (Kallimanis 2017, Kallimanis et al. 2021a, 2021b, 2021c).

1.1.1.5 Τοξικότητα

Η πιθανή αναπαραγωγική τοξικότητα της *Salvia fruticosa* διερευνήθηκε σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους μετά την κατάποση υδατικών και αιθανολικών εκχυλισμάτων των φύλλων του φυτού. Η λήψη 200, 400 και 800 mg/kg σωματικού βάρους υδατικού ή 400 mg/kg σωματικού βάρους αιθανολικού εκχυλίσματος της *S. fruticosa* από την 1^η -70^{ης} ημέρας εγκυμοσύνης θηλυκών αρουραίων δεν προκάλεσε ανεπάρκεια κύησης. Ωστόσο, η κατάποση ενός αιθανολικού εκχυλίσματος μείωσε τον αριθμό των βιώσιμων εμβρύων και αύξησε τον αριθμό των απορροφήσεων στις έγκυες αρουραίους. Η λήψη υδατικού εκχυλίσματος (800 mg/kg σωματικού βάρους) ή αιθανολικού εκχυλίσματος (400 mg/kg σωματικού βάρους) της *S. fruticosa* για 30 διαδοχικές ημέρες από ενήλικες θηλυκούς αρουραίους, δεν είχε καμία επίδραση στην εμφάνιση εγκυμοσύνης. Ωστόσο, η κατάποση αυτών των εκχυλισμάτων μείωσε τόσο τον αριθμό των εμφυτευμάτων όσο και τα βιώσιμα έμβρυα και αύξησε τον αριθμό των απορροφήσεων στις έγκυες. Η λήψη υδατικού εκχυλίσματος (800 mg/kg σωματικού βάρους) ή αιθανολικού εκχυλίσματος (400 mg/kg σωματικού βάρους) της *S. fruticosa*, για 30 διαδοχικές ημέρες, από ενήλικες αρσενικούς αρουραίους δεν είχε καμία επίδραση στον αριθμό των θηλυκών που γονιμοποιήθηκαν από αυτά τα αρσενικά. Ωστόσο, ο αριθμός των εμφυτευμάτων και των βιώσιμων εμβρύων μειώθηκε ενώ ο αριθμός των απορροφήσεων αυξήθηκε στα θηλυκά που γονιμοποιήθηκαν από αρσενικά που έλαβαν είτε υδατικά, είτε αιθανολικά εκχυλίσματα της *S. fruticosa*. Από την άλλη πλευρά, η προγεννητική έκθεση των απογόνων αρσενικών και θηλυκών αρουραίων που έλαβαν 400 mg/kg σωματικού βάρους αιθανολικού εκχυλίσματος *S. fruticosa* δεν είχε καμία επίδραση στο χρόνο καθόδου των όρχεων και του ανοίγματος του κόλπου, αντίστοιχα. Από τα πειράματα αυτά φαίνεται ότι η κατάποση της *S. fruticosa* μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιδράσεις στη γονιμότητα των αρσενικών και θηλυκών αρουραίων (Al-Hamood et al. 1998).

Η *per os* χορήγηση λυοφιλοποιημένου εγχύματος *S. fruticosa*, σε δόση 8000 mg/kg σε αρουραίους ήταν καλά ανεκτή χωρίς να προκαλέσει κάποιο πρόβλημα στην υγεία τους. Η αρχική αναλογία σε βάρος μεταξύ αποξηραμένης δρόγης και διαλύτη ήταν 6,5 g δρόγης/100 g βρασμένου ύδατος. Η διάρκεια έγχυσης ήταν 30 λεπτά. Η λυοφιλοποίηση του εγχύματος απέδωσε 8,3% β/β βάρους αποξηραμένης δρόγης (Bassil et al. 2015).

Δεδομένα κλινικής ασφάλειας για τη *Salvia fruticosa* απουσιάζουν. Για το λόγο αυτό η *Salvia fruticosa* δεν πρέπει να συνιστάται για *per os* χρήση σε παιδιά και εφήβους κάτω των 18 ετών όπως και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας (Barnes et al. 2007).

1.1.1.6 Φαρμακευτικές μορφές: ενδείξεις και δοσολογία

Πίνακας 2

Επισκόπηση της παραδοσιακής χρήσης της *Salvia fruticosa* Mill.

Παραδοσιακή χρήση	Φαρμακευτική μορφή	Αναφορά
Διαταραχές του πεπτικού συστήματος. Δυσπεψία	Έγχυμα ή αφέψημα <i>per os</i> . Ένα φλιτζάνι μετά από γεύματα. 1-1,5 g αποξηραμένης δρόγης, ως έγχυμα, σε 150 mL νερού, μια ή περισσότερες φορές την ημέρα.	Rivera et al. 1994, Dokos et al. 2009, ESCOP 2014 (αναφέροντας τους Stahl-Biskup 2008 και Böhme 2010)
Φλεγμονές και λοιμώξεις του στόματος και του λαιμού	Έγχυμα, 3-4 g / 100 mL νερού για πλύσεις του στόματος ή για γαργάρες.	ESCOP 2014 (αναφέροντας τον Stahl-Biskup 2008 και Böhme 2010) Proença da Cunha 2008
Φλεγμονές και λοιμώξεις του βλεννογόνου	Έγχυμα ή αφέψημα, 3 - 4 g / 100 mL νερού. Τοπική εφαρμογή για πλύσεις ή ως κατάπλασμα.	Proença da Cunha 2008
Ανακούφιση κεφαλαλγίας	Έγχυμα για χρήση <i>per os</i> . Δεν καθορίζεται η δοσολογία	Rivera et al. 1994
Ως διουρητικό	Έγχυμα ή αφέψημα για χρήση <i>per os</i> . Δεν καθορίζεται η δοσολογία	Rivera et al. 1994
Ως ηρεμιστικό	Έγχυμα ή αφέψημα για χρήση <i>per os</i> . Δεν καθορίζεται η δοσολογία	Rivera et al. 1994
Υπογλυκαιμική δράση	Έγχυμα για χρήση <i>per os</i> . Ένα φλιτζάνι κάθε πρωί.	Dokos et al. 2009

1.1.2 *Salvia officinalis* L. (Κοινό φασκόμηλο, Common Sage)

1.1.2.1 Δρογοβοτανική

Πολυετής θάμνος 30-50 εκατοστών, πολύκλαδος, αρωματικός, με φύλλα λογχοειδή ή προμήκη, παχιά, ισχυρώς ρικνά, λεπτοφυώς οδοντωτά ή πριονωτά, χνουδωτά, πράσινα ή τέφρα. Άνθη από το Μάιο μέχρι τον Ιούλιο, μεγάλα ανά 3-6 σπονδύλους αραιούς που σχηματίζουν απλό βότρυ. Βράκτεια ωσειδή, οξέα, εύπρωτα.



Εικόνα 3

Αποκία καλλιεργημένου φυτού *Salvia officinalis* L. (φωτογραφία Βοτανικού κήπου Διομήδους ΕΚΠΑ)

Ο κάλυκας είναι χνουδωτός με 17 νευρώσεις, δίχειλος, με το άνω χείλος τριοδοντωτό, με οδόντας λογχοειδείς μακροαίχμιους. Η στεφάνη έχει 2-3 εκατοστά μήκος, 2 με 3 φορές μικρότερη του κάλυκα, κυανοϊώδης, ο δε σωλήνας φέρει εσωτερικά δακτύλιο τριχών, και άνω χείλος σχεδόν ευθύ, επίπεδο. Το βρίσκουμε σε χέρσους, ξηρούς, πετρώδεις τόπους. Είναι γνωστή ως αλιφασκιά, αλισφακιά, ελελίφασκος του Διοσκουρίδη. Η *Salvia officinalis* προέρχεται από την περιοχή της Μεσογείου, ειδικά στην περιοχή της Αδριατικής και καλλιεργείται σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες. Το εμπορικό υλικό προέρχεται από χώρες της ΝΑ Ευρώπης (Καββαδάς 1936, Grdisa 2015).



Εικόνα 4

Λεπτομέρεια ανθών *Salvia officinalis* L. (φωτογραφία Βοτανικός κήπος Διομήδους ΕΚΠΑ)

1.1.2.2 Δρογοϊστορία

Το όνομα *Salvia* προέρχεται από το λατινικό ρήμα "*salvere*" (που σημαίνει θεραπεύω, σώζω) και σχετίζεται με το *salus* (υγεία, ευεξία, ευημερία ή σωτηρία). Το όνομα του είδους, *officinalis* (=φαρμακευτικός) αναφέρεται στην ιστορική θεραπευτική χρήση του. Προέρχεται από τη λατινική λέξη *officina* που σημαίνει κατάστημα βοτάνων ή φαρμακείο. Το είδος *Salvia officinalis* ονομάστηκε έτσι από τον Κάρολο Λινναίο (1707 μ.Χ.-1778 μ.Χ.), ιατρό, βοτανολόγο, ζωολόγο, πατέρα της διωνυμικής ονοματολογίας των ειδών (Dweck 2000). Η σάλβια υπήρξε ένα σημαντικό φαρμακευτικό φυτό από τους αρχαίους χρόνους. Είχε τη φήμη ότι είναι βότανο που απομακρύνει τα κακά πνεύματα. Τα ισχυρά μυρωδικά φυτά χρησιμοποιούνται, από το μακρινό παρελθόν έως σήμερα, συχνά για σκοπούς τελετουργίας και προστασίας. Θεωρήθηκε αποτελεσματικό κατά του δαγκώματος των φιδιών (Ceres 1984). Επίσης σύμφωνα με τους αρχαίους ανακούφιζε από την κόπωση και βελτιώνει την συνολική υγεία του οργανισμού (Panda 2009). Στην αρχαία Αίγυπτο χρησιμοποιήθηκε για να αυξήσει τη γονιμότητα των γυναικών (Schauenberg and Paris 1990). Είναι πιθανό η *Salvia* στην αρχαία Αίγυπτο να χρησιμοποιήθηκε για θεραπεία παθήσεων του στομάχου, πονόδοντου και άσθματος. Καταχωρήθηκε στον Πάπυρο Ebers (1500 π.Χ.) ως φάρμακο για τον κνησμό (φαγούρα) (<https://www.avogel.com/plant->

encyclopaedia/salvia_officinalis.php). Πιθανά να διαδόθηκε η χρήση του από την αρχαία Αίγυπτο στους υπόλοιπους λαούς μέσω των Ρωμαίων (Onlooker 1995).

Ο πατέρας της ιατρικής Ιπποκράτης (460π.Χ.- 370π.Χ.), το πρότεινε ως φάρμακο κατά του βήχα, ως διουρητικό, ως επουλωτικό πληγών και ελκών, αλλά και για τη διατήρηση των δοντιών (Panda 2009).

Ο Θεόφραστος (371 π.Χ. - 287 π.Χ.), πατέρας της βοτανικής, στο έργο του “Περί φυτῶν ἱστορία” διακρίνει δύο είδη φασκόμηλου: στο ένα έδωσε το όνομα σφάκος, και στο άλλο που μοιάζει με το πρώτο, το ονόμασε ελελίσφακος: “Σφάκος δε και ελελίσφακος διαφέρουσιν ὡσάν το μεν ἡμερον, το δε ἀγριον. Λειότερον γαρ το φύλλον του σφάκου και ἔλαττον και αιχημηρότερον, το δε του ελελίσφακου τραχύτερον” (Θεόφραστος, Περί φυτῶν ἱστορίας).

Ο Γάιος Πλίνιος Σεκούνδος (Gaius Plinius Secundus 23 μ.Χ.- 79 μ.Χ.) γνωστότερος ως Πλίνιος ο Πρεσβύτερος, ήταν ο πρώτος συγγραφέας που χρησιμοποίησε τον όρο “*Salvia*”. Στο έργο του “Φυσική Ιστορία” (λατ. *Naturalis historia* ή και *Historia naturalis*) όπου αναφέρει ότι το βότανο που ο Θεόφραστος ονομάζει ελελίσφακο, οι Ρωμαίοι το αποκαλούν *Salvia* (Σάλβια) και το περιγράφει ως αρωματικό φυτό με χρώμα τέφρας, ομοιάζων της μίνθης, που καλλιεργείται περισσότερο από το σφακό του Θεόφραστου, και χρησιμοποιείται ως διουρητικό, για την προαγωγή της εμμήνου ρύσεως, ως τοπικό αναισθητικό (μουδιάζει, αναισθητοποιεί την επιφάνεια του δέρματος όπου εφαρμόζεται) και ως στυπτικό. Επίσης, όταν λαμβάνεται μαζί με αμυθιά αντιμετωπίζει τη δυσεντερία (Pliny, the elder 1951).

Ο Διοσκουρίδης ο Πεδάνιος ή Αναζαρβεύς (περίπου 10 μ.Χ.- 90 μ.Χ.), πατέρας της φαρμακολογίας, αναφέρει σχετικά τα εξής: “Ελελίσφακον. Οι δε ελαφοβόσκον, οι δε σφάγγον. [...] Ούρα άγει πινόμενον και έμμηνα και έμβρυα κατασπών και τρυγόνος πληγαίας αρήγειν, μελαίνει δε και τρίχας και τραυματική και ισχαιμος και αυτοκαθαρτική των θηριωδών ελκών έστι. Παύει δε συν οίνω το αφέψημα των φύλλων και των κλάδων αυτής προσκλυζόμενον κνησμούς τους περί τα αιδοία”. (Διοσκουρίδης, Περί ύλης ιατρικής III, 33). Επίσης μνημονεύει τον “ελελίσφακίτην οίνον” και τις χρήσεις αυτού: “Ελελίσφακίτης (οίνος) ομοίως. Ελελίσφακου ο εις γλεύκους αμφορέα, ο έστι κεράμιον, κάθες. Ποιεί δε προς νεφρών πόνους και κύστεως και πλευρών, αίματος αναγωγάς, βηχί, ρήγμασι, σπέρμασι, θλάσμασιν, εμμήνοις εστεγνωμένοις” (Διοσκουρίδης, Περί ύλης ιατρικής, V, 61).

Ο Κλαύδιος Γαληνός (130 μ.Χ.-210 μ.Χ.), ο δεύτερος σπουδαιότερος Έλληνας ιατρός της αρχαιότητας μετά τον Ιπποκράτη, συνέστησε το φασκόμηλο ως αιμοστατικό, διουρητικό, τονωτικό και εμμηναγωγό (Dweck 2000).

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω το είδος φασκόμηλου που καλλιεργήθηκε κάτω από αυτά τα διαφορετικά ονόματα είναι το *Salvia officinalis* L. (Dweck A.C. 2000).

Η *Salvia officinalis* εμφανίζεται στο “Capitulare de villis” του Καρλομάγνου (Charlemagne, 747 μ.Χ.-814 μ.Χ., γνωστός και ως Κάρολος ο Μέγας, Carolus ή Karolus Magnus, βασιλιάς των Φράγκων) που υπαγόρευε να καλλιεργείται το φασκόμηλο στους αγρούς όπως επίσης και στους κήπους μοναστηριών (Dweck 2000), γεγονός που τηρείται και σήμερα, αφού το φασκόμηλο υπάρχει υποχρεωτικά σε όλα τα καθολικά μοναστήρια (Tucakov et al. 1990).

Ένα αγγλοσαξονικό χειρόγραφο αναφέρει “γιατί ο άνθρωπος πρέπει να πεθάνει όταν έχει φασκόμηλο;”. Οι Ρωμαίοι το ονόμαζαν “ιερό φυτό” και οι γιατροί της σχολής του Σαλέρνο (11^ο και 12^ο αιώνας μ.Χ.) πίστευαν ότι “όποιος έχει στο σπίτι του φασκόμηλο δεν φοβάται το θάνατο” (Grieve 1984).

Ανάμεσα στους αρχαίους και σε όλη τη διάρκεια του Μεσαίωνα το φασκόμηλο είχε μεγάλη φήμη. Ο στίχος "*Salvia salvatrix, naturae conciliatrix*"-"Σάλβια, εσύ θεραπευτής, μεσολαβητής με τη φύση"- προήλθε επίσης από την εξαιρετικά σεβαστή Ιατρική Σχολή του Σαλέρνο. Αντίστοιχα με το ρητό της ιατρικής του Σαλέρνο υπάρχει μια Αγγλική παροιμία που λέει: “όποιος δεν θέλει να πεθάνει να φάει φασκόμηλο το Μάιο”, η οποία μοιάζει με μια άλλη από τη Γερμανία, στην οποία παρεμπιπτόντως υπάρχουν πολλές παροιμίες για το φασκόμηλο: “για ιδανικά γηρατειά, να τρώτε φασκόμηλο τον Μάιο “ (Grieve 1984).

Στον Μεσαίωνα το χρησιμοποιούσαν κατά της δυσκοιλιότητας, της χολέρας, των κρυολογημάτων, των πυρετών, σε προβλήματα του ήπατος και στην επιληψία (Μπαζαίος 2013).

Άγγλοι βοτανολόγοι πίστευαν ότι η κατάσταση του φασκόμηλου στον κήπο τους προέλεγε την καλή ή κακή έκβαση των εργασιών τους. Επίσης, υπήρχε η δοξασία ότι το φυτό παρουσιάζει ανάπτυξη σε κήπους μητριαρχικών οικογενειών, για αυτό και συχνά οι σύζυγοι φρόντιζαν να κλαδεύουν το φασκόμηλο! (Grieve 1984).

Έχει αναφερθεί ότι στη μεγάλη επιδημία πανούκλας στην Τουλούζη (1630), συμμορίες κλεφτών λήστευαν πτώματα χωρίς να φοβούνται τη νόσηση. Όταν συνελήφθησαν οι δικαστές τους χάρισαν τη ζωή, αφού τους φανέρωσαν το μυστικό της ανοσίας τους, που ήταν επαλείψεις στο σώμα τους με αφέψημα φασκόμηλου, θυμαριού, λεβάντας και δεντρολίβανου (Dweck 2000).

Στην περιοχή Jura της Γαλλίας, στο Franche-Comte, θεωρούσαν ότι το φασκόμηλο αμβλύνει τον πόνο ψυχικό ή/και σωματικό, για αυτό και για να μετριάσουν την θλίψη, φύτευαν στα νεκροταφεία φασκόμηλο. Πράγματι, ο Perys στο ημερολόγιό του, στις 26 Απριλίου 1661, ενώ ταξίδευε από το Gosport προς το Southampton έγραψε: “Με τον τρόπο μας ... παρατηρήσαμε μια μικρή εκκλησία, στην οποία δίπλα στους τάφους υπήρχαν φασκόμηλα” (Grieve 1984).

Υπάρχει μια παλιά Γαλλική δοξασία σύμφωνα με την οποία: “το φασκόμηλο βοηθάει τα νεύρα και με την ισχυρή του δύναμη, θεραπεύεται η παράλυση και φεύγει ο πυρετός” (Grieve 1984).

Σύμφωνα με τη λαϊκή παράδοση το φασκόμηλο κάνει τις γυναίκες γόνιμες και ικανές να προκαλούν αγάπη για ένα άτομο. Επίσης ότι οι γυναίκες στην εξοχή θα έπρεπε να έπαιρναν μαζί τους φασκόμηλο όταν πήγαιναν στην εκκλησία, ώστε αν τις έπαιρνε ο ύπνος να ξυπνούσαν με μια όμορφη μυρωδιά (Dweck 2000).

Ο Walafrid Strabo (808 μ.Χ.-849 μ.Χ.), Γερμανός Βενεδικτίνος μοναχός, στο μοναστήρι του Reichenau στην Κωνσταντία, στο διδακτικό του ποίημα «*Hortulus*», εξηγεί τις θεραπευτικές ιδιότητες των καλλιεργούμενων φυτών του κήπου ως εξής: “το φασκόμηλο λάμπει, είναι πολύ ευχάριστο στη μυρωδιά και τη γεύση, είναι πολύ ισχυρό και επίσης χρήσιμο ως ποτό. Έχει βρεθεί ότι είναι χρήσιμο στις περισσότερες ανθρώπινες ασθένειες”. Ονόμασε το βότανο λελίφαγος, επηρεασμένος από την αρχαιοελληνική του ονομασία (Strabao 1966).

Το *Le Menagier de Paris*, εκτός από τη σούπα ψυχρής σούπας φασκόμηλου και σάλτσας φασκόμηλου για πουλερικά, συνιστά την έγχυση φασκόμηλου για το πλούσιμο των χεριών στο τραπέζι (Hinson 1393).

Τον 16^ο αιώνα μ.Χ. ο Γερμανός ιερέας, ιατρός και βοτανολόγος Hieronymus Bock (1498 μ.Χ.-1554 μ.Χ.) έγραψε: "Από όλους τους θάμνους, δεν υπάρχει σχεδόν κανένας σαν την σάλβια, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ιατρική, στη γαστρονομία και στα κελάρια, τόσο για τους πλούσιους όσο και για τους φτωχούς. Το κρασί της σάλβια ή το βότανο βρασμένο στο κρασί, ανακουφίζει τον πόνο στις πλευρές, ζεσταίνει το συκώτι και τη μήτρα, ενισχύει τις αισθήσεις και ενισχύει τις γυναικείες ασθένειες (= εμμηνόρροια). Βοηθάει στα κρυολογήματα και τη γρίπη και στους ρευματισμούς, όχι μόνο μετά από κατάποση, αλλά και τρίβοντας τα στα άκρα. Ένα σκεύασμα με σάλβια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δυσεντερία και να καθαρίσει τα έντερα. Η σάλβια που βράζει στο νερό καθαρίζει και θεραπεύει τα τραύματα και τα τοιμήματα, βοηθάει στα δηλητηριώδη τοιμήματα, καθαρίζει τα ακάθαρτα έλκη και θεραπεύει την ψώρα. Το τρίψιμο των δοντιών με φρέσκα φύλλα σάλβια τα κρατά σταθερά και καθαρά. Η σάλβια που βράζει στο κρασί και χρησιμοποιείται ως γαργάρες καταπραΰνει τους πόνους σε λαιμό και οισοφάγο" (https://www.avogel.com/plant-encyclopaedia/salvia_officinalis.php).

Το 1597 ο βοτανολόγος John Gerard (1545 μ.Χ.-1612 μ.Χ.) στο έργο του *Herball ή Generall Historie of Plantes* αναφέρει ότι η σάλβια είναι ένα βότανο "εξαιρετικά καλό για το κεφάλι και τον εγκέφαλο, επιταχύνει τις αισθήσεις και τη μνήμη, είναι τονικό των νεύρων, αποκαθιστά την υγεία σε εκείνους που έχουν παράλυση και απομακρύνει το τρεμούλιασμα των μελών".

Ο Gervase Markham (1568 μ.Χ.-1637 μ.Χ.), Άγγλος ποιητής και συγγραφέας, στο έργο του "*The English Housewife (1615)*" δίνει μια συνταγή για μια σκόνη δοντιών με φασκόμηλο και αλάτι (Markham 1615).

Ο γιατρός και βοτανολόγος Nicholas Culpeper (1616 μ.Χ.-1654 μ.Χ.) ισχυρίστηκε ότι το φασκόμηλο είναι καλό για τον εγκέφαλο και τη βελτίωση της μνήμης (Woodward 1994, Culpeper 1992).

Το 1688 μ.Χ. ο Γερμανός ιατρός και θεολόγος Christian Franz Paullini (1643 μ.Χ.-1712 μ.Χ.) από το Άουγκσμπουργκ, έγραψε μια ολοκληρωμένη μονογραφία 416 σελίδων για τη σάλβια στα λατινικά (https://www.avogel.com/plant-encyclopaedia/salvia_officinalis.php).

Οι χρήσεις της σάλβιας από την παραδοσιακή Ελληνική ιατρική επεκτάθηκαν στην Ινδία, όπου τα αποξηραμένα φύλλα (*Salbia-sefakuss* in Hindi) και το υγρό εκχύλισμα χρησιμοποιούνται στα παραδοσιακά ινδικά φάρμακα θεραπειών Ayurvedic, Siddha και Unani (Blumenthal et al. 2000).

Η *Salvia officinalis* L. αναφέρεται ως κοινό φασκόμηλο (common Sage) και ως φασκόμηλο της Δαλματίας (Dalmatian Sage).

1.1.2.3 Δρογοχημεία

Η δρόγη της *Salvia officinalis* L. αποτελείται από τα αποξηραμένα φύλλα, ολόκληρα ή θρυμματισμένα, του φυτού και πρέπει να περιέχει όχι λιγότερο από 15 mL

αιθέριου ελαίου ανά kg αποξηραμένης δρόγης, και κατ' ελάχιστο 10 mL αιθέριου ελαίου ανά kg τεμαχισμένης αποξηραμένης δρόγης (Ph. Eur. 2008).

Το βάμμα φασκόμηλου που παράγεται από 1 μέρος θρυμματισμένου φύλλου σε 10 μέρη αιθανόλης (70% v/v) αποτελεί ξεχωριστή μονογραφία στην Ευρ Φαρμακοποιία. Το βάμμα που παράγεται από φύλλα φασκόμηλου πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 0,1% g/g αιθέριο έλαιο.

Τα συστατικά των φύλλων της *Salvia officinalis* L. είναι: αποτελούν πλούσιο μίγμα χημικών συστατικών (Blumenthal et al. 2000, Bradley 2006).

- Πτητικές ουσίες: Μονοτερπένια μέχρι 3%, όπως α-θουγιόνη (10-60%), β-θουγιόνη (4-36%), κάμφορα (5-20%), 1,8-κινεόλη (1-15%), σεσκιτερπένια όπως α-χουμουλίνη, β-καρνοφυλλένιο
- Παράγωγα υδροξυκινναμικού οξέος: (~3,5%): κυρίως ροσμαρινικό οξύ (διμερές του καφεϊκού οξέος, > 3,3%), μελιτρικό οξύ Α, μελιτρικό μεθύλιο Α, σαλβιανολικό οξύ και ελεύθερο καφεϊκό οξύ.
- Φαινολικά διτερπένια: καρνοσικό οξύ (τρικυκλικό διτερπένιο που βρίσκεται στα φρέσκα φύλλα, σε κάποιο ποσοστό στα αποξηραμένα φύλλα και ορισμένα είδη εκχυλισμάτων). Το καρνοσικό οξύ είναι πολύ ασταθές και εύκολα -οξειδώνεται σχηματίζοντας λακτόνες, ιδιαίτερα την καρνοσόλη (0,35%). Στη συνέχεια η καρνοσόλη μπορεί να μετατραπεί σε άλλα φαινολικά διτερπένια με δομή λακτόνης, όπως: ροσμανόλη, επιροσμανόλη και 7-μεθυλ-ροσμανόλη.
- Τριτερπένια: πεντακυκλικά τριτερπενικά οξέα όπως: ουρσολικό οξύ (> 3,5%), ολεανολικό οξύ (> 0,4%) και τριτερπενικές αλκοόλες όπως: α- και β-αμυρίνη (0,18% και 0,1% αντίστοιχα).
- Φλαβονοειδή (~1,1%): κυρίως φλαβόνες και γλυκοσίδες τους όπως η λουτεολίνη, ο 7-γλυκοσίδης της, το 7-γλυκουρονίδιο και το 3'-γλυκουρονίδιο της, ο 7-μεθυλαιθέρας της λουτεολίνης, 6-υδροξυλουτεολίνη, 7-γλυκοσίδης της, 7-γλυκουρονίδιο της, 6-μεθοξυλουτεολίνη και ο 7-μεθύλ-αιθέρας της, η απιγενίνη, ο 7-γλυκοσίδης της και ο 7-μεθυλαιθέρας της, η 6-μεθύλ-απιγενίνη (=ισπιδουλίνη) και ο 7-μεθυλαιθέρας της (=κιρσιμαριτίνη) και 5-μεθόουσαλβιγενίνη.
- Φαινολικοί γλυκοσίδες: εκτός των παραγώγων υδροξυκινναμικού οξέος και φλαβονοειδών, ο γλυκοσίδης 4-ακετοφαινόνης κ.α.
- Πολυσακχαρίτες: πηκτίνη υψηλού μοριακού βάρους, αραβινογαλακτάνες.
- Άλλα συστατικά: παράγωγα βενζοϊκού οξέος (p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, συριγγικό οξύ κ.α.), φυτοστερόλες (β-σιτοστερόλη και στιγμαστερόλη, 0,001%).
- Μέταλλα και Ιχνοστοιχεία: τα φύλλα φασκόμηλου είναι πλούσια σε μαγνήσιο και σίδηρο. Στον παρακάτω πίνακα 3 αναγράφονται αναλυτικά οι ποσότητες σε μέταλλα και ιχνοστοιχεία που υπάρχουν στα φύλλα (Zimna et al. 1984).

Πίνακας 3

Μέταλλα και ιχνοστοιχεία στα φύλλα της *Salvia officinalis*.

Νάτριο (Na)	91 ppm
Κάλιο (K)	14,9 g/kg
Μαγνήσιο (Mg)	4,1 g/kg
Ασβέστιο (Ca)	10,1 g/kg
Σίδηρος (Fe)	885 ppm
Μαγγάνιο (Mn)	52,7 ppm
Ψευδάργυρος (Zn)	145 ppm
Χαλκός (Cu)	6,9 ppm

Το αιθέριο έλαιο έχει μια πολύ μεταβλητή σύνθεση ανάλογα με την γεωγραφική προέλευση, το χρόνο συλλογής και άλλους παράγοντες (Bradley 2006). Τα κυριότερα συστατικά είναι η θουγιόνη, κινεόλη και καμφορά.

1.1.2.4 Δρογοφαρμακολογία

1.1.2.4.1 Στοιχεία από την παραδοσιακή ιατρική

Οι παραδοσιακές χρήσεις της *S. officinalis* L. ταυτίζονται με αυτές της *S. fruticosa* Mill., δεδομένου ότι στην λαϊκή ιατρική αναφέρονται και τα δύο ως φασκόμηλο και συνεπώς χρησιμοποιούνται για παρεμφερείς ή ίδιους λόγους.

1.1.2.4.2 Στοιχεία από μελέτες *in vitro* και *in vivo* σε πειραματόζωα

A. Δράση στη στοματική κοιλότητα

Η μελέτη των Kermanshah et al. (2009), έδειξε ότι το υδατοαλκοολικό εκχύλισμα *S. officinalis* αναστέλλει την ανάπτυξη των *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus* και *Actinomyces viscosus*, βακτηρίων που ευθύνονται για την οδοντική τερηδόνα. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν τη χρήση του φυτού ως φυσική αντιμετώπιση ασθενειών στόματος και δοντιών.

B. Γαστροπροστατευτική δράση

Οι Mayer et al. (2009), εξέτασαν την γαστροπροστατευτική δράση ξηρού υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος (HE, 85% αιθυλική αλκοόλη) *S. officinalis* σε αρουραίους. Στη μελέτη αυτή έγινε χρήση μοντέλου οξείας και χρόνιας γαστρικής βλάβης, προκαλούμενης από (80%) αιθανόλη και (20%) οξικό οξύ αντίστοιχα. Επίσης, διερευνήθηκε η επίδραση του HE στην έκκριση οξέος στο στομάχι αξιολογώντας της δραστηριότητα της αντλίας πρωτονίων. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά του φορέα και της ομεπραζόλης. Έξι αρουραίοι υποβλήθηκαν σε *per os* αγωγή με το φορέα (νερό και 1% Tween 80, 0,1 mL/100 g), ομεπραζόλη (40 mg/kg) ή HE (30, 100, 300 και 1000 mg/kg). Μια ώρα μετά τη θεραπεία, οι γαστρικές αλλοιώσεις προκλήθηκαν με αιθανόλη 80% (0,5 mL / ζώο, *per os*). Τα ζώα σκοτώθηκαν 1 ώρα μετά το χορήγηση της αιθανόλης. Τα χρόνια γαστρικά έλκη προκλήθηκαν σε έξι αρουραίους μετά από νηστεία 16 ωρών, με ένεση 50 mL οξικού οξέος 20%. Ύστερα, χορηγήθηκαν *per os* ο φορέας (νερό και 1% Tween 80, 0,1 mL/100 g), η ομεπραζόλη 20 mg/kg, και το HE (10, 30 και 100 mg/kg), δύο φορές την ημέρα για επτά ημέρες, οπότε και τα ζώα

θανατώθηκαν. Στον προσδιορισμό έκκρισης γαστρικού οξέος έγινε περιίδεση του πυλωρού και χορηγήθηκαν ο φορέας (νερό και 1% Tween 80,1 mL/100 g, ενδο-δωδεκαδαχτυλικά), ομπεπραζόλη (40 mg/kg, *per os.*) ή HE (300, 600 και 1000 mg/kg, ενδο-δωδεκαδαχτυλικά). Τα ζώα θανατώθηκαν μετά από 4 ώρες. Το HE έδειξε εξαιρετική δραστηριότητα. Πράγματι, η από του στόματος χορήγηση HE, 1 ώρα πριν από την επαγωγή των οξέων γαστρικών αλλοιώσεων με αιθανόλη 80%, μείωσαν την περιοχή των βλαβών με ED50 = 84,0 (54,8-128,9) mg/kg. Η ομπεπραζόλη, ως θετικός έλεγχος της δοκιμής, μείωσε τις επαγόμενες γαστρικές αλλοιώσεις με αιθανόλη σε 58%. Η από του στόματος θεραπεία των ζώων με HE (10, 30 και 100 mg / kg / ημέρα για 7 ημέρες) μείωσε το χρόνιο γαστρικό έλκος που προκλήθηκε από οξικό οξύ σε 59, 66 και 76% αντίστοιχα. Η ομπεπραζόλη (20 mg / kg / ημέρα για 7 ημέρες), μείωσε τον δείκτη γαστρικού έλκους με οξικό οξύ σε 75%. Η ενδο-δωδεκαδαχτυλική χορήγηση του HE (300, 600 και 1000 mg/kg) αμέσως μετά την περιίδεση του πυλωρού μείωσε τον όγκο του γαστρικού περιεχομένου που εκκρίνεται κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 4 ωρών σε 34, 42 και 50% αντίστοιχα. Η ολική οξύτητα του γαστρικού υγρού μειώθηκε με HE (600 και 1000 mg/kg) κατά 54 και 71% αντίστοιχα. Η ομπεπραζόλη μείωσε τον όγκο και την ολική οξύτητα του γαστρικού υγρού κατά 23 και 67%, αντίστοιχα. *In vitro*, η HE (0,1 και 0,3 mg/mL) αναστέλλει τη δράση της αντλίας πρωτονίων (H⁺, K⁺-ATPάση) κατά 46 και 66%, αντίστοιχα. Η ομπεπραζόλη, μείωσε τη δραστηριότητα της αντλίας πρωτονίων στο 49%. Η καρνοσόλη αναγνωρίστηκε ως ένα πιθανό ενεργό συστατικό για την γαστροπροστατευτική δράση του εκχυλίσματος της *S. officinalis* L.

Γ. Αντιδιαρροϊκή και αντισπασμωδική δράση

Οι Khan et al. (2011), μελέτησαν τη πιθανή χρήση της *S. officinalis* στη διάρροια και στους σπασμούς του εντέρου. Ξηρό εκχύλισμα (διαλύτης H₂O/MeOH = 30/70, χρόνος εμβροχής 3 μέρες) της *S. officinalis* μελετήθηκε *in vivo* σε ποντικούς και *in vitro* σε απομονωμένη νήστιδα κουνελιού. Το φυτικό εκχύλισμα έδειξε ότι ασκεί προστατευτική, δοσοεξαρτώμενη (100-300 mg/kg), δράση έναντι της διάρροιας που προκαλείται από την χορήγηση καστορέλαιου στα ποντίκια. Η προκαταβολική χορήγηση του φυτικού εκχυλίσματος, έδειξε προστασία 40% και 80% από τη διάρροια στις αντίστοιχες δόσεις των 100 και 300 mg/kg. Η αρνητική ομάδα ελέγχου (αλατούχος αγωγή) δεν έδειξε καμία προστασία από τη διάρροια που προκαλείται από καστορέλαιο, ενώ η λοπεραμιδη, θετική ομάδα ελέγχου, στα 10 mg/kg έδειξε πλήρη προστασία από τη διάρροια ($p < 0,01$ έναντι της αλατούχου ομάδας). Στο πείραμα *in vitro* φάνηκε ότι το εκχύλισμα σάλβιας εμφανίζει αντιδιαρροϊκή και αντισπασμωδική δράση που πιθανώς οφείλονται στην ενεργοποίηση των διαύλων K⁺. Σύμφωνα με τους συγγραφείς η μελέτη αυτή παρέχει ικανή φαρμακολογική βάση για τη φαρμακευτική χρήση του φυτού στη διάρροια και σπασμός του εντέρου.

Δ. Δράση κατά νεοπλασιών

Η πιθανή αντικαρκινική δράση της *S. officinalis* έχει μελετηθεί σε αρκετές καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε ζωικά μοντέλα καρκίνου. Έχει αναφερθεί ότι η κατανάλωση εγχύματος του φυτού εμπόδισε την φάση έναρξης στην

καρκινογένεση παχέος εντέρου (Pedro et al. 2016). Τα εκχυλίσματα του φυτού έδειξαν αποπρωτική δράση και ανέστειλαν την ανάπτυξη σε κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού (MCF-7), αδενοκαρκινώματος τραχήλου (HeLa), καρκίνου ορθού και παχέως εντέρου (HCT-116, HCT15, CO115, HT29), ινσουλινώματος (RINm5F), λαρυγγικού καρκινώματος (Hep-2), καρκίνου πνεύμονα (A549), μελανώματος (A375, M14, A2058, B16) και καρκινώματος πλακωδών κυττάρων στο στόμα (Garcia et al. 2016, El Hadri et al. 2010, Russo et al. 2013, Jedinák et al. 2006, Sertel et al. 2011, Xavier et al. 2009, Kontogianni et al. 2013). Η *S. officinalis* παρουσιάζει επίσης αντιμεταστατική και αντι-αγγειογόνο δράση (Keshavarz et al. 2010, 2011). Το εκχύλισμα του φυτού ενισχύει τον TNF-α και την απελευθέρωση μονοξειδίου του αζώτου από τα μακροφάγα κύτταρα αυξάνοντας το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα (Kontogianni et al. 2013). Αυτές οι επιδράσεις μπορεί να σχετίζονται με την παρουσία αρκετών κυτταροτοξικών και αντικαρκινικών ενώσεων που υπάρχουν στο φυτό. Το καρυοφυλλένιο και το α-βουτυλένιο έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών σειρών MCF-7 και HCT-116 (El Hadri et al. 2010). Η μανούλη, ένα διτερπένιο λαβδανικού τύπου, ασκεί επιλεκτική κυτταροτοξική δράση στο ανθρώπινο αυχενικό αδενοκαρκίνωμα και το ανθρώπινο γλοιοβλάστωμα (De Oliveira et al. 2016).

Επίσης, το πεντακυκλικό τριτερπένιο ουρσολικό οξύ, αναστέλλει την αγγειογένεση, τις νεοπλασματικές πρωτεάσες και την διείσδυση των κυττάρων του μελανώματος (Jedinák et al. 2006). Μεταξύ των φαινολικών μεταβολιτών του φυτού το ροσμαρινικό οξύ έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε σχέση με την αντικαρκινική του δράση. Αναστέλλει την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών κυττάρων (πχ αδενοκαρκινώματος μαστού, παχέος εντέρου, χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, προστατικού καρκινώματος, ηπατοκυτταρικού και του μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα) (Xavier et al. 2009, Yesil-Celiktas et al. 2010).

Από μελέτες σε ζώα, το ροσμαρινικό οξύ έδειξε ότι ήταν σε θέση να αποτρέψει τον σχηματισμό νεοπλασιών δέρματος σε ποντίκια που προκαλείται από διμεθυλοβενζόλιο (α), την καρκινογένεση του δέρματος που προκαλείται από ανθρακένιο, αλλά και να προλάβει την μετάσταση καρκίνου μαστού στα οστά (Sharmila et al. 2012, Xu Y. et al. 2010).

Η *S. officinalis* αναστέλλει επίσης διάφορες φάσεις της καρκινογένεσης (πολλαπλασιασμό, μετανάστευση, προσκόλληση σε ενδοθηλιακά κύτταρα) (Huang et al. 2006).

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η *S. officinalis* μπορεί να αναστείλει τη δημιουργία μεταλλάξεων. Έχει αποδειχθεί ότι το αιθέριο έλαιο *S. officinalis* μειώνει τις μεταλλάξεις που επάγονται από την UV ακτινοβολία σε *E. coli* και *Saccharomyces cerevisiae* (Vuković-Gačić et al. 2006). Το έγχυμα μειώνει τη συχνότητα των μεταλλάξεων που προκαλείται από τον μεθανοσουλφονικό μεθυλεστέρα σε *Drosophila melanogaster* (Patenković et al. 2009). Το μεθανολικό εκχύλισμα του παρουσιάζει προστατευτική δράση έναντι της γονοτοξικότητας που προκαλείται από την κυκλοφωσφαμίδη σε αρουραίους (Alkan et al. 2012). Η *S. officinalis* μειώνει και την οξειδωτική βλάβη του DNA που προκαλείται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τη διμεθοξυ-1,4-ναφθοκινόνη σε κύτταρα HepG2. Το αντιμεταλλαξιγόνο αποτέλεσμα του φυτού αποδίδεται κυρίως στις μονοτερπενικές ενώσεις όπως η θουγιόνη, η

καμφορά, το λιμονένιο και η 1,8-κινεόλη (Vuković-Gačić et al. 2006, Vujošević et al, 2004, Nikolić et al. 2011, Simić et al, 1998), ενώ η περαιτέρω προστασία στο DNA θα μπορούσε να αποδοθεί εν γένει στην αντιοξειδωτική δράση (Alkan et al. 2012, Kozics et al. 2013).

Ε. Αντιοξειδωτική δράση

Στοιχεία από διάφορες μελέτες υποδηλώνουν ότι η *S. officinalis* έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Ο εμπλουτισμός του πόσιμου ύδατος των αρουραίων με εκχύλισμα του φυτού αύξησε την αντίσταση των ηπατοκυττάρων τους στο οξειδωτικό στρες (Horváthová et al, 2016). Επιπλέον, το φυτό προστατεύει τα ηπατοκύτταρα από τη βλάβη του DNA προκαλούμενη από διμεθοξυ-ναφθοκινόνη, αυξάνοντας τη δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Kozics et al. 2013).

Τα πιο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά συστατικά της *S. officinalis* είναι τα: καρνοσόλη, ροσμαρινικό οξύ και καρνοσικό οξύ, ακολουθούμενα από το καφεϊκό οξύ, τη ροσμανόλη και την κισιμαριτίνη (Cuvelier et al. 1996). Η αντιοξειδωτική δράση της καρνοσόλης είναι συγκρίσιμη με αυτή της α -τοκοφερόλης (Dianat et al. 2014, Miura et al. 2002).

Σε αρουραίους με διαβήτη (προκαλούμενο από στρεπτοζοτοκινίνη), το ροσμαρινικό οξύ αυξάνει τη δράση της παγκρεατικής καταλάσης, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Govindaraj et al. 2015).

Φλαβονοειδή του φυτού, όπως η κερκετίνη και η ρουτίνη, ασκούν επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Azevedo et al. 2013).

Ζ. Αντιφλεγμονώδης και αναλγητική δράση

Φαρμακολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η *S. officinalis*, έχει αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση (Abad et al. 2011, Abad et al. 2011, Khayate-Nouri et al. 2013, Mansourabadi et al. 2015, Nicolella et al. 2015, Qnais et al. 2010, Rodrigues et al. 2012, Pra et al. 2011, Schröder et al. 2013). Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι βοηθά στον έλεγχο του νευροπαθητικού πόνου στην περιφερική νευροπάθεια, προκαλούμενη από χημειοθεραπεία (Abad et al. 2011).

Μεταξύ των διαφόρων εκχυλισμάτων της *S. officinalis*, το χλωροφορμικό παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιφλεγμονώδη δράση ενώ το μεθανολικό και το αιθέριο έλαιο χαμηλότερη (Baricevic et al. 2001).

Τα φλαβονοειδή και τα τερπένια είναι οι ενώσεις που πιθανότατα συμβάλλουν στην αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση του βοτάνου (Baricevic et al. 2001, Azevedo et al. 2013, Mansourabadi et al. 2015, Rodrigues et al. 2012). Οι Mansourabadi et al. (2015), ανέφεραν ότι τα φλαβονοειδή που εξάγονται από τη *S. officinalis* μειώνουν τη φλεγμονή σε ποντικούς, σε μοντέλο караγενάνης, και επάγουν την αναλγησία με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Οι Osakabe et al. (2004), έδειξαν ότι η τοπική εφαρμογή ροσμαρινικού οξέος αναστέλλει τη φλεγμονή στην επιδερμίδα. Οι μεταβολίτες: μαννόλη, καρνοσόλη και ουρσολικό οξύ ασκούν αντιφλεγμονώδη δράση (Nicolella et al. 2015, Rodrigues et al. 2012, Baricevic et al. 2001) με εκείνη του ουρσολικού οξέος να είναι διπλάσια της ινδομεθακίνης (Baricevic et al. 2001).

Η. Δράσεις επί του μεταβολισμού

Φαρμακολογικές μελέτες κατέδειξαν ότι διαφορετικά εκχυλίσματα υπέργειων τμημάτων *S. officinalis*, είναι σε θέση να μειώσουν τη γλυκόζη του αίματος σε φυσιολογικές και διαβητικές καταστάσεις (Eidi et al. 2005, 2009, Khattab et al. 2012, Lima et al. 2006). Οι μηχανισμοί που προτάθηκαν για την υπογλυκαιμική δράση της περιλαμβάνουν την αναστολή της γλυκονογένεσης στα ηπατοκύτταρα και την μείωση της αντίστασης στην ινσουλίνη μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα PPAR γ , Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ) (Christensen et al. 2010, Shafiee-Nick et al. 2012). Σε άλλη μελέτη αναφέρθηκε ότι το εκχύλισμα *S. officinalis*, αύξησε την ινσουλίνη πλάσματος σε διαβητικούς αρουραίους (διαβήτης επαγόμενος από στρεπτοζοτοκίνη) (Eidi et al. 2009), ενώ σε προηγούμενη μελέτη της ίδιας ομάδας είχε παρατηρηθεί ότι το εκχύλισμα δεν επηρέασε την απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας φυσιολογικών ή των διαβητικών αρουραίων (Eidi et al. 2005). Συνεπώς, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διασαφηνιστεί ο ακριβής τρόπος μηχανισμός της αντιδιαβητικής δράσης της *S. officinalis* L.

Διάφορα εκχυλίσματα του φυτού, μειώνουν τα λιπίδια του ορού. Σύμφωνα με τους Hernandez-Saavedra et al. (2016), το έγχυμα *S. officinalis* μείωσε τα τριγλυκερίδια του ορού, τη συνολική χοληστερόλη και τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) σε παχύσαρκους αρουραίους. Επίσης, μείωσε το σωματικό βάρος και το κοιλιακό λίπος στα ίδια ζώα. Τα ευεργετικά αποτελέσματα της στο λιπιδαιμικό προφίλ έχουν παρατηρηθεί και σε διαβητικά ζώα. Σε αρουραίους με διαβήτη (επαγόμενο από στρεπτοζοτοκίνη) υπήρξε μείωση τριγλυκεριδίων, χοληστερόλης, ουρίας, ουρικού οξέος, κρεατινίνης, ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST) και αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT) (Eidi et al. 2009, Khattab et al. 2012). Η ευεργετική δράση της στη δυσλιπιδαιμία φαίνεται να σχετίζεται με τις πολυφαινόλες του φυτού. Για παράδειγμα, η θεραπεία με ροσμαρινικό οξύ μειώνει τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης στον ορό διαβητικών αρουραίων (διαβήτης επαγόμενος από στρεπτοζοτοκίνη) που λάμβαναν διαίτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (Govindaraj et al. 2015).

Θ. Αντιμικροβιακές/αντιπαρασιτικές ιδιότητες

Το αιθέριο έλαιο και το αιθανολικό εκχύλισμα *S. officinalis*, παρουσιάζουν ισχυρή βακτηριοκτόνο και βακτηριοστατική δράση έναντι Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων όπως: *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus epidermidis*. Η αποτελεσματικότητα του φυτού στα Gram-αρνητικά βακτηρίδια εξαρτάται από το είδος εκχυλίσματος που χρησιμοποιείται. Ενώ το αιθέριο έλαιο παρουσιάζει σημαντική ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas morgani*, *Salmonella anatum*, *S. enteritidis*, *S. typhi* και *Shigella sonnei*, η επίδραση του αιθανολικού εκχυλίσματος σε *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* και *S. enteritidis* είναι ασθενής (Bozin et al. 2007, Delamare et al. 2007, Veličković et al. 2003, Hayouni et al. 2008, Mitic-Culafic et al. 2005).

Έχει αναφερθεί επίσης αντιμυκητιασική, αντι-ική και ανθελονοσιακή δράση (Badiie et al. 2012, Akkawi et al. 2012, Tada et al. 1994, Carta et al. 1996). Τα υδατικά

και αιθανολικά εκχυλίσματα ήταν επίσης αποτελεσματικά κατά του ιού του απλού έρπητα τύπου 1 και 2 (Schnitzlera et al. 2008, Smidling et al., 2008). Η αντιμυκητιασική δράση έχει αναφερθεί κατά των *Botrytis cinerea*, *Candida glabrata*, *C. albicans*, *C. krusei* και *C. parapsilosis* (Badiie et al. 2012, Carta et al. 1996). Η καμφορά, η θουγιόνη και η 1,8-κινεόλη ασκούν αντιβακτηριακή δράση έναντι των *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *B. megatherium*, *B. subtilis*, *B. cereus* και *Klebsiella oxytoca* (Delamare et al. 2007). Επίσης, το ολεανολικό οξύ και το ουρσολικό οξύ έχουν αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηρίων ανθεκτικών σε πολλαπλά φάρμακα, όπως τους εντερόκοκκους ανθεκτικούς στη βανκομυκίνη, τον ανθεκτικό στην πενικιλίνη *Streptococcus pneumoniae* και τον ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus*. Η επίδραση του ουρσολικού οξέος στον *Enterococcus faecium* και στα πολυανθεκτικά βακτήρια είναι ισχυρότερη από αυτή της αμπικιλίνης (Horiuchi et al. 2007). Η καρνοσόλη και το καρνοσικό οξύ είναι δύο άλλες αντιβακτηριακές ενώσεις που λαμβάνονται από τη *S. officinalis* και ενισχύουν την δράση των αμινογλυκοσίδων έναντι *S. aureus* ανθεκτικού σε μεθικιλίνη (Horiuchi et al. 2007).

I. Βελτίωση γνωστικής λειτουργίας και της μνήμης

Μελέτη σε αρουραίους έδειξε ότι το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού αυξάνει την μνήμη τους και την παθητική μάθηση (Eidi et al. 2006). Ένα υδατοαλκοολικό εκχύλισμα και το ροσμαρινικό οξύ, βελτιώνουν τη γνωστική λειτουργία σε υγιείς αρουραίους και προλαμβάνουν το έλλειμα μάθησης και μνήμης που προκαλείται από σακχαρώδη διαβήτη (Hasanein et al. 2016). Επίσης, το ίδιο εκχύλισμα μείωσε εξασθένιση μνήμης που επάγεται από τη μορφίνη (Gomar et al. 2014).

1.1.2.4.3 Κλινικές μελέτες

Οι George et al. (2009), απέδειξαν την αποτελεσματικότητα μιας οδοντόπαστας με εκχύλισμα *S. officinalis* L. στον έλεγχο της οδοντικής πλάκας και της ουλίτιδας.

Οι Kianbakh et al. (2013), αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια ξηρού υδατοαλκοολικού (EtOH: H₂O= 80:20) εκχυλίσματος φύλλων της στη θεραπεία ασθενών με διαβήτη τύπου 2 και υπερλιπιδαιμία (υπερχοληστερολαιμία ή/και υπερτριγλυκεριδαιμία), σε τυχαίοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη παράλληλων ομάδων. Στη μελέτη έλαβαν μέρος 40 ασθενείς (από 40 έως 60 ετών) οι οποίοι έλαβαν μια κάψουλα που περιείχε 500 mg από το προαναφερόμενο εκχύλισμα (έκδοχα 9,8% w/w), κάθε 8 ώρες για 3 μήνες, και 40 εθελοντές με διαβήτη τύπου 2 και υπερλιπιδαιμία της ομάδας του εικονικού φαρμάκου. Όλα τα άτομα της μελέτης λάμβαναν 2 δισκία γλυπουριδης των 5 mg, 2 φορές την ημέρα και 2 δισκία μετφορμίνης 500 mg, 2 φορές την ημέρα. Η IC₅₀ του εκχυλίσματος στην ανάλυση DPPH ήταν 392,61±0,04 µg/mL (μέση τιμή ± SD), ενώ η IC₅₀ του ασκορβικού οξέος ήταν 5,626±0,001 µg/mL. Η συνολική ποσότητα σε φλαβονοειδή, ως ισοδύναμα mg ρουτίνης σε 1 g εκχυλίσματος, σε φαινόλες, ως mg γαλλικού οξέος σε 1 g εκχυλίσματος, ήταν 912,03±22,14 mg/g και 738,59±25,17 mg/g αντίστοιχα. Επιπλέον, το ποσοστά γαλλικού οξέος, ρουτίνης και κερκετίνης στο εκχύλισμα ήταν 15,22%, 16,6% και 2,92% αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξε ότι το εξεταζόμενο εκχύλισμα μείωσε τη γλυκόζη νηστείας, την γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c), την ολική

χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια και την χοληστερόλη λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL-C) και αύξησε την χοληστερόλη λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL-C) σε σύγκριση με την αρχική τιμή. Το μέσο ποσοστό % (διάστημα εμπιστοσύνης 95%) μεταξύ των ομάδων του εκχυλίσματος και του εικονικού φαρμάκου, όσον αφορά τις επιδράσεις στη γλυκόζη νηστείας, HbA1c, ολική χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, LDL-C και HDL-C ήταν 32,2 (26,5, 37,9), 22,7 (16,8, 28,6), 16,9 (9,7, 24,1), 56,4 (36,1, 76,7), 35,6 (29,9, 41,3) and 27,6 (15,8, 39,4) ($p=0,001$, $p=0,01$, $p=0,01$, $p=0,009$, $p<0,001$ και $p=0,008$) αντίστοιχα. Επιπλέον, το εκχύλισμα δεν είχε σημαντικές επιδράσεις στις άλλες παραμέτρους, όπως AST, ALT και κρεατινίνη ορού, σε σύγκριση με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου. Επίσης δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες. Σύμφωνα με τους συγγραφείς τα φύλλα *S. officinalis* είναι ασφαλή, έχουν αντι-υπεργλυκαιμική δράση και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματική θεραπεία να βελτιώσουν το λιπιδαιμικό προφίλ σε διαβητικούς ασθενείς τύπου 2 με υπερλιπιδαιμία.

Οι Kianbakht et al. (2016), αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της χορήγησης *S. officinalis* σε συνδυασμό με 10mg ατορβαστατίνης, 15 mg γλυπουριδης και 2000 mg μετφορμίνης ημερησίως, σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) και υπερλιπιδαιμία. Στην ομάδα του φαρμάκου υπήρχαν 50 ασθενείς (από 40-60 ετών) όσοι και στην ομάδα εικονικού φαρμάκου. Στην ομάδα φαρμάκου χρησιμοποιήθηκε ξηρό υδατοαλκοολικό (EtOH: H₂O= 80:20) εκχύλισμα φύλλων της *S. officinalis*, με τη μορφή καψακίου 500 mg του εκχυλίσματος (έκδοχα 9,8% w/w), ανά 8 ώρες για 2 μήνες. Η IC₅₀ του εκχυλίσματος στην ανάλυση DPPH ήταν 87,26±0,001 μg/mL (μέση τιμή±SD), ενώ η IC₅₀ του ασκορβικού οξέος 5,626±0,001 μg/mL. Η συνολική ποσότητα σε φλαβονοειδή ως ισοδύναμα mg ρουτίνης, σε φαινόλες ως mg γαλλικού οξέος και η συνολική κερκετίνη, περιεχόμενες ανά καψάκιο με το φυτικό εκχύλισμα, ήταν 39,76±3,58 mg ισοδυνάμων ρουτίνης, 30,33±1,23 mg γαλλικού οξέος και 0,13 mg κερκετίνης. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι στην ομάδα φαρμάκου το καψάκιο σάλβιας μείωσε τα επίπεδα της γλυκόζης νηστείας, μεταγευματικής γλυκόζης (2 ώρες μετά το γεύμα), HbA1c, ολικής χοληστερόλης, LDL-C και τριγλυκεριδίων, ενώ αύξησε το επίπεδο της HDL-C σε σύγκριση με την ομάδα εικονικού φαρμάκου ($p<0,05$). Το εκχύλισμα δεν επηρέασε σημαντικά τις άλλες παραμέτρους, όπως ALT, AST, δείκτης μάζας σώματος και κρεατινίνη. Επίσης, δεν αναφέρθηκε καμία ανεπιθύμητη ενέργεια. Σύμφωνα με τους συγγραφείς το εκχύλισμα έχει σημαντική αντιοξειδωτική δράση που μπορεί να είναι ευεργετική στη πρόληψη καρδιαγγειακών επιπλοκών του ΣΔ2. Επιπλέον, η προσθήκη του εκχυλίσματος στη θεραπεία με ατορβαστατίνη, γλυπουρίδη και μετφορμίνη, είναι ασφαλής και βελτιώνει περαιτέρω το λιπιδαιμικό και γλυκαιμικό προφίλ των ασθενών με ΣΔ2 και υπερλιπιδαιμία.

Οι Akhondzadeh et al. (2003), μελέτησαν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια εκχυλίσματος (αποξηραμένη δρόγη (φύλλα):διαλύτης=1:1, διαλύτης αιθυλική αλκοόλη 45%) *S. officinalis* με σταθερή δόση (60 σταγόνες/ημέρα), σε ασθενείς ήπιας έως μέτριας βαρύτητας νόσο Alzheimer για 4 μήνες. Πρόκειται για μια παράλληλη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο δοκιμή, που διεξήχθη σε τρία κέντρα στην Τεχεράνη, Ιράν. Οι ασθενείς ηλικίας 65-80 ετών τυχαιοποιήθηκαν με εικονικό

φάρμακο (15 άτομα) ή σταθερή δόση εκχυλίσματος *S. officinalis* (15 άτομα). Σε 4 μήνες, το εκχύλισμα *S. officinalis* παρήγαγε σημαντικά καλύτερο αποτέλεσμα στις γνωστικές λειτουργίες από το εικονικό φάρμακο. Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στις δύο ομάδες από πλευράς παρενεργειών εκτός από την ταραχή-αναστάτωση, που φαίνεται να είναι πιο συχνή στην ομάδα του εικονικού φαρμάκου ($p=0,09$). Τα αποτελέσματα αυτής μελέτης δείχνουν αποτελεσματικότητα του εκχυλίσματος στην αντιμετώπιση ήπιας-μέτριας βαρύτητας νόσου Alzheimer, ενώ φαίνεται ότι μπορεί να προκαλέσει επιπρόσθετα μείωση της αναστάτωσης των ασθενών.

Σε μια διπλά-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη διασταύρωσης, 30 υγιείς εθελοντές εξετάστηκαν σε τρεις ξεχωριστές συνεδρίες, με απόσταση 7 ημέρων μεταξύ τους, λαμβάνοντας διαφορετική θεραπεία σε κάθε περίπτωση: εικονικό φάρμακο ή 300 mg ή 600 mg ξηρού εκχυλίσματος *S. officinalis* [δρόγη (αποξηραμένα φύλλα): διαλύτης = 1:10 w/v), διαλύτης=αιθυλική αλκοόλη 80%]. Σε κάθε συνάντηση, αξιολογήθηκε η διάθεση των εθελοντών πριν από τη λήψη της δόσης και μετά από 1 και 4 ώρες. Κάθε εκτίμηση της διάθεσης περιελάμβανε την ολοκλήρωση της κλίμακας διάθεσης Bond-Lader και του ειδικού καταλόγου ασκήσεων άγχους ασκήσεων (STAI), πριν και μετά από 20 λεπτά από τη χρήση του προσομοιωτή άγχους καθορισμένης έντασης (DISS). Και οι δύο δόσεις φασκόμηλου (300 mg, 600 mg) βελτίωσαν τη διάθεση μετά τη δόση, απουσία του στρεσογόνου παράγοντα (δηλαδή, στις προ-DISS κλίμακες διάθεσης), με τη χαμηλότερη δόση να μειώνει το άγχος και την υψηλότερη δόση να αυξάνει την «εγρήγορηση», την «ηρεμία» και την ικανοποίηση στις κλίμακες διάθεσης της Bond-Lader.

Σε μία συνακόλουθη έρευνα, ένα εκχύλισμα *S. officinalis* L. παρουσίασε *in vitro* δοσοεξαρτώμενη αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης και, σε μεγαλύτερο βαθμό, της βουτυρυλοχολινεστεράσης. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τις προηγούμενες παρατηρήσεις των ιδιοτήτων αναστολής της χολινεστεράσης της *S. officinalis* L. και τη βελτίωση της διάθεσης και των γνωστικών επιδόσεων μετά τη χορήγηση μονών δόσεων σε νέους υγιείς εθελοντές (Kennedy et al. 2006).

Σε μια παρόμοια μελέτη με την προηγούμενη, τυχαίοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, διερευνήθηκε η οξεία επίδραση στη γνωστική απόδοση ενός τυποποιημένου εκχυλίσματος *S. officinalis* L. [δρόγη (αποξηραμένα φύλλα): διαλύτης= 7,5: 1, διαλύτης αιθυλική αλκοόλη 70%] σε ηλικιωμένους ενήλικες. Είκοσι εθελοντές (ηλικίας > 65 ετών, μέσος όρος = 72,95) έλαβαν τέσσερις δραστικές δόσεις εκχυλίσματος (167, 333, 666 και 1332 mg) και ένα εικονικό φάρμακο με περίοδο 7 ημερών μεταξύ των επισκέψεων. Στις ημέρες συνεδρίας, οι θεραπείες χορηγήθηκαν αμέσως μετά από μια βασική αξιολόγηση με περαιτέρω αξιολόγηση στις 1, 2, 5, 4 και 6 ώρες μετά τη θεραπεία. Σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (που παρουσίασε τη χαρακτηριστική μείωση της απόδοσης κατά τη διάρκεια της ημέρας), η δόση των 333 mg συσχετίστηκε με σημαντική αύξηση της απόδοσης δευτερογενούς μνήμης σε όλους τους χρόνους δοκιμών. Υπήρξαν, επίσης, σημαντικές βελτιώσεις στην ακρίβεια της προσοχής μετά τη δόση των 333 mg. Η *in vitro* ανάλυση επιβεβαίωσε τις ιδιότητες αναστολής χολινεστεράσης για το εκχύλισμα. Τα ευρήματα της μελέτης δείχνουν συνολικά βελτίωση μνήμης σε ηλικιωμένους ασθενείς (Scholey et al. 2008).

Σε μια τυχαιοποιημένη, διπλά-τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, κλινική δοκιμή, σε ασθενείς ηλικίας 56,4±30,3 ετών, διερευνήθηκε η επίδραση της λήψης εκχύλισματος φύλλων φασκόμηλου (ένα καψάκιο 500 mg κάθε 8 ώρες για 2 μήνες) στα επίπεδα των λιπιδίων, της κρεατινίνης και των ηπατικών ενζύμων ALT και AST στο αίμα νηστείας. Συμμετείχαν 67 υπερλιπιδαιμικοί ασθενείς (υπερχοληστερολαιμία ή/και υπερτριγλυκεριδαιμία, ηλικίας 56,4±30,3), 34 στην ομάδα φαρμάκου και 33 στην ομάδα του εικονικού φαρμάκου. Στην ομάδα φαρμάκου το εκχύλισμα (ξηρό υδατοαλκοολικό (EtOH: H₂O= 80: 20) εκχύλισμα των αποξηραμένων φύλλων *S. officinalis*), μείωσε τα επίπεδα ολικής χοληστερόλης στο αίμα (p<0,001), τριγλυκεριδίων (p= 0,001), LDL (p= 0,004) και VLDL (p= 0,001) ενώ αύξησε τα επίπεδα της HDL (p= 0,001), χωρίς σημαντική επίδραση στα επίπεδα των ALT, AST και κρεατινίνης (p>0,05) σε σύγκριση με την ομάδα του εικονικού φαρμάκου. Δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της χρήσης φασκόμηλου για την αντιμετώπιση της υπερλιπιδαιμίας (Kianbakht et al. 2011).

Οι Sa et al. (2009), σχεδίασαν μια πιλοτική μελέτη (μη τυχαιοποιημένη δοκιμή διασταύρωσης) με έξι υγιείς γυναίκες εθελόντριες (ηλικίας 40-50 ετών) για να αξιολογήσουν την επίδραση στη ρύθμιση της γλυκόζης αίματος και στο λιπιδαιμικό προφίλ της κατανάλωσης 300 mL εγχύματος *S. officinalis*, (σε 4 g αποξηραμένων φύλλων πρόσθεσαν 300 mL βρασμένου νερού και το άφησαν 5 λεπτά) δύο φορές την ημέρα, για τέσσερις εβδομάδες. Εξέτασαν τη δράση του εγχύματος στην SOD (δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου) και στην CAT (καταλάση) των ερυθροκυττάρων, καθώς και την έκφραση της Hsp70 (πρωτεΐνη οξείας φάσης 70) στα λεμφοκύτταρα. Μετά από τέσσερις εβδομάδες θεραπείας με το έγχυμα δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στη γλυκόζη πλάσματος (γλυκόζη νηστείας και 2 ωρών μετά το γεύμα). Ωστόσο, κατά τη διάρκεια κατανάλωσης του εγχύματος υπήρξε βελτίωση στο λιπιδαιμικό προφίλ. Παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα χοληστερόλης LDL και ολικής χοληστερόλης σε συνδυασμό με υψηλότερα επίπεδα HDL χοληστερόλης στο πλάσμα. Αξιοσημείωτο είναι ότι το αποτέλεσμα αυτό διατηρήθηκε για δύο εβδομάδες μετά τη θεραπεία. Η έκφραση της Hsp70 των λεμφοκυττάρων αυξήθηκε, όπως και οι δραστηριότητες της SOD και της CAT των ερυθροκυττάρων. Δεν παρατηρήθηκε ηπατοτοξικότητα ή άλλη ανεπιθύμητη ενέργεια. Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι η πιθανότητα για υπογλυκαιμία σε υγιή άτομα μετά από κατανάλωση εγχύματος της *Salvia officinalis* είναι αμελητέα. Επίσης, παρακολούθησαν την αρτηριακή πίεση (συστολική και διαστολική), τον καρδιακό ρυθμό κατά την ανάπαυση και το δείκτη μάζας σώματος των εθελοντριών, 2 εβδομάδες πριν την έναρξη, κατά τη διάρκεια της μελέτης και δύο εβδομάδες μετά. Καμία μεταβολή δεν παρατηρήθηκε σε όλες αυτές τις παραμέτρους. Επιπλέον, έγιναν δύο δοκιμές αντοχής της γλυκόζης (75 g γλυκόζη σε 300 mL νερού), μία πριν την έναρξη της μελέτης και μία στο τέλος της (4 εβδομάδες μετά), που έδειξαν πως δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των δύο μετρήσεων.

Οι Behradmanesh et al. (2013), πραγματοποίησαν μια διπλά-τυφλή κλινική μελέτη σε 80 διαβητικούς ασθενείς τύπου II, οι οποίοι δεν είχαν φτάσει στον ιδανικό έλεγχο της νόσου. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες περιπτώσεων και ελέγχου με τον

ίδιο αριθμό συμμετεχόντων. Η ομάδα περιπτώσεων έλαβε δισκία *S. officinalis* των 150 mg, ενώ η ομάδα ελέγχου έλαβε εικονικό φάρμακο (placebo), τρεις φορές την ημέρα για τρεις μήνες. Αυτή η μελέτη διεξήχθη για να διερευνηθεί η υπογλυκαιμική δράση σάλβιας και να εξεταστεί η τυχόν επίπτωση της στην ηπατική και νεφρική λειτουργία. Τα επίπεδα της γλυκόζης νηστείας (FBS) και γλυκόζης 2 ωρών μετά το γεύμα (2hrp) ελέγχθηκαν στην αρχή και κάθε 2 εβδομάδες, για τρεις μήνες. Μετρήθηκαν επίσης, στην αρχή και μετά τρεις μήνες η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη (HbA1c), το λιπιδαιμικό προφίλ και οι παράμετροι της ηπατικής (ALT, AST) και νεφρικής (BUN, κρεατινίνη) λειτουργίας. Οι ασθενείς και των δύο ομάδων, λάμβαναν κανονικά τα φάρμακα τους για το ΣΔ. Τα επίπεδα σακχάρου 2hrp και χοληστερόλης μειώθηκαν σημαντικά σε ασθενείς που έλαβαν σάλβια σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0,05$). Δεν υπήρξαν σημαντικές αλλαγές στη γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη και FBS μεταξύ των δύο ομάδων. Η ενδοομαδική μελέτη και η σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών έδειξε ότι δεν υπήρξε καμία αλλαγή πριν την έναρξη και μετά για ALT, AST, BUN, κρεατινίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το φυτό μπορεί να βοηθήσει τους διαβητικούς ασθενείς να μειώσουν την μεταγευματική γλυκαιμία και τη χοληστερόλη. Ωστόσο, σύμφωνα με τους ερευνητές της μελέτης ενδέχεται να χρειαστούν υψηλότερες δόσεις για να μειωθεί η γλυκόζη νηστείας και η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη.

Εκνέφωμα (σπρέι) 15% φασκόμηλου, που περιείχε 140 μ L εκχύλισμα ανά δόση, ήταν σημαντικά ανώτερο από το εικονικό φάρμακο σχετικά με τη μείωση της έντασης του πονόλαιμου. Παρατηρήθηκαν μόνο δευτερεύουσες ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως ξηρότητα στο φάρυγγα ή αίσθηση καύσου ήπιας έντασης. Το προφίλ αποτελεσματικότητας και ανεκτικότητας ενός ψεκασμού φασκόμηλου 15% έδειξε ότι αυτό το παρασκεύασμα παρέχει μια εύκολη και ασφαλή θεραπεία σε ασθενείς με οξεία φαρυγγίτιδα. Μια συμπτωματική ανακούφιση συνέβη εντός των πρώτων δύο ωρών, μετά την πρώτη χορήγηση, και ήταν στατιστικά σημαντικά ανώτερη του εικονικού φαρμάκου (Hubbert et al. 2006). Ωστόσο, η δράση της *S. officinalis* δεν ήταν ισχυρότερη από αυτή της υδροχλωρικής βενζιδαμίνης στον έλεγχο μετεγχειρητικού πόνου μετά από αμυγδαλεκτομή ή αδενοειδεκτομή (Lalíćević et al. 2004).

Οι Moss et al., (2010) διερεύνησαν τη δυνατότητα των αιθέριων ελαίων των ειδών *Salvia* να επηρεάσουν τη γνωστική λειτουργία και τη διάθεση σε υγιείς ενήλικες. 135 υγιείς εθελοντές χωρίστηκαν σε 3 ομάδες: αιθέριο έλαιο *S. officinalis*, αιθέριο έλαιο *S. lavandulaefolia*, και κανένα άρωμα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε ότι η ομάδα αιθέριου ελαίου *S. officinalis* παρουσίασε σημαντικά καλύτερη ποιότητα μνήμης από την ομάδα ελέγχου. Το μέτρο της διάθεσης προειδοποίησης εμφάνισε σημαντικές διαφορές μεταξύ των αιθέριων ελαίων και των συνθηκών ελέγχου. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι τα αιθέρια έλαια των ειδών *Salvia* αναπαράγουν μερικά, τα αποτελέσματα, που διαπιστώθηκαν μετά την *per os* χορήγηση των βοτάνων αυτών.

Οι Vandecasteele et al., (2012) σχεδίασαν μια μελέτη με σκοπό να αξιολογηθεί η επίδραση και η ασφάλεια της *S. officinalis* L. στον έλεγχο των εξάψεων, σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη που έλαβαν αγωγή με στέρηση ανδρογόνων (ADT). Δέκα ασθενείς που έπασχαν από εξάψεις συμπεριλήφθηκαν σε μια πιλοτική μονοκεντρική μελέτη και έλαβαν *per os* 150 mg εκχυλίσματος *S. officinalis* (4 mg φυτού δίνουν 1 mg

εκχυλίσματος) τρεις φορές την ημέρα για 8 εβδομάδες. Η κλινική εξέταση πραγματοποιήθηκε σε κάθε επίσκεψη και μετρήθηκε η συγκέντρωση των ορμονών που συνδέονται με ADT, της αιμοσφαιρίνης και της χοληστερόλης πριν, κατά τη διάρκεια και μετά τη λήξη της θεραπείας. Οι εξάψεις μειώθηκαν σημαντικά από την 1^η εβδομάδα έως και την 3^η εβδομάδα και διατηρήθηκε σε όλη τη διάρκεια της θεραπείας. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση στην ποιότητα ζωής των ασθενών (QOL, quality of life), ούτε αλλαγές στις τιμές πριν την έναρξη και στο τέλος της μελέτης σε: ολική χοληστερόλη, αρτηριακή πίεση (συστολική, διαστολική), αιμοσφαιρίνη, ολική και ελεύθερη τεστοστερόνη, ωχρινότροπο και ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη και σφαιρίνη δεσμεύουσα τις φυλετικές ορμόνες (SHBG) ενώ δεν υπήρχαν παρενέργειες. Συμπεραίνεται ότι η *S officinalis* είναι αποτελεσματική και ασφαλής στη θεραπεία εξάψεων ασθενών με καρκίνο του προστάτη υπό αγωγή με ADT.

Σε άλλη μελέτη εκτιμήθηκε η ανεκτικότητα και αποτελεσματικότητα νωπού παρασκευάσματος *S. officinalis* στην αντιμετώπιση εξάψεων και άλλων εμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων. Το φυτό έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για τη θεραπεία εφίδρωσης και εμμηνοπαυσιακών εξάψεων, και ως γενικό τονωτικό. Σε μια ανοιχτή, πολυκεντρική κλινική δοκιμή που διεξήχθη σε οκτώ κέντρα στην Ελβετία, 71 ασθενείς-γυναίκες, με μέση ηλικία 56,4±4,7 έτη, σε εμμηνόπαυση για τουλάχιστον 12 μήνες και με τουλάχιστον πέντε εξάψεις ημερησίως, υποβλήθηκαν σε αγωγή με ένα δισκίο 280 mg εκχυλίσματος *S. officinalis* (ισοδύναμο με 3400 mg μητρικού βάμματος, 1 μέρος δρόγης: 17 μέρη διαλύτη), ελεύθερο θουγιόνης, μία φορά ημερησίως επί 8 εβδομάδες, μετά από μία εισαγωγική εβδομάδα αναφοράς. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έντασης και συχνότητας των εξάψεων κατά 50% εντός 4 εβδομάδων, και κατά 64% εντός 8 εβδομάδων ($p < 0,0001$). Ο μέσος συνολικός αριθμός εξάψεων ημερησίως μειώθηκε σημαντικά σε κάθε εβδομάδα από την εβδομάδα 1 έως 8, Ο μέσος αριθμός ήπιων, μέτριων, σοβαρών και πολύ σοβαρών εξάψεων μειώθηκε κατά 46%, 62%, 79% και 100% σε διάστημα 8 εβδομάδων, αντίστοιχα. Η MRS (Menopause Rating Scale), τα νευροφυτικά, ψυχολογικά και ουρογεννητικά συμπτώματα μειώθηκαν σημαντικά κατά 43%, 43%, 47% και 20% αντίστοιχα. Η θεραπεία ήταν πολύ καλά ανεκτή, ενώ το παρασκεύασμα φασκόμηλου αποδείχθηκε ικανό στη θεραπεία εξάψεων και άλλων συναφών εμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων (Bommer et al. 2011).

Η τοπική εφαρμογή εκχυλίσματος *Salvia officinalis* L. σε μορφή κρέμας (Λ/Ν), εμφάνισε αποτελεσματικότητα έναντι φλεγμονωδών παθήσεων του δέρματος, όπως ψωρίαση (κατά πλάκας, σταγονοειδής, ανάστροφη, φλυκταινώδη παλαμών-πελμάτων), ροδόχρου νόσου (τύπου I και II), σημγματορροϊκής δερματίτιδας, μορφές ακμής και έκζεμα (Kallimanis 2017).

1.1.2.5 Τοξικολογικά στοιχεία

Τα εκχυλίσματα *S. officinalis* πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή και δεν πρέπει να λαμβάνονται σε μεγάλες ποσότητες ή για παρατεταμένες περιόδους. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή με τα αιθανολικά παρασκευάσματα φύλλων λόγω της παρουσίας θουγιόνης και καμφοράς (ESCOF 2003). Εάν τα συμπτώματα επιδεινωθούν ή παραμείνουν για περισσότερο από 1 εβδομάδα ή σε οποιασδήποτε περίπτωση

ασαφών συμπτωμάτων, όπως νυχτερινές εφιδρώσεις, αυξημένη θερμοκρασία σώματος ή απώλεια βάρους, θα πρέπει να υπάρξει ιατρική συμβολή (Longe 2005).

Η μακροχρόνια χρήση αιθέριου ελαίου (περισσότερο από 2 εβδομάδες τη φορά) θα πρέπει να αποφεύγεται (Longe 2005).

Μετά από παρατεταμένη κατάποση αιθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων ή αιθέριου ελαίου *S. officinalis*, μπορεί να εμφανιστούν επιληπτικοί σπασμοί (Blumenthal et al. 1998). Το αιθέριο έλαιο φασκόμηλου αναφέρεται ως μέτρια ερεθιστικό του δέρματος και δεν συνιστάται για χρήση στην αρωματοθεραπεία (Barnes et al. 2007, Newall et al. 2002).

Η νευροτοξικότητα της θουγιόνης έχει αποδειχθεί σε αρουραίους. Η *per os* μέση θανατηφόρα δόση LD₅₀ στον αρουραίο έχει αναφερθεί ότι είναι 500 mg/kg βάρους σώματος. Η θουγιόνη είναι πολύ πιο τοξική μετά από παρεντερική χορήγηση, με την ενδοφλέβια LD₅₀ σε κουνέλια να είναι ίση με 0,031 mg/kg σωματικού βάρους. Τα συμπτώματα που σχετίζονται με οξεία δηλητηρίαση είναι επιληπτικοί σπασμοί, γενική αγγειοδιαστολή, υπόταση, επιβράδυνση καρδιακού παλμού και αύξηση του αναπνευστικού πλάτους (Millet et al. 1981, European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General 2003).

Ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις θουγιόνης σε αρουραίους προκάλεσαν φλοιώδεις κρίσεις συνοδευόμενες από μυοκλονική δραστηριότητα. Οι σπασμοί και τα θανατηφόρα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε δόσεις των 200 mg/kg βάρους σώματος (European Commission, Scientific Committee on Food 2002).

Η κύρια εκδήλωση δηλητηρίασης από θουγιόνη είναι οι επιληπτικοί σπασμοί, τόσο στα ζώα όσο και στους ανθρώπους. Το όριο μη παρατηρήσιμων επιδράσεων (NOEL) για σπασμούς σε μελέτες υποχρόνιας τοξικότητας που πραγματοποιήθηκαν σε θηλυκούς αρουραίους, ήταν 5 mg/kg βάρους σώματος χορηγούμενα από το στόμα (European Commission, Scientific Committee on Food 2002).

Αποτελέσματα από μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι η LD₅₀ αιθέριου ελαίου *S. officinalis* (*per os* χρήση) και του μεθανολικού εκχυλίσματος (*ip* χορήγηση) είναι 2,6 g/kg και 4 g/kg αντίστοιχα (Mills et al. 2005, Eidi et al. 2005, Grdisa et al. 2005).

Η ασφάλεια και το αντιοξειδωτικό δυναμικό ενός εγχύματος φύλλων σάλβιας αξιολογήθηκε *in vivo* μετρώντας σε ποντικούς και αρουραίους την δραστηριότητα της τρανσαμινάσης πλάσματος, της αναγωγάσης γλουταθειόνης στο ήπαρ και της γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης. Η αντικατάσταση του νερού με το έγχυμα για 14 ημέρες, δεν επηρέασε το βάρος του σώματος ή την κατανάλωση τροφής των τρωκτικών, ούτε παρατηρήθηκε τοξικότητα στο ήπαρ. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν σημαντικές αυξήσεις στην δραστηριότητα της υπατικής γλουταθειόνης-S-τρανσφεράσης στο 24% των αρουραίων και στο 10% των ποντικών που ελάμβαναν το έγχυμα (Masaki et al. 1995).

Λαμβανομένης υπόψη της τοξικότητας του φυτού, λόγω της περιεκτικότητας σε θουγιόνη και καμφορά, τα εκχυλίσματα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή και να μην καταποθούν σε μεγάλες ποσότητες. Λόγω των γνωστών τοξικών ιδιοτήτων της θουγιόνης, της περιγραφόμενης εκτροπικής ιδιότητας της και η έλλειψη στοιχείων για την ασφαλή χορήγηση των φύλλων της *S. officinalis* και των παρασκευασμάτων της, αντενδείκνυται η χρήση της σε παιδιά και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της

γαλουχίας (Blumenthal et al. 1998, Newall et al. 1996, Farnsworth 1975, Ladygina et al. 1987, Bisset et al. 2001, Mills et al. 2005, Physicians' Desk Reference (PDR) for Herbal Medicines 2004, Halicioglu et al. 2011).

Η λήψη *S. officinalis* μπορεί να αλληλοεπιδράσει με τις υπάρχουσες υπογλυκαιμικές, αντισπασμωδικές και κατασταλτικές θεραπείες και να επηρεάσει το αποτέλεσμα τους. Επίσης, μπορεί να αλληλοεπιδράσει με το αλκοόλ. (Newall et al., 1996). Ακόμη μπορεί να παρέμβει στην απορρόφηση μετάλλων από τον οργανισμό όπως για παράδειγμα του σιδήρου (Longe 2005).

Μια αίσθηση θερμότητας, ταχυκαρδία, ίλιγγος και επιληπτικοί σπασμοί μπορεί να προκύψουν μετά από παρατεταμένη πρόσληψη αιθανολικών εκχυλισμάτων του φασκόμηλου ή του αιθέριου του ελαίου ή μέσω υπερβολικής δόσης (που αντιστοιχεί σε περισσότερα από 15 g φύλλων φασκόμηλου) (Fleming 1999, Blumenthal et al. 2000, Wichtl 2004). Μια περίπτωση ανθρώπινης δηλητηρίασης έχει καταγραφεί μετά την κατάποση αιθέριου ελαίου φασκόμηλου για την ακμή (Barnes et al. 2007). Η μέγιστη ημερήσια πρόσληψη θουγιόνης είναι 6,0 mg, για μέγιστη διάρκεια 2 εβδομάδων (Tisserand et al. 1995).

Διάφορες κλινικές δοκιμές έχουν αναφέρει ότι η κατανάλωση *S. officinalis* δεν προκαλεί σοβαρές παρενέργειες (Akhondzadeh et al. 2003, Kianbakht et al. 2011, Sá et al. 2009). Ωστόσο, στην περίπτωση παρατεταμένης χρήσης αιθανολικού εκχυλισματος ή αιθέριου ελαίου μπορεί να εμφανιστούν ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως εμετός, σιελόρροια, ταχυκαρδία, ίλιγγος, εξάψεις, αλλεργικές αντιδράσεις, κυάνωση ακόμα και σπασμοί (Bisset et al., 2001, Physicians' Desk Reference (PDR) for Herbal Medicines 2004, Mills et al. 2005). Η σπασμώδης δράση του αιθέριου ελαίου της οφείλεται στην άμεση επίδρασή του (σε δόσεις μεγαλύτερες από 0,5 g/kg) στο νευρικό σύστημα (Mills et al. 2005).

Έχει αναφερθεί ότι έγχυμα *S. officinalis* ενισχύει την επαγόμενη από το CCl₄ ηπατοτοξικότητα σε ποντίκια (Lima et al. 2007). Ωστόσο, στις κλινικές μελέτες η χρήση της δεν έχει ηπατοτοξική δράση (Kianbakht et al. 2011, Sá et al. 2009).

1.1.2.6 Φαρμακευτικές μορφές: ενδείξεις και δοσολογία

Τα ακόλουθα φυτικά παρασκευάσματα βρίσκονται στην ευρωπαϊκή αγορά για μια περίοδο άνω των 30 ετών και προτείνονται από τη μονογραφία παραδοσιακής χρήσης EMA:

- Υγρό εκχύλισμα (DER 1: 1), διαλύτης εκχύλισης αιθανόλη 70% v/v
- Ξηρό εκχύλισμα (DER 4-7: 1), διαλύτης εκχύλισης νερό
- Υγρό εκχύλισμα (DER 1: 3,5-5), διαλύτης εκχύλισης αιθανόλη 31,5% v/v
- Υγρό εκχύλισμα (DER 1: 4-5) διαλύτης εκχύλισης αιθανόλη 50% v/v
- Υγρό εκχύλισμα (DER 1: 4-6), διαλύτης εκχύλισης, οίνος : αιθανόλη 96% v/v (DER 38,25: 61,75 m/m)
- Βάμμα (1:10) διαλύτης εκχύλισης αιθανόλη 70% v/v
- Ξηρό εκχύλισμα νωπών φύλλων (1: 17-18), διαλύτης εκχύλισης αιθανόλη 68% v/v

Για τα φύλλα της *Salvia officinalis* L. έχουν καταγραφεί σε διάφορα εγχειρίδια οι ακόλουθες παραδοσιακές χρήσεις και δοσολογίες (πίνακες 4, 5).

Πίνακας 4

Ενδείξεις και δοσολογία των παρασκευασμάτων των φύλλων της *Salvia officinalis* σύμφωνα με τα διεθνή εγχειρίδια.

Παραδοσιακή χρήση	Δοσολογία	Διάρκεια χορήγησης	Εγχειρίδιο αναφοράς
<u>Τοπική:</u> Φλεγμονές και λοιμώξεις του στόματος και του λαιμού (στοματίτιδα, ουλίτιδα, φαρυγγίτιδα)	<u>Τοπική χρήση:</u> έγχυμα: 3 g δρόγης σε 150 mL νερού για πλύσεις της στοματικής κοιλότητας και του φάρυγγα.		Μονογραφίες ESCOP (2003)
<u>Εσωτερική/συστηματική:</u> Υπερίδρωση	<u>Χρήση per os:</u> σε υπεριδρωση: -Βάμμα: (1:10) σε 55% αιθανόλη, 75 σταγόνες ημερησίως -Έγχυμα: 1-1,5 g αποξηραμένου φυτού σε 150 mL νερού, μία ή περισσότερες φορές ημερησίως -Ξηρό εκχύλισμα: 160 mg ξηρού υδατικού εκχυλίσματος που αντιστοιχεί σε 880 mg δρόγης, τρεις φορές ημερησίως	<u>Διάρκεια:</u> Σε υπεριδρωσία, συνιστάται θεραπεία για 2-4 εβδομάδες, χρησιμοποιώντας υδατικό παρασκεύασμα	
<u>Εξωτερική:</u> Φλεγμονές του βλεννογόνου του στόματος ή του φάρυγγα (φαρυγγίτιδα, αμυγδαλίτιδα, στοματίτιδα, ουλίτιδα, γλωσσίτιδα) <u>Εσωτερική/συστηματική:</u> -Διαταραχές του πεπτικού συστήματος (δυσπεψία, μετεωρισμός, φούσκωμα). -Για τη μείωση της υπερβολικής εφίδρωσης, π.χ. στην εμμηνόπαυση. -Ως ήπιο, διεγερτικό τονωτικό.	<u>Τοπική χρήση:</u> για πλύσεις της στοματικής κοιλότητας και γαργάρες στο φάρυγγα: 2,5 g ξηρού φύλλου σε 100 mL νερού ως έγχυμα <u>Εσωτερική ημερήσια δόση:</u> 3-6 g ξηρών φύλλων, συνήθως ως έγχυμα υγρό εκχύλισμα 1:1 σε 45% αιθανόλη, 2-6 mL	<u>Διάρκεια:</u> Δεν υπάρχουν πληροφορίες	British Herbal Compendium, (Bradley, 2006)

Παραδοσιακή χρήση	Δοσολογία	Διάρκεια χορήγησης	Εγχειρίδιο αναφοράς
<p><u>Τοπική:</u> Φλεγμονές του στοματικού και φαρυγγικού βλεννογόνου</p> <p><u>Εσωτερική/συστηματική:</u> Διαταραχές του πεπτικού συστήματος με ήπιους σπασμούς στο γαστρεντερικό σωλήνα, αίσθημα διαστολής, μετεωρισμός. Υπερβολική εφίδρωση.</p>	<p>Για χρήση στο στόμα και στο <u>λαιμό:</u> ως έγχυμα, 100 mL βραστό νερού σε 1,5 κουταλάκι του γλυκού (περίπου 2,5g) φασκόμηλου, το αφήνουμε για περίπου 10-15 λεπτά και σουρώνουμε</p> <p>Εκτός εάν ορίζεται διαφορετικά, πίνετε ένα φλιτζάνι έγχυμα 3-4 φορές την ημέρα, που έχει παραχθεί ως εξής: σε 150 mL βραστό νερού βάζουμε 1 κουταλάκι του γλυκού (περίπου 1,5 g) φύλλων φασκόμηλου, το αφήνουμε για περίπου 10-15 λεπτά και σουρώνουμε</p>	<p>Διάρκεια: Σε οξείες περιπτώσεις που διαρκούν περισσότερο από μία εβδομάδα ή επανεμφανίζονται περιοδικά, συνιστάται να ζητήσετε ιατρική συμβουλή</p>	Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals (Wichtl, 2004)
<p><u>Εσωτερική/συστηματική:</u> δυσπεψία, γαλακτόρροα, υπεριδρωσία</p> <p><u>Τοπική:</u> στοματικό διάλυμα (φαρυγγίτιδα, σταφυλίτιδα, στοματίτιδα, ουλίτιδα, γλωσσίτιδα)</p>	<p>1-4 g ως έγχυμα τρεις φορές την ημέρα. 4-6 g ημερησίως Υγρό εκχύλισμα: 1-4 mL (1:1 σε αλκοόλη 45%) τρεις φορές ημερησίως</p> <p>Για γαργάρες και πλύσεις: 2,5 g/100 mL νερού</p>	<p>Διάρκεια: Δεν υπάρχουν πληροφορίες</p>	Herbal Medicine, (Barnes et.al. 2002, 2007)
<p><u>Εσωτερική/συστηματική:</u> Για την νυχτερινή εφίδρωση κατά τη διάρκεια της εμμηνόπαυσης. Αναστολή της γαλουχίας Γαστρεντερικές διαταραχές.</p> <p><u>Τοπική:</u> Αναινευστικά νοσήματα και φλεγμονές στο στόμα και στο λαιμό</p>	<p>Συνήθης δόση: Βάμμα: 60 σταγόνες ημερησίως (1) 30-50 σταγόνες αρκετές φορές την ημέρα (2) Ως έγχυμα: 2-3 κουταλιές (= 3,4-5,1g) των φύλλων</p>	<p>Διάρκεια: Δεν υπάρχουν πληροφορίες</p>	Lehrbuch der Biologischen Heilmittel, Madaus 1938 (1) Η αναφερθείσα πηγή είναι η Krahn 1896 (2) Η αναφερθείσα πηγή είναι η Hager
<p><u>Εσωτερική/συστηματική:</u> Για συμπτωματική αντιμετώπιση της ήπιας δυσπεψίας,</p>	<p>Βάμμα (1:10), διαλύτης εκχύλισης: αιθανόλη 70% V / V, βάμμα (1:10) 2,5-7,5 g ημερησίως, διαιρούμενο σε 3 δόσεις.</p>	<p>Διάρκεια Δεν υπάρχουν πληροφορίες</p>	Ph. Eur 2008 και Deutsches Arzneibuch 6, Ausgabe 1926, Το Spiritus dilutus είναι αιθανόλη 68-69% (v / v) = 60-61% (m / m).

Παραδοσιακή χρήση	Δοσολογία	Διάρκεια χορήγησης	Εγχειρίδιο αναφοράς
<p>όπως καούρα και φούσκωμα</p> <p><u>Τοπική:</u> Για συμπτωματική θεραπεία φλεγμονών στο στόμα ή στο λαιμό</p>	<p>5-10 γραμμάρια (1-2 κουταλιές) βάμματος, αραιωμένα σε ένα ποτήρι νερό, για γαργάρες και πλύσεις.</p> <p>το βάμμα (1:10) αδιάλυτο, για άμεση εφαρμογή στα ούλα</p>		<p>Πληροφορίες σχετικά με αυτό το βάμμα υπάρχουν σε προγενέστερες γερμανικές φαρμακοποιίες (Ergänzungsbuch zum Deutschen Arzneibuch, Erg B. 6, Stuttgart 1956, 1958)</p>

* 1 σταγόνα ισοδύναμη με 0,05-0,1 mL

Πίνακας 5

Ενδείξεις και δοσολογία των παρασκευασμάτων των φύλλων της *S. officinalis* L. σύμφωνα με την χρήση τους στις χώρες της Ευρώπης για πάνω από 30 χρόνια.

Δρόγη/παρασκευάσματα	Ένδειξη	Δοσολογία	Δόση	Ημερήσια δόση	Χώρα
Τεμαχισμένη δρόγη	Για την συμπτωματική αντιμετώπιση ήπιων δυσπεπτικών προβλημάτων όπως καούρα και μετεωρισμός.	Για χρήση <i>per os</i> ως έγχυμα, 1-3 g 3 φορές την ημέρα.	1-3 g	3-9 g	Στη Γερμανία από το 1976 ως καλά τεκμηριωμένη χρήση
		Για χρήση <i>per os</i> ως έγχυμα, 1-1,5 g 2-3 φορές την ημέρα.	1-1,5 g	2-5 g	Στην Ισπανία από το 1978, αναφερόμενη ως παραδοσιακή χρήση
Τεμαχισμένη δρόγη	Για την αντιμετώπιση ήπιων φλεγμονών στο δέρμα	Για τοπική εφαρμογή ως έγχυμα ή αφέψημα σε κομπρέσα: 2 κουταλιές της δρόγης σε ένα ποτήρι νερό.	2 κουταλιές	2 κουταλιές	Στην Πολωνία από το 1978, αναφερόμενη ως παραδοσιακή χρήση
Τεμαχισμένη δρόγη	Για την ανακούφιση από την έντονη εφίδρωση	Για χρήση <i>per os</i> ως έγχυμα, 2 g σε 160 mL νερού	2 g	2 g	Στη Γερμανία από το 1976 ως καλά τεκμηριωμένη χρήση
Τεμαχισμένη δρόγη	Για την συμπτωματική αντιμετώπιση των φλεγμονών στην στοματική κοιλότητα και στο λαιμό.	Ως έγχυμα για πλύσεις στον στοματοφάρυγγα, 2,5 g σε 100 mL νερού	2,5 g	2,5 g	Στη Γερμανία από το 1976 ως καλά τεκμηριωμένη χρήση

Υγρό εκχύλισμα (1:1), διαλύτης εκχύλισης η αιθανόλη 70% v/v	Για την συμπτωματική αντιμετώπιση των φλεγμονών στην στοματική κοιλότητα και στο λαϊμό.	250 mg γέλης (μέγεθος μπιζελιού), για επάλειψη στις πάσχουσες περιοχές πάνω από 5 φορές την ημέρα	250 mg	1250 mg	Στη Γερμανία από το 1976 ως καλά τεκμηριωμένη χρήση
Ξηρό εκχύλισμα (4-7:1), διαλύτης εκχύλισης το νερό	Για την συμπτωματική αντιμετώπιση ήπιων δυσπεπτικών προβλημάτων όπως καούρα και μετεωρισμός	<i>Per os</i> , 320 mg, διαφερένα σε 3-4 δόσεις ημερησίως.	80-106 mg	320 mg	Στη Γερμανία από το 1976 ως καλά τεκμηριωμένη χρήση
Υγρό εκχύλισμα (1:3,5-5), διαλύτης εκχύλισης η αιθανόλη 31,5% v/v	Για την συμπτωματική αντιμετώπιση ήπιων δυσπεπτικών προβλημάτων όπως καούρα και μετεωρισμός	<i>Per os</i> , 10 σταγόνες, διαλυμένες σε κάποιο υγρό μέσο, 3 φορές ημερησίως	10 σταγόνες	30 σταγόνες	Στη Γερμανία από το 1976 ως καλά τεκμηριωμένη χρήση
	Για την ανακούφιση από την έντονη εφίδρωση	<i>Per os</i> , 10-20 σταγόνες, διαλυμένες σε κάποιο υγρό μέσο, 3 φορές ημερησίως Για τη νυχτερινή εφίδρωση, 30 σταγόνες διαλυμένες σε κάποιο υγρό μέσο, μια ώρα ή ακριβώς πριν την κατάκλιση.	10-20 σταγόνες 30 σταγόνες	30-60 σταγόνες 30 σταγόνες	Στη Γερμανία από το 1976 ως καλά τεκμηριωμένη χρήση
Υγρό εκχύλισμα (1:4-5), διαλύτης εκχύλισης η αιθανόλη 50% v/v.	Για την ανακούφιση από την έντονη εφίδρωση	<i>Per os</i> , 50 σταγόνες (= 2 mL), 3 φορές ημερησίως	50 σταγόνες	150 σταγόνες	Στη Γερμανία από το 1976 ως καλά τεκμηριωμένη χρήση
Υγρό εκχύλισμα (1: 7,2), διαλύτης εκχύλισης, οίνος : αιθανόλη 96% v/v (38,25: 61,75 m/m)	Για την συμπτωματική αντιμετώπιση ήπιων δυσπεπτικών προβλημάτων όπως καούρα	<i>Per os</i> , 20 σταγόνες, 3 φορές ημερησίως	20 σταγόνες	60 σταγόνες	Στη Γερμανία από το 1976 ως καλά τεκμηριωμένη χρήση

	και μετεωρισμός				
	Για την συμπτωματική αντιμετώπιση των φλεγμονών στην στοματική κοιλότητα και στο λαιμό.	Για πλύσεις της στοματικής κοιλότητας και γαργάρες: 3 κουταλάκια (15 mL) σε ένα ποτήρι νερό			Στη Γερμανία από το 1976 ως καλά τεκμηριωμένη χρήση
Βάμμα (1:10) διαλύτης εκχύλισης η αιθανόλη 70% v/v	Για την συμπτωματική αντιμετώπιση ήπιων δυσπεπτικών προβλημάτων όπως καούρα και μετεωρισμός Για την συμπτωματική αντιμετώπιση των φλεγμονών στην στοματική κοιλότητα και στο λαιμό.	<i>Per os</i> , 2-3 mL σταγόνες, 3 φορές ημερησίως Για πλύσεις της στοματικής κοιλότητας και γαργάρες: 3 κουταλάκια (15 mL) σε ένα ποτήρι νερό	2-3 mL	6-9 mL	Ph. Eur monograph Deutsches Arzneibuch 6, Ausgabe 1926, German Pharmacopoeias (Ergänzungsbuch zum Deutschen Arzneibuch (Erg. B. 6, Stuttgart 1956, 1958,))

Υπάρχει έλλειψη στοιχείων ασφαλείας και τοξικότητας για την μακροπρόθεσμη χρήση της *S. officinalis* L., επομένως συνιστώνται οι κάτωθι περιορισμοί:

- Χρήση στο βλεννογόνο: έως 1 εβδομάδα
- Από στόματος χρήση: έως 2 εβδομάδες
- Τοπική εφαρμογή: 2 εβδομάδες
- Στοματοφάρυγγας: 1 εβδομάδα

Τα φύλλα φασκόμηλου δεν συνιστανται για χρήση από το στόμα σε παιδιά και εφήβους κάτω των 18 ετών λόγω έλλειψης επαρκών στοιχείων.

1.1.3 *Rosmarinus officinalis* L. (syn. *Salvia rosmarinus* Spenn., Δεντρολίβανο, Rosemary)

1.1.3.1 Δρογοβοτανική

Το *Rosmarinus officinalis* L. (δεντρολίβανο το φαρμακευτικό, γενικά γνωστό ως δεντρολίβανο, κοινό δεντρολίβανο) είναι ένα αρωματικό φυτό που ανήκει στην

οικογένεια των Χειλανθών (Lamiaceae) (Begum et al. 2013, Ulbricht et al. 2010). Το φυτό έχει χρησιμοποιηθεί από την αρχαιότητα τόσο στη μαγειρική όσο και στην φαρμακευτική-ιατρική (Holmes 1999).



Εικόνα 5

Αποικία καλλιεργημένου *R. officinalis* (από το βοτανικό κήπο Διομήδους ΕΚΠΑ)

Αποτελεί αειθαλή πολυετή, πυκνόφυλλο και πολύκλαδο θάμνο, με ύψος που δε ξεπερνά τα 2 m. Τα φύλλα του είναι δερματώδη, μικρά, γραμμοειδή (μοιάζουν με πευκοβελόνες). Η πάνω επιφάνεια των φύλλων έχει χρώμα βαθυπράσινο ενώ η κάτω επιφάνεια λευκόφαιο. Τα άνθη βρίσκονται κατά ομάδες στις μασχάλες των φύλλων με χρώμα ιώδες, κυανόλευκο ή λευκό. Η κορώνα είναι διχαλωτή και οι στήμονες κάμπτονται προς τα έξω πέρα από την κορώνα. Τα κλαδιά του θάμνου μετά το δεύτερο χρόνο γίνονται ξυλώδη. Το φυτό μπορεί να αναπτυχθεί σε άμμο, βράχους, από πεδινές περιοχές έως 600 m υψόμετρο, σε διάφορα μέρη του κόσμου (π.χ. Ευρώπη, Αφρική και Ασία). Τα φύλλα και τα άνθη έχουν έντονη χαρακτηριστική οσμή που οφείλεται στο αιθέριο έλαιο που περιέχουν, ενώ η γεύση τους είναι ελαφρώς πικρή και λίγο καυτερή. Η κύρια ανθοφορία του φυτού πραγματοποιείται νωρίς την άνοιξη (Απρίλιος-Μάιος) ενώ υπάρχει και δεύτερη ανθοφορία μικρότερης έκτασης το φθινόπωρο (Οκτώβριος-Νοέμβριος). Η καταγωγή του είναι από περιοχές της Μεσογείου αλλά σήμερα καλλιεργείται ευρέως ως καλλωπιστικό σε όλη σχεδόν την Ευρώπη και τις εύκρατες περιοχές της Αμερικής. Τα άνθη του προτιμώνται από τις μέλισσες και γίνονται πηγή για την παραγωγή μελιού (Arnold et al. 1997, Lorenzi et al. 2006, Marin et al. 2006, Díaz-Maroto et al. 2007, Bakirel et al. 2008, Miraldi et al. 2010, Begum et al. 2013).

Το δεντρολίβανο ανήκει στα πλέον εκμεταλλεζόμενα φυτικά είδη λόγω του πολύτιμου αιθέριου ελαίου, του φαινολικού περιεχομένου του και της ισχυρής αντιοξειδωτικής του δράσης (Zaouali et al. 2010).

Η λέξη *Rosmarinus* προέρχεται από τη λατινική λέξη *ros-roris* (δροσιά) και *marinus* (θαλάσσιος), και σημαίνει «δροσιά της θάλασσας», γιατί πιστευόταν ότι το φυτό μπορεί να αναπτυχθεί χωρίς πότισμα, αρκούμενο μόνο στην υγρασία που έρχεται από τη θάλασσα (Begum et al. 2013, Pintore et al. 2002). Το επιστημονικό του όνομα *Rosmarinus officinalis* L. το οφείλει στον Κάρολο Λινναίο. Στην αρχαία Ελλάδα

το συναντούμε ως λιβανωτίς (Διοσκουρίδης) λόγω της μυρωδιάς του θυμιάματος (Begum et al. 2013, Pintore et al. 2002).

Στον Ελλαδικό χώρο συναντούμε το δεντρολίβανο και ως λιβανόδεντρο, διοσμαρίνι, λασμαρί, αρισμαρί, λεσμαρί, λιβανωτίς (Καββαδάς 1936).

1.1.3.2 Δρογοϊστορία

Η χρήση του *R. officinalis* L. είναι τόσο παλιά όσο η ανθρώπινη ιστορία και χρονολογείται από το 5000 π.Χ. Στην πρώτη φαραωνική δυναστεία της αρχαίας Αιγύπτου, κλαδιά δεντρολίβανου τοποθετούνταν στους τάφους των Φαραώ για να αρωματίσουν το ταξίδι τους στη μεταθανάτια ζωή (Ambrose et al. 2016, Muñoz-Centeno 2002).

Μέσω των Ρωμαίων η χρήση του δεντρολίβανου έφτασε στη Βρετανία και από εκεί εξαπλώθηκε σε ολόκληρη την Ευρώπη και μεταγενέστερα στον Νέο Κόσμο. Οι Ευρωπαίοι από την αρχαιότητα χρησιμοποίησαν το δεντρολίβανο για τη βελτίωση της κυκλοφορίας του αίματος και για την ενίσχυση των αγγείων (Ambrose et al. 2016, Muñoz-Centeno 2002). Επίσης, συνδέεται με το γάμο και την αγάπη και χρησιμοποιείται ακόμα σε νυφικές ανθοδέσμες αλλά και στην κούνια ενός νέου μωρού για προστασία από τις κακές επιρροές και δυνάμεις (Al-Sereitia et al. 1999).

Οι ανθρωπολόγοι και οι αρχαιολόγοι απέδειξαν ότι στην αρχαία Αίγυπτο, την Κίνα, την Ινδία και τη Μεσοποταμία, αυτό το αρωματικό φυτό χρησιμοποιήθηκε ως καρύκευμα στη μαγειρική, ως φάρμακο και ως καλλυντικό (Stefanovits-Banyai et al. 2003).

Οι Έλληνες συνήθιζαν να καίνε κλαδιά δεντρολίβανου στους ναούς τους κατά τη διάρκεια των τελετών αφιερωμένες στη θεά του έρωτα Αφροδίτη. Οι μαθητές φορούσαν κλαδάκια δεντρολίβανου στα μαλλιά τους και γύρω από το λαιμό τους ενώ μελετούσαν για την βελτίωση της μνήμη τους. Οι αρχαίοι Έλληνες το χρησιμοποίησαν σε διάφορες άλλες θρησκευτικές τελετές και γιορτές, σε στολισμούς κτηρίων και ναών, και ως πρώτη ύλη για θυμίαμα. Επίσης χρησιμοποιήθηκε τοπικά για τη θεραπεία του καρκίνου. Οι Άραβες πίστευαν επίσης ότι το δεντρολίβανο βοηθούσε τον εγκέφαλο και την μνήμη (Hartwell 1982, Santayana et al. 2006, Schiller et al. 2008, Nozedar 2008, Lax 2014, Ribeiro-Santos et al. 2015).

Το 1330, ο Ramon Llull (1232-1316) έλαβε το αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου για πρώτη φορά και έκτοτε χρησιμοποιείται σε αρώματα (Ambrose et al. 2016, Muñoz-Centeno 2002).

Κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου, στα γαλλικά νοσοκομεία έκαigan μίγματα φύλλων δεντρολίβανου και καρπούς άρκευθου (*Juniperus communis* L.) ως μικροβιοκτόνα (Schiller et al. 2008).

Σε διάφορες περιοχές του κόσμου, η χρήση του δεντρολίβανου ποικίλλει. Στην παραδοσιακή ελληνική και ευρωπαϊκή ιατρική χρησιμοποιήθηκε ως τονωτικό, ως διεγερτικό, ως άφουσο, για τη δυσπεψία, την κεφαλαλγία και τη νευρική ένταση. Στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική, το δεντρολίβανο χρησιμοποιήθηκε για την ανακούφιση από τον πονοκέφαλο. Στην ινδική Materia Medica το έλαιο δεντρολίβανου περιγράφεται ότι έχει άφουση και διεγερτική δράση (Nadkarni 1999).

Υπήρχαν ιατροί που χρησιμοποιούσαν το αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου, από 2 έως 10 σταγόνες ανά δόση, για κολικούς, νευρικές διαταραχές αλλά και στην επώδυνη ή καθυστερημένη εμμηνόρροια (Felter et al. 1983). Οι γυναίκες χρησιμοποιούσαν το δεντρολίβανο για μικρές εμμηνορροϊκές ενοχλήσεις. Το δεντρολίβανο χρησιμοποιείται ως εκτρωτικός παράγοντας στη λαϊκή ιατρική της Βραζιλίας (Ribeiro-Santos et al. 2015).

Υποστηρίζεται ότι διεγείρει τη χολή. Στη λαϊκή ιατρική, το δεντρολίβανο τοποθετείται σε επιδέσμους για την επούλωση τραυμάτων αλλά και για το έκζεμα. Χρησιμοποιείται επίσης ως εντομοκτόνο, ως συντηρητικό τροφίμων και λιπών και ελαίων (Chandler 1985, Erenmemisoglu et al. 1997, Wichtl 2004).

Το δεντρολίβανο χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ανάκτηση της ομιλίας, την ενίσχυση της εμμηνόρροιας, την τόνωση της τριχοφυΐας, τη βελτίωση της πέψης, κατά των μετεωρισμών και των ηπατικών διαταραχών (Heinrich et al. 2006). Το δεντρολίβανο καλλιεργήθηκε παγκοσμίως πολλά χρόνια πριν και με την πάροδο του χρόνου εισήχθη ως φυτό κήπου, αφού το άρωμά του είναι αρκετά ευχάριστο (Begum et al. 2013, Heinrich et al. 2006, Moreno et al. 2012, Ulbricht et al. 2010).

1.1.3.3 Δρογοχημεία

Η δρόγη του *Rosmarinus officinalis* L. είναι τα αποξηραμένα του φύλλα, ολόκληρα ή θρυμματισμένα.

Έχουν αναφερθεί τα ακόλουθα συστατικά: (Bradley 2006)

- Πτητικές ενώσεις: Το αιθέριο έλαιο (0,4-2,4%) που απομονώθηκε από τα φύλλα αποτελείται κυρίως από 1,8-κινεόλη, καμφορά και α-πινένιο
- Φλαβονοειδή: 7-μεθυλαπιγενίνη, εσπεριδίνη, διοσμίνη
- Φαινολικά οξέα: κυρίως ροσμαρινικό οξύ (1,0- 2,5%) και καφεϊκό οξύ (0,7%)
- Διτερπένια αβιετανίου: καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, ροσμανόλη, 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ, 7-O-μεθύλ-*epi*-ροσμανόλη, *epi*-ροσμανόλη
- Τριτερπένια : μπετουλινικό οξύ, ουρσολικό οξύ και ολεανολικό οξύ.

Μελέτες έχουν επισημάνει τη μεταβλητότητα του προφίλ της σύνθεσης και της απόδοσης του ελαίου/εκχυλίσματος του *R. officinalis*, λόγω της επίδρασης διαφόρων παραγόντων όπως η διαδικασία εκχύλισης, το μέρος του φυτού που χρησιμοποιήθηκε, η γεωγραφική προέλευση, ο χρόνος συγκομιδής, το στάδιο της ανάπτυξης του φυτού και η ηλικία του (Flamini et al. 2002, Khajeh et al. 2005, Elzaawely et al. 2007, Hussain et al. 2008, Mulinacci et al. 2011, Negi 2012, Riahi et al. 2013). Επίσης, η σύσταση μπορεί να επηρεαστεί και από τις συνθήκες αποθήκευσης (νωπά, αποξηραμένα ή κατεψυγμένα), τη μέθοδο ξήρανσης και τον τύπο του διαλύτη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση (Celiktas et al. 2007, Szumny et al. 2010, Mulinacci et al. 2011, Dumbrava et al. 2012).

Η συνολική περιεκτικότητα σε διτερπένια επηρεάζεται αρνητικά από την παρουσία νερού κατά την εκχύλιση, επειδή ευνοεί τη μετατροπή του καρνοσικού οξέος προς την οξειδωμένη μορφή του, την καρνοσόλη (Mulinacci et al. 2011). Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται στη διαδικασία εκχύλισης έχει σημαντική επίδραση στις δραστικές ενώσεις/μεταβολίτες του εκχυλίσματος δεντρολίβανου. Το ξηρό ακετονικό του εκχύλιμα έδειξε υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και μεγαλύτερη

ποσότητα σε συνολικές φαινόλες, καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη και αιθέριο έλαιο σε σύγκριση με το μεθανολικό εκχύλισμα (Teruel et al. 2015).

Πίνακας 6

Περιεκτικότητες των σημαντικότερων μεταβολιτών του *R. officinalis* L.

Ουσία	Μονάδες	Αποτέλεσμα	Αναφορά
Καρνοσικό οξύ καρνοσόλη	mg/100 g αποξηραμένα φύλλα	4205 387	Okamura et al., (1994)
Καρνοσικό οξύ καρνοσόλη	mg/100 g φρέσκα φύλλα	2279 238	Okamura et al., (1994)
Ροσμαρινικό οξύ	mg/100 ξηρό μεθανολικό εκχύλισμα	700	Zgórka et al., (2001)
καφεϊκό οξύ Ροσμαρινικό οξύ Καρνοσικό οξύ	mg/100 g φρέσκα φύλλα	2,95 32,8 127	Zheng et al., (2001)
Ροσμαρινικό οξύ καφεϊκό οξύ	mg/100 g αποξηραμένα φύλλα	1000–1100 10–20	Wang et al., (2004)
καφεϊκό οξύ	mg/100 g ξηρού εκχυλισματος	8	Kivilompolo et al., (2007)
καφεϊκό οξύ λουτεολίνη Απιγενίνη	mg/100 g αποξηραμένα φύλλα	406 616 43,8	Wojdylo et al., (2007)
καφεϊκό οξύ Ροσμαρινικό οξύ καρνοσόλη Καρνοσικό οξύ	mg/100 g φρέσκα φύλλα	1,2 208 58 1218	Luis et al., (2007)
Ουρσολικό οξύ ολεανολικό οξύ Μπετουλινικό οξύ Καρνοσικό οξύ καρνοσόλη Ροσμαρινικό οξύ	mg/g ξηρό εκχύλισμα (διαλύτες: κανονικό εξάνιο και οξικός αιθυλεστέρας)	190,1 89,7 46,9 177,3 21,5 11,6	Kontogianni et al., (2013)

1.1.3.4 Δρογοφαρμακολογία

Το φυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί φρέσκο, αποξηραμένο, ως εκχύλισμα ή ως ΕΟ (essential oil, αιθέριο έλαιο) (Szumny et al. 2010, Amaral et al. 2013, Barreto et al. 2014).

Οι βιολογικές δράσεις του αποδίδονται σε δύο ομάδες ενώσεων: το πιπτικό κλάσμα και τις φαινολικές ενώσεις. Αυτή η τελευταία ομάδα περιέχει κυρίως ένα κλάσμα φλαβονοειδών, το ροσμαρινικού οξύ και μερικές διτερπενικές ενώσεις όπως

είναι τα: καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, ροσμανόλη κ.ά. (Romo et al. 2012, Arranz et al. 2015, Babovic et al. 2010, Teixeira et al. 2013).

Η επίδραση των διαιτητικών πολυφαινολών στην ανθρώπινη υγεία και των πτητικών ενώσεων στην ποιότητα/συντήρηση τροφίμων είναι ευρέως αποδεκτή. Επίσης οι ενώσεις έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν θετικά την πρόληψη πολλών διαφορετικών χρόνιων παθήσεων και ότι παρατείνουν την διάρκεια ζωής των τροφίμων (Babovic et al. 2010).

Οι βιολογικές δράσεις του αιθερίου ελαίου αποδίδονται συχνά στις κύριες ενώσεις του (Burt 2004, Ojeda-Sana et al. 2013). Εντούτοις, η βιοδραστικότητα του αιθερίου ελαίου μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της συνέργειας διαφόρων μεταβολιτών μιας και υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι τα δευτερεύοντα συστατικά παίζουν σημαντικό ρόλο στη τελική δραστηριότητα (Hussain et al. 2010, Ojeda-Sana et al. 2013).

1.1.3.4.1 Στοιχεία από την παραδοσιακή ιατρική

Στην παραδοσιακή ιατρική το *R. officinalis* χρησιμοποιείται κυρίως ως αντιφλεγμονώδες, για την αντιμετώπιση κεφαλαλγίας, κοιλιακού άλγους, ως αντισπασμωδικό, κατά της αρθρίτιδας, επούλωσης τραυμάτων, ως χολαιρετικό, διουρητικό, αναλγητικό, αντιρευματικό και αντικαταθλιπτικό (Holmes et al. 1999, Peng et al. 2007, González-Trujano et al. 2007, Karakurum et al. 2014, Martínez et al. 2012, Sasikumar 2012).

Το νερό της Ουγγαρίας, το πρώτο Ευρωπαϊκό άρωμα με βάση την αλκοόλη, παρασκευάστηκε από δεντρολίβανο και θεωρήθηκε ως ένας παράγοντας αναζωογόνησης. Το αρωματικό (αποσταγμένο) νερό που λαμβάνεται από τα άνθη του δεντρολίβανου χρησιμοποιήθηκε στη κοσμητολογία (για τα μάτια) (Sasikumar 2012).

Στην παραδοσιακή ιατρική είναι γνωστές οι θεραπευτικές ιδιότητες του έναντι κοιλιακού πόνου φλεγμονωδών ασθενειών του αναπνευστικού, όπως το βρογχικό άσθμα (Zanella et al. 2012).

Οι Karakurum et al. (2014), ανέφεραν ότι η θεραπεία με δεντρολίβανο είναι γνωστή στο 23,6% των ασθενών στην Τουρκία και χρησιμοποιείται συχνά σε ασθενείς με ημικρανία.

Στο Λίβανο, 28 είδη φυτών θεωρήθηκαν ως τα πιο σημαντικά, συμπεριλαμβανομένου του δεντρολίβανου που χρησιμοποιείται ευρέως ως αντιρευματικό και αντινευραλγικό (Marc et al. 2008).

Σε έρευνα που έγινε σε 1883 εξωτερικούς ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη (ΣΔ) σε 7 νοσοκομεία της Παλαιστίνης, βρέθηκε ότι το *R. officinalis* L. ήταν το δεύτερο (n= 132, 13,5%), σε σειρά από τα συνηθέστερα φυτά που χρησιμοποιούνται για την συγκεκριμένη πάθηση. Από τους συμμετέχοντες, το 51,9% (n= 977) ανέφερε ότι αγόραζαν βότανα για την αντιμετώπιση του ΣΔ, κατά κύριο λόγο από την Παλαιστίνη (98%), και τα χρησιμοποιούσαν κυρίως ως αφέψημα (44,1%) (Ali-Shtayeh et al. 2012).

Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων έχει μονογραφίες για το *R. officinalis* L. (EMA, 2010) και ειδικότερα τα φύλλα και το αιθέριο του έλαιο περιγράφονται για τη χρήση τους ως παραδοσιακά φυτικά φάρμακα. Σύμφωνα με αυτή, το *R. officinalis* L. χρησιμοποιείται παραδοσιακά για τη συμπτωματική ανακούφιση της δυσπεψίας και των ήπιων σπασμωδικών διαταραχών της γαστρεντερικής οδού, ενώ τοπικά ως

πρόσθετο λουτρού για την ανακούφιση του ήπιου μυϊκού και αρθρικού πόνου και σε ήπιες κυκλοφορικές διαταραχές. Η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (2005) περιλαμβάνει δύο μονογραφίες, μία για τα φύλλα δεντρολίβανου (*Rosmarini folium*) και μία για το αιθέριο έλαιο (*Rosmarini aetheroleum*).

Οι Babovic et al., (2010) στο αντιοξειδωτικό κλάσμα που απομονώθηκε από τα φύλλα δεντρολίβανου βρήκαν κυρίως καρνοσικό οξύ (46,9%), καρνοσόλη (21,8%), καρνοσικό μεθύλιο και 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ (12,2%).

1.1.3.4.2 Στοιχεία από μελέτες *in vitro* και *in vivo* σε πειραματόζωα

Α. Αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση

Οι πτητικές ενώσεις 1,8-κινεόλη, κάμφορα, ευγενόλη και το α-πινένιο (Azeredo et al. 2011, Ojeda-Sana et al. 2013, Teixeira et al. 2013, Abdollahzadeh et al. 2014) και οι φαινολικές ενώσεις του καρνοσικού οξέος (Rožman et al. 2009) έχουν συσχετιστεί με την αντιμικροβιακή δράση του *R. officinalis* L.

Το αιθέριο έλαιο έδειξε ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση συγκρινόμενο με την 1,8-κινεόλη, το κύριο συστατικό του (Hussain et al. 2010). Αυτό μπορεί να οφείλεται στη συνεργική επίδραση των συστατικών του αιθέριου ελαίου δείχνοντας το σημαντικό ρόλο τους στη τελικά εμφανιζόμενη αντιβακτηριακή δράση (Burt 2004). Το *R. officinalis* L. ήταν αποτελεσματικό έναντι των βακτηρίων: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella poona*, *Escherichia coli* (Hussain et al. 2010), *Listeria innocua*, *Bacillus thermophacta*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus putrefaciens* (Teixeira et al. 2013) και των μυκήτων *Aspergillus flavus* και *Aspergillus niger* (Souza et al. 2013).

Η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος δεντρολίβανου ήταν σημαντικά υψηλότερη από τα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται συνήθως σε τρόφιμα όπως το βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο (BHT) και το βενζοϊκό οξύ (Romano et al. 2009). Ωστόσο, το ΕΟ του δεντρολίβανου εμφανίστηκε λιγότερο αποτελεσματικό από το ΕΟ των *Origanum vulgare* L. και *Cinnamomum zeylanicum* L. (Abdollahzadeh et al. 2014). Το ΕΟ δεντρολίβανου έδειξε υψηλότερη αντιβακτηριακή δράση έναντι των θετικών Gram βακτηριδίων από ότι έναντι των Gram-αρνητικών (Hussain et al. 2010, Pesavento et al. 2015).

Το *R. officinalis* L. (ξηρό εκχύλισμα, διαλύτης εμβροχής αιθανόλη: νερό= 96:4 v/v) έδειξε *in vitro* ότι είναι δραστικό έναντι Gram-θετικών βακτηρίων, πρότυπων και κλινικών στελεχών, που προκαλούν λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος, όπως τα: *Staphylococcus saprophyticus*, *S. epidermidis* και *Enterococcus faecalis* (Petrolini et al. 2013).

Οι αντιβακτηριακή δράση των εκχυλισμάτων οξικού αιθυλεστέρα, μεθανόλης, χλωροφορμίου και ακετόνης των αποξηραμένων φύλλων *R. officinalis* L. (20 g εκχυλίστηκαν με 150 mL διαλύτη για 24 ώρες σε συσκευή Soxhlet) δοκιμάστηκε *in vitro* έναντι 12 βακτηρίων: *Bacillus brevis* FMC 3, *Bacillus megaterium* DSM 32, *B. subtilis* IMG 22, *B. subtilis* var. *niger* ATCC 10, *Micrococcus luteus* LA 2971, RUT *Mycobacterium smegmatus*, DME *E. coli*, *L. monocytogenes* SCOTT A, *S. aureus* ATCC 25923, *Streptococcus thermophilus*, *P. fluorescens* και *Yersinia enterocolitica* O:3P41797. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα όλα τα εκχυλίσματα των φύλλων δεντρολίβανου έδειξαν δράση (ζώνη

αναστολής 7-16 mm/20 µL), εκτός από το ακετονικό εκχύλισμα έναντι της *Yersinia enterocolitica* (Erdogrul 2002)

Οδοντόπαστα που περιέχει 9,53 % w/w *R. officinalis* L. (ξηρού εκχυλίσματος μετά από εμβροχή αποξηραμένων φύλλων σε αιθανόλη για 30 ημέρες) αξιολογήθηκε ως προς την αντιμικροβιακή της δράση στα στοματικά βακτηρίδια, σε σύγκριση με εμπορικά διαθέσιμη οδοντόπαστα βοτάνων. Η οδοντόπαστα δεντρολίβανου ανέστειλε την ανάπτυξη των: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* και *Lactobacillus rhamnosus*, με δράση παρόμοια με τις οδοντόκρεμες του εμπορίου για την αναστολή των *S. mutans* και *S. oralis* (Valones et al. 2016).

Το *R. officinalis* L. λόγω της ισχυρής αντιμικροβιακής του δράσης χρησιμοποιείται ευρέως ως συντηρητικό τροφίμων (Wang et al. 2012)

Οι Shin et al. (2013), διαπίστωσαν ότι το καρνοσικό οξύ εμφανίζει αντική δράση έναντι του ανθρώπινου αναπνευστικού συγκυτιακού ιού RSV (Human respiratory syncytial virus).

B. Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική δράση του δεντρολίβανου μπορεί να αποδοθεί στα φαινολικά του συστατικά και στα τριτερπένια. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλίου DPPH, αποδείχθηκε η αντιοξειδωτική δράση των μεταβολιτών: καρνοσόλης, καρνοσικού οξέος, ροσμανόλης, ροσμαρινικού οξέος, ολεανλικού οξέος, ουρσολικού οξέος και του αιθέριου ελαίου του (Lo et al. 2002, Klančnik et al. 2009, Beretta et al. 2011).

Οι μεταβολίτες: καρνοσόλη, ροσμανόλη και επι-ροσμανόλη αναστέλλουν την οξείδωση των λιπιδίων μέσω του μηχανισμού δεσμεύσεως των ελεύθερων ριζών (Zeng et al. 2001, Del Baño et al. 2003, Bakirel et al. 2008). Επίσης συμβάλλουν το καρνοσικό μεθύλιο (Peng et al. 2007), η λουτεολίνη (Sasaki et al. 2013) και το μπετουλινικό οξύ (Kontogianni et al. 2013).

Στην αντιοξειδωτική δράση του δεντρολίβανου συνεισφέρουν και οι πηκτικές ενώσεις (Hussain et al. 2010). Το εκχύλισμα δεντρολίβανου παρουσίασε καλύτερη αντιοξειδωτική δράση από τη συνθετική αντιοξειδωτική βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη (BHA) (Babovic et al. 2010) και από το ασκορβικό οξύ (Peng et al. 2007). Επιπλέον, το καρνοσικό οξύ και το ροσμαρινικό οξύ είχαν σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα από το BHT (Βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο) και την α-τοκοφερόλη (Romano et al. 2009).

Η συνεργική δράση ορισμένων δευτερευόντων συστατικών που υπάρχουν στο ΕΟ δεντρολίβανου αποδείχθηκε όταν το ΕΟ έδειξε καλύτερη δραστηριότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών από το κύριο συστατικό του, την 1,8-κινεόλη (Hussain et al. 2010, Kontogianni et al. 2013). Η συνεργική δράση μπορεί να μεγιστοποιήσει την αντιοξειδωτική ικανότητα του ΕΟ και να ελαττώσει τις συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την επίτευξη συγκεκριμένης δραστηριότητας (Burt 2004).

Η αντιοξειδωτική δράση των μεταβολιτών του δεντρολίβανου, είναι στενά συνδεδεμένη με άλλες βιολογικές δράσεις, όπως η κυτταροπροστατευτική (Andrade et al. 2018).

Γ. Αντινεοπλασματική δράση

Το καρνοσικό οξύ, η καρνοσόλη (Bai et al. 2010, Sánchez-Camargo et al. 2014, Tai et al. 2012, Valdés et al. 2012a, 2012b) και το μπετουλινικό οξύ εμφανίζονται ως οι κυριότεροι αντινεοπλασματικοί παράγοντες του φυτού (Kontogianni et al. 2013).

Οι πιητικές ενώσεις 1,8-κινεόλη, καμφορά και α-πινένιο έδειξαν επίσης εμφανή αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι καρκίνου του μαστού και του προστάτη (Hussain et al. 2010). Οι φαινολικές ενώσεις με τα μονοτερπένια εμφάνισαν συνεργικό αποτέλεσμα (Sánchez-Camargo et al. 2014).

Η κυτταροτοξική δράση του δεντρολίβανου μπορεί να αποδοθεί στο καρνοσικό οξύ, τα μονοτερπένια και τα τριτερπένια (μπετουλινικό οξύ και ουρσολικό οξύ). Η πιθανή συνεργική δράση μεταξύ αυτών υποδηλώνει ότι ο συνδυασμός δύο χαρακτηριστικών (κυτταροτοξική δραστικότητα και αντιοξειδωτική δράση) θα μπορούσε να προκαλέσει τόσο άμεση καταστροφή των καρκινικών κυττάρων όσο και προστασία των υγιών κυττάρων κατά τη διάρκεια της θεραπείας (Kontogianni et al. 2013, Sanches-Silva et al. 2014).

Τα συστατικά του δεντρολίβανου έχουν επιδείξει διαφορετικά αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας ανάλογα με τον τύπο του καρκινικού κυττάρου, τη συγκέντρωση και τον χρόνο έκθεσης. Οι Valdés et al. (2012a), (2012b), διεξήγαγαν μια μελέτη για την αντιπολλαπλασιαστική επίδραση των διαιτητικών πολυφαινολών από το δεντρολίβανο στα κύτταρα λευχαιμίας, ενώ οι Tai et al. (2012), Valdés et al. (2012a) και Vicente et al. (2013), έδειξαν την αντινεοπλασματική δράση του εκχυλίσματος δεντρολίβανου σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ωοθηκών, σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου και στην εξέλιξη του ηπατικού όγκου αντίστοιχα.

Το εκχύλισμα δεντρολίβανου αυξάνει την αντικαρκινική δράση της 5-φθοριουρακίλης, τόσο σε ευαισθητα όσο και σε ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου (González-Vallinas et al. 2013).

Τα επιστημονικά στοιχεία από μελέτες σε ζώα και σε κυτταρικές καλλιέργειες καταδεικνύουν το αντικαρκινικό δυναμικό του εκχυλίσματος δεντρολίβανου, της καρνοσόλης, του καρνοσικού οξέος, του ουρσολικού οξέος και του ροσμαρινικού οξέος. Διαπιστώθηκε ότι οι αναφερόμενες αντικαρκινικές ιδιότητες προκύπτουν από τις μοριακές μεταβολές στη διαδικασία διάφορων σταδίων ανάπτυξης του καρκίνου, οι οποίες είναι δοσο-εξαρτώμενες. Επίσης, η αντικαρκινική δράση του δεντρολίβανου δεν περιορίζεται σε συγκεκριμένους ιστούς ή είδη. Αυτό αποδεικνύεται από την ικανότητα του να καταστέλλει την ανάπτυξη όγκων σε διάφορα όργανα όπως: του παχέος εντέρου, μαστού, ήπατος, στομάχου, καθώς και κυττάρων μελανώματος και λευχαιμίας (Ngo et al. 2011).

Το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη είναι διτερπένια με αντικαρκινική δράση που αντιπροσωπεύουν περίπου το 5% του βάρους του ξηρού φύλλου (μέχρι το 2017, 35 από τις 49 μελέτες χρησιμοποιούν αυτές τις ενώσεις). Τα τελευταία χρόνια υπήρξε μεγάλη αύξηση του αριθμού των μελετών σχετικά με την αντικαρκινική δράση των μεταβολιτών δεντρολίβανου: καρνοσικού οξέος, καρνοσόλης, ροσμαρινικού οξέος και ουρσολικού οξέος. Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές *in vitro* μελέτες σχετικά με την κυτταροτοξικότητα καρνοσόλης και καρνοσικού οξέος σε ανθρώπινα καρκινικά

κύτταρα του μαστού και του παχέος εντέρου (HepG2, COLO 205 και HL-60) (Dörrie et al. 2001, Bai et al. 2010).

Δ. Αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση

Το καρνοσικό οξύ, η καρνοσόλη (Arranz et al. 2015, Bai et al. 2010, Peng et al. 2007), το ουρσολικό οξύ (Altinier et al. 2007) και τα φλαβονοειδή, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφανιζόμενη αντιφλεγμονώδη δράση του δεντρολίβανου (González-Trujano et al. 2007). Οι πτητικές αρωματικές ενώσεις του: 1,8-κινεόλη, βορνεόλη και καμφορά είναι επίσης καθοριστικές για την αντιφλεγμονώδη δράση του (Ehrnhöfer-Ressler et al., 2013).

Έχει αναφερθεί ότι κάθε μεμονωμένο τριτερπένιο του δεντρολίβανου έδειξε παρόμοια δράση με αυτή που παρατηρήθηκε με το μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο κετορολάκη (Martínez et al. 2012, Benincá et al. 2011).

Οι αντιφλεγμονώδεις και αναλγητικές μελέτες *in vitro* βασίστηκαν στην αξιολόγηση της έκφρασης των φλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1β, IL-6, TNF-α), των COX-1/COX-2 και της παραγωγής του νιτρικού οξειδίου σε μακροφάγα κύτταρα RAW 264,7 (Huang et al. 1994, Lo et al. 2002, Rosenbaum et al. 2010, Kuo et al. 2011).

Τα φλαβονοειδή όπως κερκετίνη και καμφερόλη (González-Trujano et al. 2007) και τα τριτερπένια μικρομερικό οξύ, ουρσολικό οξύ και ολεανολικό οξύ, έχουν σημαντικό ρόλο στην αναλγητική δράση του δεντρολίβανου (Martínez et al. 2012).

Ε. Αντιδιαβητική δράση

Το εκχύλισμα δεντρολίβανου έχει αξιοσημείωτη αντιδιαβητική δράση (Bakirel et al. 2008, Cui et al. 2012), που φαίνεται να σχετίζεται με την καρνοσόλη (Cui et al. 2012).

Το εκχύλισμα δεντρολίβανου (200 mg/kg ξηρού δείγματος) έδειξε υποξεία αντι-υπεργλυκαιμική και ινσουλινοτροπική δράση, λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του που αναστέλλουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων και ενεργοποιούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα (Bakirel et al. 2008).

Το δεντρολίβανου έδειξε ότι έχει ανασταλτική δράση έναντι της α-γλυκοσιδάσης (Kwon et al. 2006) η οποία συσχετίστηκε με την αντιοξειδωτική δράση και το φαινολικό προφίλ των μελετηθέντων εκχυλισμάτων.

Ζ. Γαστροπροστατευτική δράση

Το δεντρολίβανου δρα ως γαστροπροστατευτικός παράγοντας, ασκώντας ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση στον γαστρικό βλεννογόνο, αναστρέφοντας το οίδημα και εμποδίζοντας την διείσδυση φλεγμονωδών κυττάρων (Dias et al. 2000, Amaral et al. 2013).

Η αντι-ελκογόνος ιδιότητα, που προκύπτει από διάφορους μηχανισμούς, μπορεί να αποδοθεί στις πολυφαινόλες, ως κύρια πηγή αντιοξειδωτικών όπως το καρνοσικό οξύ και το ροσμαρινικό οξύ (Dias et al. 2000, Amaral et al. 2013, Asokkumar et al. 2014).

Το ξηρό αιθανολικό (70%) εκχύλισμα δεντρολίβανου στα 1000 mg/kg έδειξε ότι προκαλεί μείωση της γαστρικής βλάβης που προκαλείται από ινδομεθακίνη και ρεζερπίνη σε Wistar αρουραίους (Dias et al. 2000).

Η. Αντικαταθλιπτική δράση

Φαίνεται ότι το εκχύλισμα δεντρολίβανου έχει αντικαταθλιπτική δράση. (Machado et al. 2009, Machado et al. 2013, Sasaki et al. 2013).

Εκχύλισμα δεντρολίβανου (10 mg/kg, *per os*) έδειξε παρόμοια δράση με αυτή της φλουοξετίνης στην ίδια δόση (10 mg/kg, *per os*) σε ποντίκια (Machado et al. 2009). Φαίνεται ότι το δεντρολίβανο επιδρά στους υποδοχείς D1/D2 και αυξάνει τα επίπεδα δοπαμίνης στον εγκέφαλο (Farahani et al. 2015).

Θ. Αγχολυτική δράση

Οι Ferlemi et al. (2015), έδειξαν ότι η χορήγηση εγχύματος δεντρολίβανου σε ενήλικα αρσενικά ποντίκια μείωσε το άγχος τους.

Ι. Αντιθρομβωτική δράση

Το δεντρολίβανο σε δοκιμές *in vivo* και *in vitro* έδειξε ότι μπορεί να αναστείλει την συγκόλληση των αιμοπεταλίων και να αποτρέψει την αρτηριακή θρόμβωση (Naemura et al. 2008, Yamamoto et al. 2005).

Κ. Αντιφθειρική δράση

Η ανθρώπινη ψείρα του κεφαλιού *Pediculus capitis* έχει πρόσφατα αποκτήσει ανθεκτικότητα στα εμπορικά διαθέσιμα εντομοκτόνα, γεγονός που έχει διευρύνει την έρευνα για την αντιφθειρική δράση ορισμένων φυτικών προϊόντων. Το αιθέριο έλαιο του *R. officinalis* L. (δύο διαφορετικοί χημειοτύποι) έδειξε ότι ήταν το πιο αποτελεσματικό ανάμεσα σε 10 αιθέρια έλαια φυτών που αναπτύσσονται στην Τουρκία (*Rosa damascena* L., *Pelargonium graveolens* L., *Lavandula angustifolia* L., *Salvia triloba* L., *Citrus aurantium* L. subsp. *bergamia* (Wight et Arnott), *Cymbopogon nardus* L., *Citrus limonum* L., and *Cymbopogon flexuosus* Nees ex Steud), έναντι της ανθρώπινης ψείρας του τριχωτού της κεφαλής (Limoncu et al. 2017).

Λ. Προστασία από την UV ακτινοβολία

Η χρόνια έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία είναι υπεύθυνη για μακροχρόνιες κλινικές εκδηλώσεις, όπως η φωτογήρανση και οι νεοπλασίες. Ένας από τους σημαντικότερους βιοχημικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της φωτογήρανσης του δέρματος είναι η μεταλλοπρωτεΐνάση-1 (MMP-1). Οι Martin et al. (2008), απέδειξαν ότι το εκχύλισμα δεντρολίβανου (ξηρό εκχύλισμα, αποξηραμένα φύλλα σε σκόνη: διαλύτης=1:10 w/v, χρόνος 15 min, διαλύτης ζεστό νερό) αναστέλλει την έκφραση της MMP-1 που επάγεται από την UV ακτινοβολία. Η αντι-MMP-1 δράση επιβεβαιώθηκε σε ινοβλάστες ανθρώπινου δέρματος που εκτέθηκαν είτε σε ακτινοβολία UVB και UVA είτε σε ηλιακή προσομοίωση. Το φυτικό εκχύλισμα στοχεύει κυρίως τη MMP-1 σε σύγκριση με τη MMP-2 και δυνητικά μπορεί να είναι χρήσιμο στην πρόληψη της δερματικής φωτογήρανσης.

M. Άλλες δράσεις

Οι Aruoma et al. (1996), χρησιμοποίησαν απομονωμένες ενώσεις δεντρολίβανου για να ελέγξουν την αντι-HIV δράση τους. Το αποτέλεσμα της μελέτης έδειξε ότι η καρνοσόλη παρουσίαζε ήπια, αλλά σαφή, δράση κατά του HIV.

Η καρνοσόλη μπορεί να είναι χρήσιμη στην φαρμακευτική αντιμετώπιση της παχυσαρκίας (Cui et al. 2012). Η θεραπεία με εκχύλισμα φύλλων δεντρολίβανου προκάλεσε μείωση του βάρους και της λιπώδους μάζας σε ποντικούς, λόγω αναστολής της δραστηριότητας της παγκρεατικής λιπάσης (Harach et al. 2010).

Σε υπερχοληστερολαιμικούς, λόγω διαίτας, αρουραίους που έλαβαν υδατικό εκχύλισμα δεντρολίβανου, βελτιώθηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα και εξασθένησε το οξειδωτικό στρες (Afonso et al. 2013).

Τα εκχυλίσματα δεντρολίβανου παρουσίασαν υψηλή ανασταλτική δράση έναντι του ΜΕΑ (μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης) (Kwon et al. 2006).

Η χορήγηση αποξηραμένων φύλλων δεντρολίβανου σε αρουραίους ως συμπλήρωμα διατροφής μείωσε την καρδιακή αναδιαμόρφωση μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου (EM) σε αρσενικούς Wistar αρουραίους. Φαίνεται πως αυτό επιτεύχθηκε με τη βελτίωση του ενεργειακού μεταβολισμού και τη μείωση του οξειδωτικού στρες. Η χορήγηση 0,02% *R. officinalis* L. βελτίωσε τη διαστολική λειτουργία και μείωσε την υπέρτροφια της καρδιάς μετά από EM. Η δόσεις 0,02% και 0,2% για τους αρουραίους, ισοδυναμούν με 11 mg και 110 mg αντίστοιχα για τον άνθρωπο (Murino et al. 2017).

Το καρνοσικό οξύ εμφανίζει αντι-αθηρωματική δράση που οφείλεται έχει στην ικανότητα του να καταστέλλει την έκφραση της μεταλλοπρωτεΐνης-9 της θεμέλιας ουσίας (μέσω της μείωσης του NF-κΒ) και τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων (Chae et al. 2012, Yu et al. 2008).

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι οι δίαιτες πλούσιες σε πολυφαινόλες συσχετίζονται με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης νευρολογικών διαταραχών (Fernández-Fernández et al. 2012).

Το αιθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου προστατεύει νεφρούς και ήπαρ από την βλάβη που προκαλεί ο μόλυβδος Pb (Mohamed et al. 2016).

Το δεντρολίβανο συντελεί στη μείωση της εντερικής φλεγμονής σε ποντίκια με οξεία κολίτιδα. Η δράση αυτή επιτεύχθηκε μέσω του βιοχημικού μονοπατιού MAPKs/NF-κΒ (Medicherla et al. 2016)

Το δεντρολίβανο επέδειξε μέτρια αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης (υδατικό εκχύλισμα 12%, μεθανολικό 17% στα 0,1 mg/mL έκαστο, και 10% για το μεθανολικό στα 0,05 mg/mL, αναλογία δρόγης: διαλύτη=1:20 w/v, 2× 30 min σε υδατόλουτρο υπερήχων) (Adsersen et al. 2006).

1.1.3.4.3 Κλινικά στοιχεία

Η τοπική εφαρμογή αιθέριου ελαίου *R. officinalis* είχε αγγειοδιασταλτική και θερμαντική δράση σε ασθενή με σύνδρομο Raynaud και συστηματική σκλήρυνση (Von Schoen-Angerer et al. 2018).

Οι Mirsadraee et al. (2018), ερεύνησαν τη δράση των εκχυλισμάτων *R. officinalis* και *Platanus orientalis* L. στο άσθμα με μια τυχαιοποιημένη, διπλά-τυφλή μελέτη όπου

αξιολογήθηκε η επίδραση των προαναφερόμενων εκχυλισμάτων σε ασθενείς ανθεκτικούς στη συνήθη θεραπεία (β-αγωνιστές, κορτικοστεροειδή, ανταγωνιστές των λευκοτριενίων και θεοφυλλίνη). 44 ασθενείς χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες. Δύο ομάδες έλαβαν μόνο εκχύλισμα *P. orientalis* ή *R. officinalis*, ενώ η τρίτη ομάδα έλαβε το συνδυασμό τους. Οι ασθενείς έλαβαν καθημερινά 50 mL σκευάσματος όπου 1 mL περιείχε 200 mg φυτικού εκχυλισματος. Οι ασθενείς όλων των ομάδων παράλληλα με τα φυτικά εκχυλίσματα συνέχισαν την προηγούμενη φαρμακοθεραπεία τους. Η θεραπεία διήρκησε ένα μήνα και συγκρίθηκαν τα αρχικά με τα τελευταία αποτελέσματα της σπιρομέτρησης, του εκπνεόμενου μονοξειδίου του αζώτου (FENO) και της δοκιμής ελέγχου άσθματος (ACT). Η βαθμολογία ACT έδειξε σημαντική βελτίωση μετά από τη θεραπεία με *R. officinalis* ($p < 0,05$) αλλά όχι με *P. orientalis*. Οι κλινικές αξιολογήσεις έδειξαν ότι ο βήχας, η παραγωγή πτυέλων και ο συριγμός βελτιώθηκαν σημαντικά στην ομάδα του *R. officinalis* ($p < 0,05$ έως $p < 0,001$) ενώ στην ομάδα του *P. orientalis* παρατηρήθηκε μόνο βελτίωση του βήχα. Τα αποτελέσματα της σπιρομέτρησης έδειξαν σημαντική βελτίωση στις τιμές FEV1/VC για τα άτομα που έλαβαν θεραπεία με *P. orientalis* και εκείνα που έλαβαν τον συνδυασμό εκχυλισμάτων καθώς και σημαντική μείωση της τιμής FEF25-75 μόνο για την ομάδα *P. orientalis* ($p < 0,05$ για όλες τις περιπτώσεις). Το FENO μειώθηκε και στις δύο ομάδες, αλλά τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά μόνο για την ομάδα *R. officinalis* ($p < 0,05$). Ο κοιλιακός πόνος και το δερματικό εξάνθημα ήταν οι συχνότερες παρενέργειες των θεραπειών που οδήγησαν στη διακοπή της επέμβασης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το εκχύλισμα δεντρολίβανου είναι ένας πολλά υποσχόμενος παράγοντας στη θεραπεία του ανθεκτικού άσθματος. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την διερεύνηση των αποτελεσματικότερων συστατικών.

Σε μια διπλά-τυφλή, τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο πιλοτική μελέτη, διερευνήθηκαν για πρώτη φορά οι συνέπειες του συνδυασμού *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis* και *Melissa officinalis* (SRM), [κάθε εκχύλισμα 0,5 g/mL σε 45% EtOH, εμβροχή 3 εβδομάδων στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το τελικό προϊόν είχε ίση ποσότητα από το κάθε εκχύλισμα. Ημερήσια δόση αντίστοιχη σε 5 g αρχικής αποξηραμένης δρόγης των φυτών] στη βελτίωση της λεκτικής μνήμης σε φυσιολογικά υγιή άτομα. Η διάρκεια της μελέτης ήταν 2 εβδομάδες. Το αποτέλεσμα έδειξε ότι ένα από του στόματος παρασκεύασμα SRM στην επιλεγμένη δόση και για την συγκεκριμένη περίοδο χορήγησης είναι πιο αποτελεσματικό από το εικονικό φάρμακο στη βελτίωση της λεκτικής μνήμης σε υγιή άτομα ηλικίας κάτω των 63 ετών. Η βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη συμπλήρωση με εκχύλισμα SRM αξίζει περαιτέρω έρευνας ως συμπληρωματική θεραπεία για ασθενείς με νόσο του Alzheimer αλλά και στον γενικό πληθυσμό άνω των 63 ετών. Δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες (Perry et al. 2018).

Οι Nematollahi et al. (2018), διερεύνησαν την επίδραση της εσωτερικής λήψης *R. officinalis* σε: μνήμη, άγχος, κατάθλιψη και ποιότητα ύπνου, σε μια διπλά-τυφλή, τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη μελέτη σε 68 φοιτητές. Η ομάδα φαρμάκου έλαβε 500 mg κόνεως αποξηραμένης δρόγης (υπέργειο τμήμα) *R. officinalis* δύο φορές την ημέρα για ένα μήνα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το δεντρολίβανο θα μπορούσε να

χρησιμοποιηθεί για να ενισχύσει την προοπτική και αναδρομική μνήμη, να μειώσει το άγχος και την κατάθλιψη και να βελτιώσει την ποιότητα του ύπνου στους φοιτητές.

Μια τυχαιοποιημένη μελέτη σε 90 εθελοντές έδειξε ότι η χορήγηση *per os* ενός συνδυασμού *R. officinalis* και *Citrus paradisi* παρουσιάζει φωτοπροστατευτική δράση (Nobile et al. 2016).

Οι Panahi et al. (2015), διερεύνησαν την κλινική αποτελεσματικότητα του αιθέριου ελαίου δεντρολίβανου στη θεραπεία της ανδρογενετικής αλωπεκίας (AGA), συγκρίνοντας τα αποτελέσματά με αυτά της μινοξιδίλης 2%. Οι ασθενείς με AGA τυχαιοποιήθηκαν στην ομάδα δεντρολίβανου (n = 50) και στην ομάδα μινοξιδίλης 2% (n = 50). Η μελέτη διήρκεσε 6 μήνες. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στην μέση τιμή των τριχών στο 3μηνο, ούτε στο δεντρολίβανο ούτε στην ομάδα της μινοξιδίλης (p>0,05). Αντίθετα, και οι δύο ομάδες παρουσίασαν σημαντική αύξηση στον αριθμό των μαλλιών στο τελικό σημείο των 6 μηνών σε σύγκριση με την αρχή και το 3μηνο (p<0,05). Δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων μελέτης όσον αφορά τον αριθμό των τριχών κατά τον μήνα 3 ή το μήνα 6 (p>0,05). Η συχνότητα φαγούρας του τριχωτού της κεφαλής στα σημεία δοκιμής στους 3 και 6 μήνες ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με την αρχική τιμή και στις δύο ομάδες (p<0,05). Ωστόσο, ο κνησμός του τριχωτού της κεφαλής ήταν συχνότερος στην ομάδα μινοξιδίλης και στα δύο εκτιμώμενα τελικά σημεία (p<0,05).

Το σύνδρομο στέρησης μπορεί να επηρεάσει το κίνητρο του ασθενούς για συμμετοχή σε προγράμματα απεξάρτησης. Η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων στέρησης μπορεί να βελτιώσει το ποσοστό επιτυχίας των προγραμμάτων αυτών. Για το λόγο αυτό οι Solhi et al. (2013), αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα ενός προϊόντος *R. officinalis*, ως συμπληρωματική θεραπεία για την ανακούφιση του συνδρόμου στέρησης κατά την κατάχρηση οπίου. Στην κλινική αυτή δοκιμή, 81 ασθενείς χωρίστηκαν στην ομάδα περιπτώσεων και στην ομάδα ελέγχου. Η ομάδα ελέγχου υποβλήθηκε σε θεραπεία με μεθαδόνη και εικονικό φάρμακο για 4 εβδομάδες. Η ομάδα των περιπτώσεων υποβλήθηκε σε θεραπεία με μεθαδόνη και με αποξηραμένα φύλλα *R. officinalis* με τη μορφή κόνεως, για το ίδιο διάστημα. Η εμφάνιση του συνδρόμου στέρησης συγκρίθηκε μεταξύ των ομάδων στις ημέρες 3, 7 και 14 μετά την έναρξη της θεραπείας και ελέγχθηκαν τα πιθανά σημεία και συμπτώματα του συνδρόμου στέρησης. Η κλινική κλίμακα απόσυρσης οπιοειδών (COWS) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση του συνδρόμου στέρησης στους ασθενείς. Οι ασθενείς στην ομάδα των περιπτώσεων παρουσίασαν ηπιότερο σύνδρομο στέρησης σε σύγκριση με αυτούς της ομάδας ελέγχου. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το δεντρολίβανο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα προαιρετικό επιπλέον φάρμακο για τη θεραπεία του συνδρόμου στέρησης κατά τη διάρκεια των προγραμμάτων απεξάρτησης από το όπιο και ενδεχομένως τον εθισμό σε άλλα οπιοειδή.

Οι Fernández et al., (2014) μελέτησαν την επίδραση του αιθέριου ελαίου *R. officinalis* στην πρωτοπαθή υπόταση σε τριάντα δύο ασθενείς, μεταξύ Μαρτίου του 2007 και Σεπτεμβρίου του 2008. Η μελέτη διήρκεσε 72 εβδομάδες και διεξήχθη σε Ισπανικό κοινοτικό φαρμακείο. Η κλινική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε μέσω του ελέγχου της συστολικής και της διαστολικής αρτηριακής πίεσης (ΣΑΠ και ΔΑΠ, αντίστοιχα) σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα της Αμερικανικής Εταιρείας Υπέρτασης. Η δόση του

αιθέριου ελαίου ήταν 1 mL κάθε 8 ώρες, σύμφωνα με όσο περιγράφονται στην German Commission E για το αιθέριο έλαιο δεντρολίβανου. Οι ασθενείς έβαζαν το 1 mL σε ζάχαρη, για να αποφευχθεί η δυσάρεστη γεύση. Με βάση την ΣΑΠ και ΔΑΠ, παρατηρήθηκε αντιυποτασική δράση του αιθέριου ελαίου που διατηρήθηκε σε όλη τη διάρκεια της θεραπείας. Η αύξηση που επιτυγχάνεται στις τιμές της αρτηριακής πίεσης μετά τη χορήγηση αιθέριου ελαίου δεντρολίβανου είναι κλινικά σημαντική με συνακόλουθη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών.

Η τοπική εφαρμογή εκχυλίσματος *R. officinalis* υπό τη μορφή κρέμας (Λ/Ν), ήταν αποτελεσματική έναντι διάφορων φλεγμονωδών παθήσεων του δέρματος, όπως η ψωρίαση (κατά πλάκας, σταγονοειδής, ανάστροφη, φλυκταινώδη παλαμών-πελμάτων), η ροδόχρους νόσος (τύπου I και II), η σμηγματορροϊκή δερματίτιδα, η ακμή και το έκζεμα (Kallimanis 2017).

1.1.3.5 Τοξικολογικά στοιχεία

Η κατάποση 500 mg/kg σωματικού βάρους δεντρολίβανου μείωσε τη γονιμότητα σε θηλυκούς αρουραίους και τη σπερματογένεση στους αρσενικούς αρουραίους (Nusier et al. 2007). Ωστόσο, σε δόσεις μεταξύ 50 και 100 mg/kg σωματικού βάρους, το δεντρολίβανο δεν επηρέασε τη σπερματογένεση όπως μελετήθηκε από τους Heidari-vala et al. (2013).

Η εφάπαξ ενδοπεριτοναϊκή (*i.p.*) χορήγηση 2g/kg βάρους σώματος ενός υδατοαλκοολικού εκχυλίσματος φύλλων δεντρολίβανου (15 % αιθανόλη) σε ποντίκια ή αρουραίους, δεν επέφερε την κατάληξη των πειραματόζωων, ούτε παρατηρήθηκε διαφορά στην συμπεριφορά τους για μια περίοδο 15 ημερών. Η μακροσκοπική ανάλυση κατά την αυτοψία δεν έδειξε καμία ορατή ανωμαλία (Mongold et al. 1991).

Το «ALIBIRD», μια δοκιμαστική ουσία που αποτελείται από ολιγοσακχαρίτες προερχόμενες από τη λακτουλόζη, ένα προϊόν υδρόλυσης ενός συμποκνώματος πρωτεΐνης ορού γάλακτος και ένα εκχύλισμα *R. officinalis* (1: 0,5: 0,05), παρασκευάστηκε στο εργαστήριο και αξιολογήθηκε για την ασφάλειά του ως πρόσθετο τροφίμων. Σε μελέτες τοξικότητας (οξεία και 28 ημερών επαναλαμβανόμενη δόση) με αρουραίους Wistar, το «ALIBIRD» χορηγήθηκε εφάπαξ από το στόμα στη δόση των 2,000 mg/kg σωματικού βάρους χωρίς ανεπιθύμητες ενέργειες ή θνησιμότητα. Ημερήσια δόση των 2,000 mg/kg σωματικού βάρους για 28 ημέρες με καθετήρα, δεν είχε επίσης αρνητικές επιπτώσεις ή θνησιμότητα. Δεν παρατηρήθηκαν μη φυσιολογικά κλινικά σημεία, αλλαγές στη συμπεριφορά, αλλαγές στο σωματικό βάρος ή αλλαγές στην κατανάλωση τροφίμων και νερού σε αμφότερες τις μελέτες. Δεν υπήρξαν μεταβολές στις αιματολογικές τιμές, στα βάρη των οργάνων και στα ιστολογικά χαρακτηριστικά. Με βάση τα αποτελέσματα των δοκιμών, συνάγεται το συμπέρασμα ότι το «ALIBIRD» είναι καλά ανεκτό σε αρουραίους σε οξεία και υποχρόνια (28 ημερών) δόση των 2,000 mg/kg σωματικού βάρους. Να σημειωθεί ότι τα 2000 mg «ALIBIRD» περιέχουν περίπου 64,51 mg εκχυλίσματος *R. officinalis* (Anadón et al. 2013).

Οι Samman et al. (2001), παρατήρησαν ότι τα εκχυλίσματα δεντρολίβανου ανέστειλαν την απορρόφηση του σιδήρου. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η χηλοποίηση

του σιδήρου μπορεί να είναι ένας από τους μηχανισμούς της αντιοξειδωτικής δράσης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

1.1.3.6 Φαρμακευτικές μορφές: ενδείξεις και δοσολογία

Σύμφωνα με τον EMA:

Ημερήσια δόση: 4–6 g φύλλων *R. officinalis* L. που περιέχουν 1,2 % (V/m) αιθέριου ελαίου, 48 – 72 μ L αιθέριου ελαίου ημερησίως (ισοδύναμο με 0,048 – 0,072 mL αιθέριου ελαίου).

Στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία η πυκνότητα του αιθέριου ελαίου του δεντρολίβανου είναι από 0,895 έως 0,920 (g/V), κατά προσέγγιση 0,90 (g/V).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι μια σταγόνα αιθέριου ελαίου ζυγίζει 19 mg μπορούμε να πούμε:

Ελάχιστη δόση: $48 \mu\text{L} \times 0,9 \text{ (mg}/\mu\text{L}) = 43,2 \text{ mg}$, $43,2 \text{ mg}/19 \text{ mg} = 2,27$ σταγόνες, κατά προσέγγιση 2 σταγόνες

Μέγιστη δόση: $72 \mu\text{L} \times 0,9 \text{ (mg}/\mu\text{L}) = 64,8 \text{ mg}$, $64,8 \text{ mg}/19 \text{ mg} = 3,41$ σταγόνες, κατά προσέγγιση 3 σταγόνες.

Πίνακας 7

Φαρμακευτικές μορφές: ενδείξεις και δοσολογία για τα φύλλα *R. officinalis* L.

Αναφορά	Χρήση	Ενδείξεις	Δοσολογία
ESCOF (1997)	Εσωτερική	Βελτίωση της λειτουργίας του ήπατος και της χολής και σε δυσπεπτικά προβλήματα	Έγχυμα: 2-4 g φύλλων την ημέρα. Υγρό εκχύλισμα (1:1, 45 % αιθανόλη v/v): 1,5-3 mL ημερησίως. Βάμμα (1:5, 70 % αιθανόλη v/v): 3-8,5 mL ημερησίως.
	Εξωτερική	Επικουρική θεραπεία στα ρευματικά προβλήματα και διαταραχές της περιφερικής κυκλοφορίας. Ως ήπιο αντισηπτικό και για την επούλωση των τραυμάτων	Αιθανολικό εκχύλισμα (1:20), αιθέριο έλαιο (2 % v/v) σε αιθανόλη ως αντισηπτικό. 1 L αφεψήματος (1:20) σε μια μπανιέρα νερό (2 φορές την εβδομάδα)
Γαλλική φαρμακοποιία. (Pharmacopée Française- Préparation Officinale, 1980 Romarin)	Εσωτερική	Ως σπασμολυτικό *Αντενδείξεις: Εγκυμοσύνη, παθήσεις του προστάτη, δερματοπάθειες.	Έγχυμα ή αφέψημα 5-10 g/L. Έγχυση για 15 λεπτά. Αφέψηση για 30 min. Δοσολογία: 200 έως 400 mL ημερησίως. Υγρό εκχύλισμα 3 έως 5 g ημερησίως. Αιθέριο έλαιο 3 έως 4 σταγόνες, 3-4 φορές την ημέρα
	Εξωτερική	Ως αντισηπτικό και επούλωτικό των πληγών	Αιθέριο έλαιο (2 % v/v) σε αιθανόλη

British Herbal Pharmacopoeia (1983)	Εσωτερική	Άφροσ, σπασμολυτικό, ηρεμιστικό, διουρητικό, αντιμικροβιακό, θυμολεπτικό. Παραδοσιακά σε δυσπεψία, μετεωρισμό. Σε ήπια κατάθλιψη. Για την ανάρρωση από εξασθένιση ή χρόνιες παθήσεις. Σε περιπτώσεις κυκλοφορικής αδυναμίας και υπότασης. Σε πονοκεφάλους απότοκους την αδύναμη κυκλοφορία. Αύξηση της νοητικής απόδοσης	Ημερήσια δόση: 4-6 g αποξηραμένων φύλλων ως έγχυμα ή ως υγρό εκχύλισμα (1:1 σε αιθανόλη 45%)
	Εξωτερική	Παραδοσιακά σε ρευματικές παθήσεις, μυαλγίες, νευραλγίες, ισχιαλγία. Για την ανάπτυξη των μαλλιών και για την πιτυρίδα	Ως έγχυμα για επιθέματα ή για ξέπλυμα των μαλλιών. Ως βάμμα (1:5 σε αιθανόλη 70 %) Για λουτρό: αφέψημα 50 g αποξηραμένων φύλλων σε μια γεμάτη μπανιέρα νερό. Αιθέριο έλαιο (4-6%) διαλυμένο σε έλαιο αμυγδάλου ή σε ημίρευστα παρασκευάσματα για εφαρμογή στις αρθρώσεις και τους μύες.
The Complete German Commission E Monographs, 1998	Εσωτερική	Σε δυσπεπτικά προβλήματα	4-6 g φύλλων ημερησίως, 10-20 σταγόνες αιθέριου ελαίου ημερησίως. Ισοδύναμα παρασκευάσματα Σημείωση συγγραφέα: η δοσολογία του αιθέριου ελαίου φαίνεται υπερβολική και πιθανών μη ασφαλή. Μια πιο λογική για εσωτερική χρήση θα ήταν 2 σταγόνες (1 mL).
	Εξωτερική	Επικουρική θεραπεία στα ρευματικά προβλήματα και στις διαταραχές του κυκλοφορικού	50 g σε μια γεμάτη μπανιέρα, 6-10 % αιθέριου ελαίου σε ημίρευστα και υγρά παρασκευάσματα. Ισοδύναμα παρασκευάσματα
WHO μονογραφίες	Εσωτερική	<u>Φύλλα</u> : Δυσπεπτικά προβλήματα. Παραδοσιακή χρήση Ως χολαιρετικό, εφιδρωτικό, διουρητικό, εμμηναγωγό, τονωτικό, σε πονοκεφάλους, σε προβλήματα της έμμηνου ρήσης, σε κόπωση και μειωμένη μνήμη <u>Αιθέριο έλαιο</u> : Δυσπεπτικά προβλήματα. Παραδοσιακή χρήση ως χολαιρετικό, εφιδρωτικό, χωνευτικό, διουρητικό εμμηναγωγό, καθαρτικό, τονωτικό, σε πονοκεφάλους, σε προβλήματα της έμμηνου ρήσης, σε κόπωση και μειωμένη μνήμη	Ημερήσια δόση: 4-6 g φύλλων, έγχυμα: 2-4 g φύλλων σε 150 mL νερού 3 φορές την ημέρα* Υγρό εκχύλισμα (1:1,45 % αιθανόλη v/v): 1,5-3 mL ημερησίως* Βάμμα (1:5, 70 % αιθανόλη v/v): 3-8,5 mL ημερησίως* Ξηρό εκχύλισμα (4,5-5,5:1 w/w) 0,36-0,44 g τρεις φορές την ημέρα* Ημερήσια δόση για λήψη από το στόμα : 1 mL αιθέριου ελαίου**
	Εξωτερική	<u>Φύλλα</u> ρευματικά προβλήματα και στις διαταραχές του κυκλοφορικού. Παραδοσιακά σε διαστρέμματα, μώλωπες <u>Αιθέριο έλαιο</u>	Αφέψημα 50 g φύλλων σε 1 L νερό και το προσθέτουμε σε μια γεμάτη μπανιέρα Ημίρευστα και υγρά παρασκευάσματα που περιέχουν 6-10% αιθέριο έλαιο.**

		επικουρική θεραπεία στα ρευματικά προβλήματα και στις διαταραχές του κυκλοφορικού. Διαστρέμματα, μώλωπες	*Blumenthal M, et al., Goldberg A, Brinckmann J, eds. Herbal medicine: Expanded Commission E monographs. Austin, TX, American Botanical Council, 2000. **Blumenthal M et al., eds. The complete German Commission E monographs: Therapeutic guide to herbal medicines. Austin, TX, American Botanical Council, 1998.
--	--	--	---

Πίνακας 8

Παραδοσιακή χρήση για το αιθέριο έλαιο *R. officinalis* L.

Χώρα	Χρονολογία	Παρασκευάσματα	Ενδείξεις	Δοσολογία
Γερμανία	1976 παραδοσιακή χρήση	Πρόσθετο μπάνιου	Για ενίσχυση του δέρματος	Αν χρειάζεται, μια φορά την ημέρα: 10 mL πρόσθετο μπάνιου /100 mL νερού για 10-20 min στους 34-37 °C 13,5 g αιθέριο έλαιο /100 mL (=104 g) πρόσθετο μπάνιου Κάθε 2-3 μέρες: 3 mL πρόσθετο μπάνιου /150 mL νερού για 10-30 min στους 35-39°C, 13 g αιθέριο έλαιο/100 mL (=104 g) πρόσθετο μπάνιου
	1976 WEU	Πρόσθετο μπάνιου	Επικουρικά σε καταστάσεις εξάντλησης	Αν χρειάζεται 3-4 την εβδομάδα 10 mL πρόσθετο μπάνιου/150 mL νερού για 10-20 min στους 34-37 °C 48 g αιθέριο έλαιο/120 mL πρόσθετο μπάνιου. Αν χρειάζεται 2-4 την εβδομάδα 10 mL πρόσθετο μπάνιου / 100 mL νερού για 10-20 min at 34-37 °C 20,8 g αιθέριο έλαιο / 100 mL (=104 g) πρόσθετο μπάνιου Αν χρειάζεται 2-4 την εβδομάδα 20 mL πρόσθετο μπάνιου /100 νερού για 10-20 min στους 34-37 °C, 10 g αιθέριο έλαιο /100 g πρόσθετο μπάνιου. Μέγιστο μια φορά ημερησίως 20 mL πρόσθετο μπάνιου/150 mL νερού για 10-20 min στους 35-38 °C 25 g αιθέριο έλαιο /100 g πρόσθετο μπάνιου
	1990 WEU	Πρόσθετο μπάνιου	Επικουρικά σε καταστάσεις εξάντλησης	Ίδια
Αλοιφή [6 g αιθέριο έλαιο σε 100 g προϊόντος]		Για την συμπτωματική αντιμετώπιση του μυοσκελετικού πόνου, και σε διαταραχές του κυκλοφορικού	3 mL αλοιφής 2-3 φορές ημερησίως Αντενδείξεις: βρογχικό άσθμα, εισπνευστικός συριγμός, whooping cough, pseudo-croup. Ανεπιθύμητες ενέργειες: βρογχικός και λαρυγγικός σπασμός, βήχας.	
Αυστρία	1994 παραδοσιακή χρήση	100 g διαλύματος που περιέχει 5 g αιθέριου ελαίου ως πρόσθετο μπάνιου	Διέγερση της κυκλοφορίας	30 mL για μια γεμάτη μπανιέρα

Πίνακας 9

Παραδοσιακή χρήση για τα φύλλα *R. officinalis* L.

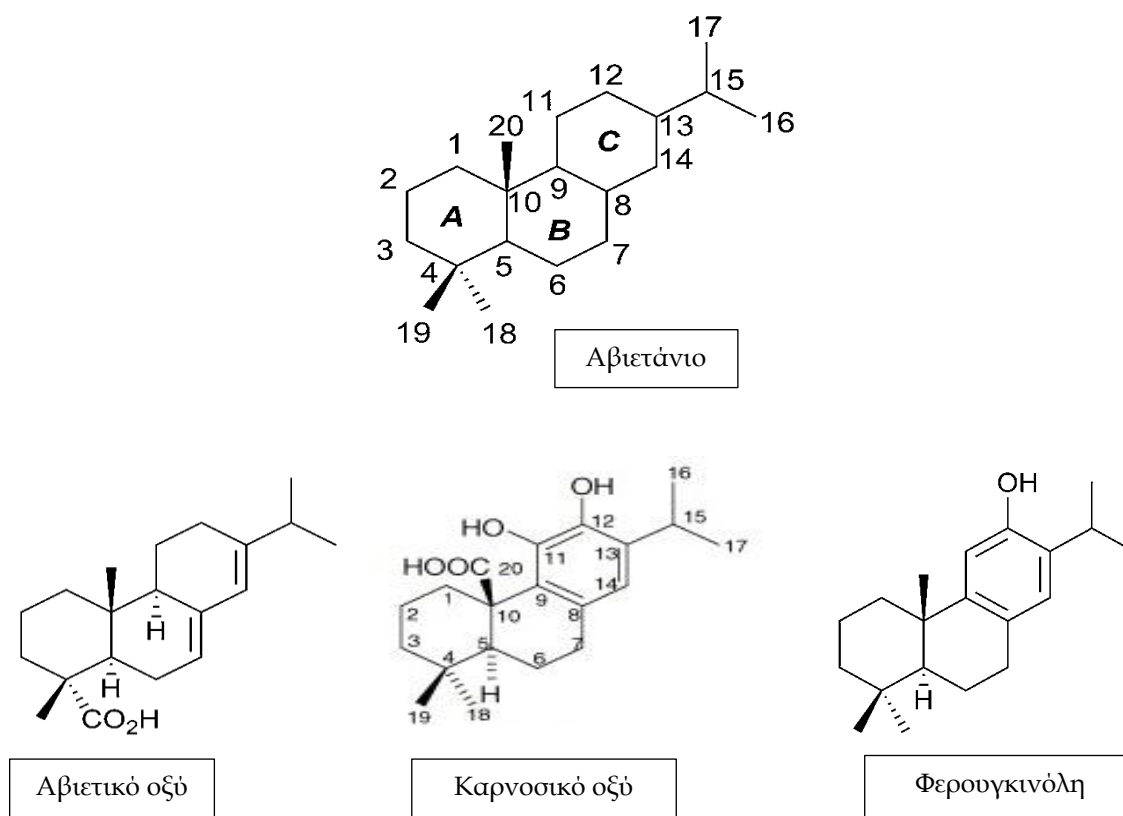
Χώρα	Χρονολογία	Παρασκευάσματα	Ενδείξεις	Δοσολογία
Ισπανία	1976	Τεμαχισμένα φύλλα για έγχυμα	Βελτίωση τη πέψης	1-2 g/250 mL, 2-3 φορές την ημέρα (2-4 g/ημερησίως)
	1990	Κονιορτοποιημένα φύλλα σε κάψουλες	Σε δυσπεψία. Βελτίωση τη πέψης	2 κάψουλες (250 mg) 3 φορές την ημέρα
Πολωνία	>30 χρόνια	Έγχυμα	Σε δυσπεπτικά προβλήματα. Βελτίωση της λειτουργίας του ήπατος και της χολής	2 g, 1-2 φορές την ημέρα
		Αφέψημα (εξωτερική χρήση)	επικουρική θεραπεία στα ρευματικά προβλήματα και στις διαταραχές του κυκλοφορικού	1 L αφεψήματος (1:20) σε μια μπανιέρα νερό (2 φορές την εβδομάδα)
Γερμανία	1976 εσωτερική χρήση	Εκχύλισμα (1:17.5-18.9), διαλύτης εκχύλισης οίνος λικέρ	Παραδοσιακή χρήση για την ενίσχυση της λειτουργίας του κυκλοφορικού και της καρδιάς	20 mL, 2-3 φορές την ημέρα. [100 g υγρού περιέχουν 94,816 g εκχυλίσματος. 700 mL = 721 g υγρού] 10 mL, 2-3 φορές την ημέρα
		Εκχύλισμα (1:12.5-13.5), διαλύτης εκχύλισης οίνος λικέρ	Παραδοσιακή χρήση για την ενίσχυση της λειτουργίας του κυκλοφορικού και της καρδιάς	20 mL μία με δύο φορές την ημέρα
		Χυμός (1:1.8-2.2)	Παραδοσιακή χρήση για την ενίσχυση της λειτουργίας του κυκλοφορικού και της καρδιάς	5 mL (100% χυμός), 2-3 φορές ημερησίως.

2. Διτερπένια αβιετανίου

Το αβιετάνιο είναι ένα διτερπένιο που αποτελεί τη δομική βάση για μια ποικιλία φυσικών χημικών ενώσεων όπως το αβιετικό οξύ, το καρνοσικό οξύ και η φερουγκινόλη, οι οποίες είναι συλλογικά γνωστές ως αβιετάνες ή διτερπένια αβιετανίου (εικόνα 6).

Οι αβιετάνες βρίσκονται στους ιστούς και τις ρητίνες ανώτερων φυτών, ιδιαίτερα των γυμνόσπερμων. Αν και οι λειτουργίες των τερπενίων δεν είναι πλήρως κατανοητές, τα κωνοφόρα φαίνεται να παράγουν διτερπενοειδή αβιετανίου ως μια μορφή άμυνας έναντι της επίθεσης εντόμων και μικροβίων. Ορισμένα, ιδιαίτερα τα αρωματικά αβιετάνια, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις πιθανές βιολογικές τους δραστηριότητες.

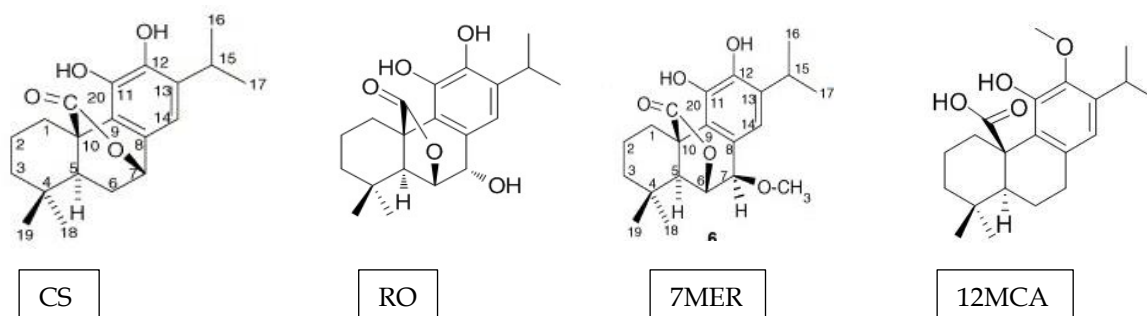
Όσον αφορά τη χημική τους δομή τα αβιετάνια είναι τρικυκλικά διτερπενοειδή 20 ατόμων άνθρακα που χαρακτηρίζονται από τρεις συμπυκνωμένους εξαμελείς δακτυλίους και αλκυλικές λειτουργικές ομάδες στους άνθρακες 4, 10 και 13. Τα αβιετάνια είναι γενικά μη πολικά. Η παρουσία μιας ή περισσότερων πολικών λειτουργικών ομάδων (συνήθως καρβοξυλικού οξέος ή αλκοόλης) αυξάνει την πολικότητα του αβιετανίου.



Εικόνα 6

Χημικός τύπος αβιετανίου και 3 από τα βασικά του παράγωγα: το αβιετικό οξύ, το καρνοσικό οξύ και η φερουγκινόλη.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στο 12-O-μεθυλοκαρνοοικό οξύ (12MCA) και στο καρνοοικό οξύ (CA) με τα παράγωγα του: την καρνοσόλη (CS), τη ροσμανόλη (RO) και την 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη (7MER) (εικόνα 7). Στα προαναφερόμενα διτερπένια αποδίδονται διάφορες φαρμακολογικές δράσεις όπως: αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντι-HIV, αντιική, αντι-Alzheimer, αντιαιμοπεταλιακή, νευροπροστατευτική, αντικαρκινική, αντιδιαβητική αντιμικροβιακή, γαστροπροστατευτική κ.α. (González 2015).



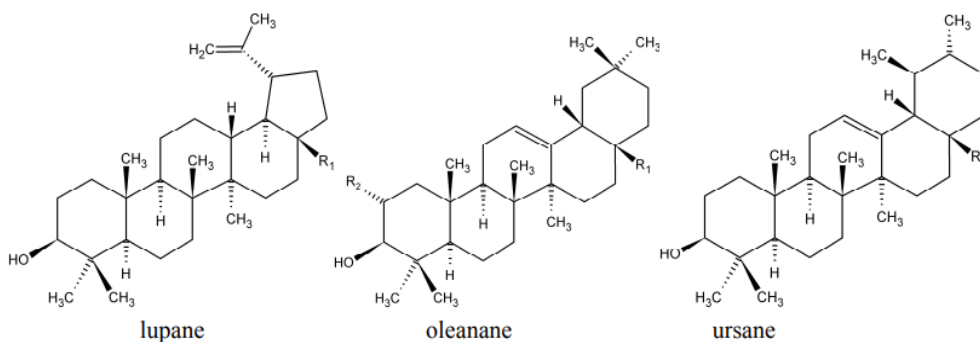
Εικόνα 7

Χημικοί τύποι: 12-O-μεθυλοκαρνοοικό οξύ (12MCA), καρνοσόλη (CS), ροσμανόλη (RO), 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη (7MER)

3. Πεντακυκλικά τριτερπένια

Τα πεντακυκλικά τριτερπένια είναι δευτερεύοντες φυτικοί μεταβολίτες ευρέως διαδεδομένοι στη φλούδα των φρούτων, στα φύλλα και στο φλοιό. Ταξινομούνται στα τριτερπένια λουπανίου, ολεανάνης και ουρσανίου (εικόνα 8). Εμφανίζουν διάφορες φαρμακολογικές δράσεις, ενώ στερούνται σημαντικής τοξικότητας (Jäger et al. 2009).

Στην παρούσα διατριβή επικεντρωθήκαμε στο μπετουλινικό οξύ (BA), στο ουρσολικό (UA) οξύ και το ολεανολικό οξύ (OA).



Triterpene family	Triterpene	R₁	R₂
lupane	lupeol	CH ₃	
	betulin	CH ₂ OH	
	betulinic acid	COOH	
oleanane	β-amyrin	CH ₃	H
	erythrodiol	CH ₂ OH	H
	oleanolic acid	COOH	H
	maslinic acid	COOH	OH
ursane	α-amyrin	CH ₃	
	uvaol	CH ₂ OH	
	ursolic acid	COOH	

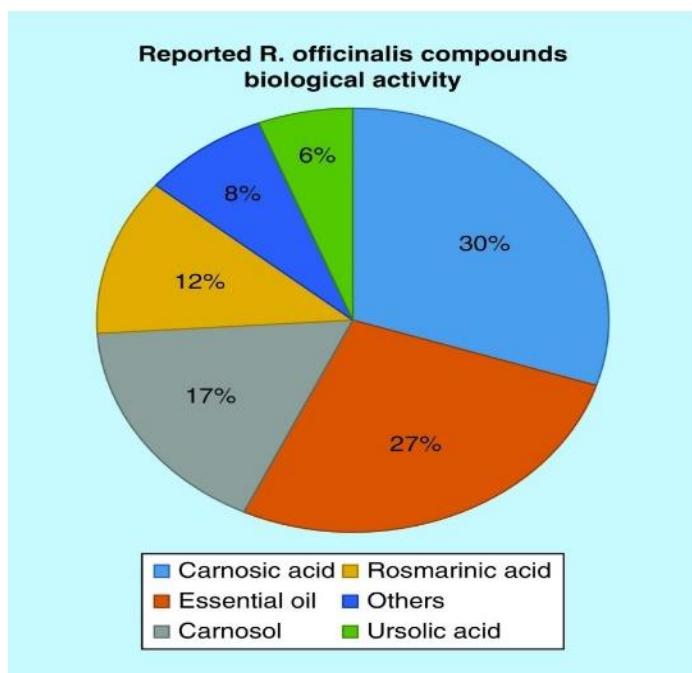
Εικόνα 8

Ταξινόμηση των πεντακυκλικών τριτερπενίων.

4. Ανίχνευση και ποσοτική ανάλυση των διτερπενίων αβιετανίου σε είδη της οικογένειας των Χειλανθών (*Lamiaceae*)

Μεταξύ των διάφορων φυτών, το δεντρολίβανο και το φασκόμηλο είναι ευρέως αποδεκτά ως βότανα με υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες: φαινολικά διτερπένια, φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα. Διάφορες μελέτες σχετικά με τα αντιοξειδωτικά συστατικά του δεντρολίβανου δείχνουν ότι οι πιο δραστικές ενώσεις είναι τα φαινολικά διτερπένια καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, ροσμανόλη, 7-μεθυλ-επιροσμανόλη, επιροσμανόλη και ισοροσμανόλη (Madhavi et al. 1996, Chipault et al. 1952, Inatani et al. 1983, Schwarz et al. 1992 (a), Schwarz et al. 1992 (b), Cuvelier et al. 1996, Babovic et al. 2010, Ninomiya et al. 2004)

Το καρνοσικό οξύ αφορά περίπου το 30% των μελετών και είναι η πλέον μελετημένη βιοδραστική ένωση του *R. officinalis* L. Ακολουθεί η καρνοσόλη με 17%. Το ροσμανικό οξύ και το ουρσολικό οξύ αποτελούν το 18% των ερευνητικών μελετών (Andrade et al. 2018) (εικόνα 9).



Εικόνα 9

Ποσοστό μελετών βιολογικής δραστηριότητας του *R. officinalis* L. που σχετίζονται με τον κάθε φαρμακολογικά σημαντικό μεταβολίτη (από όλα τα βιβλιογραφικά δεδομένα που ερευνηθήκαν από τους Andrade et al. 2018).

Όπως προαναφέρθηκε οι μεταβολίτες καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη απαντώνται στα φυτά *S. officinalis* L., *S. fruticosa* Mill.

Μέχρι σήμερα, τα φαινολικά διτερπένια CA, CS, 12MCA, 7MER και RO έχουν αναγνωριστεί αποκλειστικά σε φυτά της οικογένειας των Χειλανθών. Μεταξύ των γενών της οικογένειας αυτής με τα περισσότερα μέλη είναι τα *Teucrium*, *Scutellaria*, *Prunella*, *Stachys* και *Salvia* (Wu 1982).

Εμφανίζει συνεπώς ιδιαίτερο ενδιαφέρον να ερευνηθεί ποιοτικά και ποσοτικά εάν αυτές οι ουσίες υπάρχουν σε άλλες δρόγες που φύονται-καλλιεργούνται στην Ελλάδα. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι όλες οι προαναφερόμενες ουσίες έχουν γνωστή ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση των αντιοξειδωτικών στη βιομηχανία τροφίμων όχι μόνο για την εφαρμογή τους ως συντηρητικά τροφίμων αλλά και εξαιτίας των ευεργετικών τους δράσεων στην ανθρώπινη υγεία. Η πλειονότητα των φυσικών αντιοξειδωτικών είναι φαινολικές ενώσεις ή πολυφαινόλες και η αντιοξειδωτική δράση πολλών φυσικών εκχυλισμάτων οφείλεται σε τέτοιου είδους ενώσεις.

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων φυτών του γένους *Salvia* σχετίζεται με το συνολικό φαινολικό τους περιεχόμενο. Ως εκ τούτου φυτικά εκχυλίσματα πλούσια σε πολυφαινόλες (κυρίως φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή) έχουν συνήθως σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα (Roby et al. 2013, Tosun et al. 2009).

Αξιζει να σημειωθεί ότι οι πολυφαινόλες με δύο υδροξυλικές ομάδες σε θέση όρθο μπορούν να ασκήσουν την προστατευτική τους δράση μέσω χηλίωσης των μεταλλικών ιόντων κατά τη διάρκεια την αντίδρασης Fenton (Rice-Evans 1996). Σύμφωνα με αυτό,

είναι κατανοητό ότι η υψηλή περιεκτικότητα σε καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ, που συναντάται σε φασκόμηλο και δεντρολίβανο, κατέχουν σημαντικότατο ρόλο στην ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των φυτών αυτών μέσω αυτού του μηχανισμού (Babonić 2010).

Δεδομένης της ιδιαίτερης φαρμακολογικής αξίας των διτερπενικών πολυφαινόλων αβιετανίου που έχουν ταυτοποιηθεί στο δεντρολίβανο και στο φασκόμηλο γεννήθηκε η απορία αν αυτοί οι μεταβολίτες υπάρχουν και σε τι ποσότητες και σε άλλα φυτά της Ελλάδας, της ίδιας βοτανικής οικογένειας.

Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκε μια μέθοδος για την ποσοτική και ποιοτική μελέτη 61 φυτών της οικογένειας των Χειλανθών (*Lamiaceae*) που φύονται ή/και καλλιεργούνται στην Ελλάδα, όσον αφορά τις προαναφερόμενες διτερπενικές φαινόλες, όπως επίσης και την 4',7-Ο-διμεθυλαπιγενίνη και το μπετουλινικό οξύ.

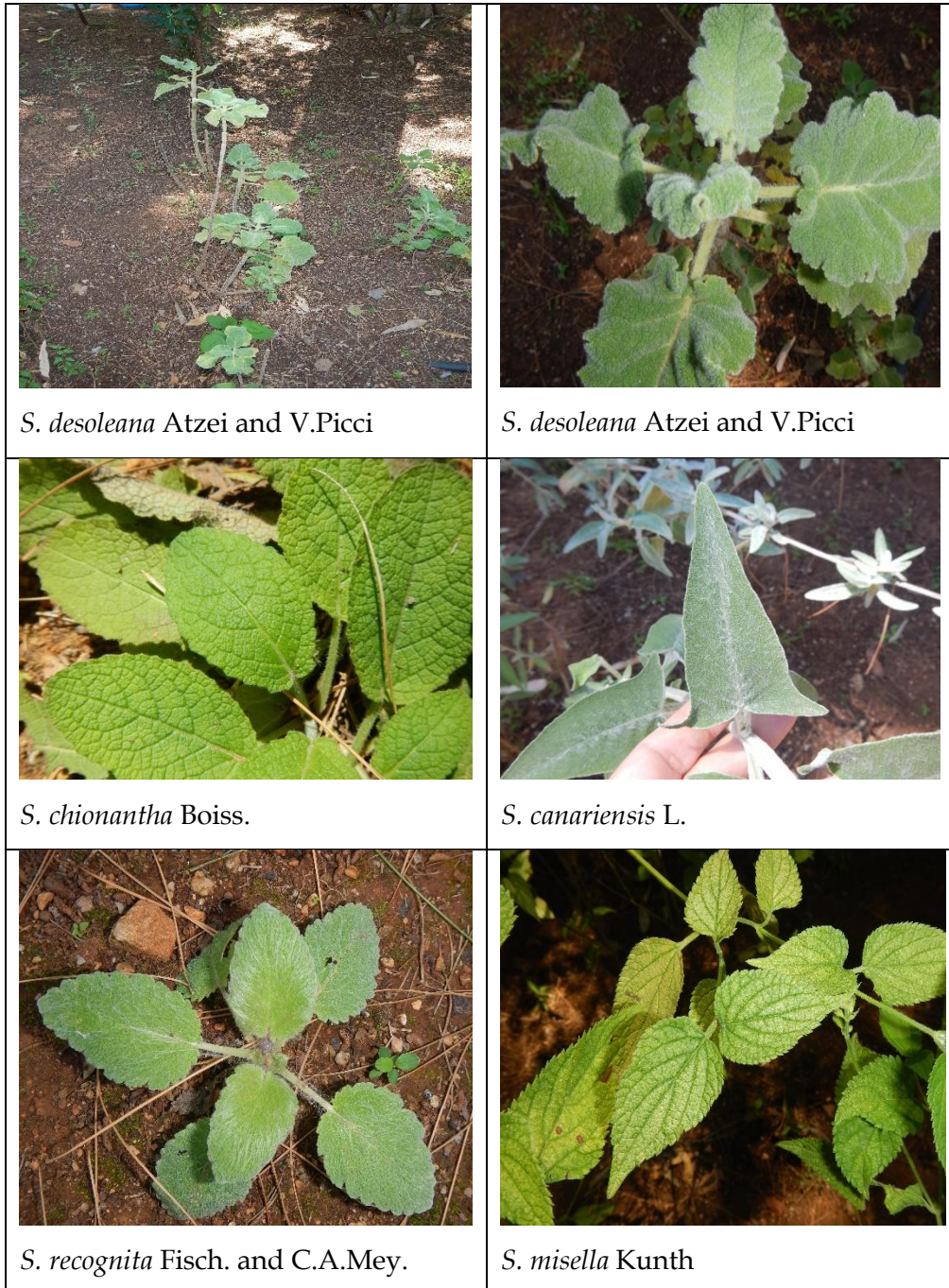
4.1 Επιλογή φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* που φύονται-καλλιεργούνται στην Ελλάδα για την ποιοτική και ποσοτική μελέτη των εξεταζόμενων ουσιών

Από τα φυτά που επιλέχθηκαν ήταν:

- διάφορα είδη του γένους *Salvia*:
 - *Salvia argentea* L. (Σάλβια η αργυρόχρους)
 - *Salvia ringens* Sibth. and Sm. (Σάλβια η χαίνουσα)
 - *Salvia pomifera subsp. pomifera* L. (Σάλβια η μηλοφόρος, Κρητικό φασκόμηλο)
 - *Salvia pomifera subsp. calycina* (Sm) Hayek (Σάλβια η μηλοφόρος, Μηλοσφακιά)
 - *Salvia sclarea* L. (Σάλβια η ερυθρανθής)
 - *Salvia superba* (σάλβια η υπερήφανη) (υβρίδιο των *Salvia nemorosa* L. και *Salvia Sylvestris* L.)
 - *Salvia microphylla* Kunth (Σάλβια η μικρόφυλλος)
 - *Salvia bucharica* Popov. (Σάλβια της Μπουχάρ)
 - *Salvia chionantha* Boiss. (Σάλβια η χιονανθής)
 - *Salvia aurita* L. (Σάλβια η έχουσα μεγάλους λοβούς)
 - *Salvia glutinosa* L. (Σάλβια η γλουτινώδης)
 - *Salvia canariensis* L. (Σάλβια των Καναρίων)
 - *Salvia scabiosifolia* Lam. (Σάλβια η σκαβιοζόφυλλος)
 - *Salvia misella* Kunth (Σάλβια η μικρά)
 - *Salvia viscosa* Jacq. (Σάλβια η αδενώδης)
 - *Salvia desoleana* Atzei and V. Picci (Σάλβια η ντεσολεάνειος)
 - *Salvia cadmica* Boiss. (Σάλβια του Κάδμου)
 - *Salvia sclarea var. turkestanica* (Noter) Mottet (Σάλβια η ερυθρανθής του Τουρκεστάν)
 - *Salvia somalensis* Vatke (Σάλβια της Σομαλίας)
 - *Salvia verticillata* L. (Σάλβια η σπονδυλωτή)
 - *Salvia leucantha* Cav. (Σάλβια η λευκανθής)
 - *Salvia recognita* Fish. And C.A. Mey (Σάλβια η αξέχαστη)
 - *Salvia transsylvanica* Schur (Σάλβια της Τρανσυλβανίας)

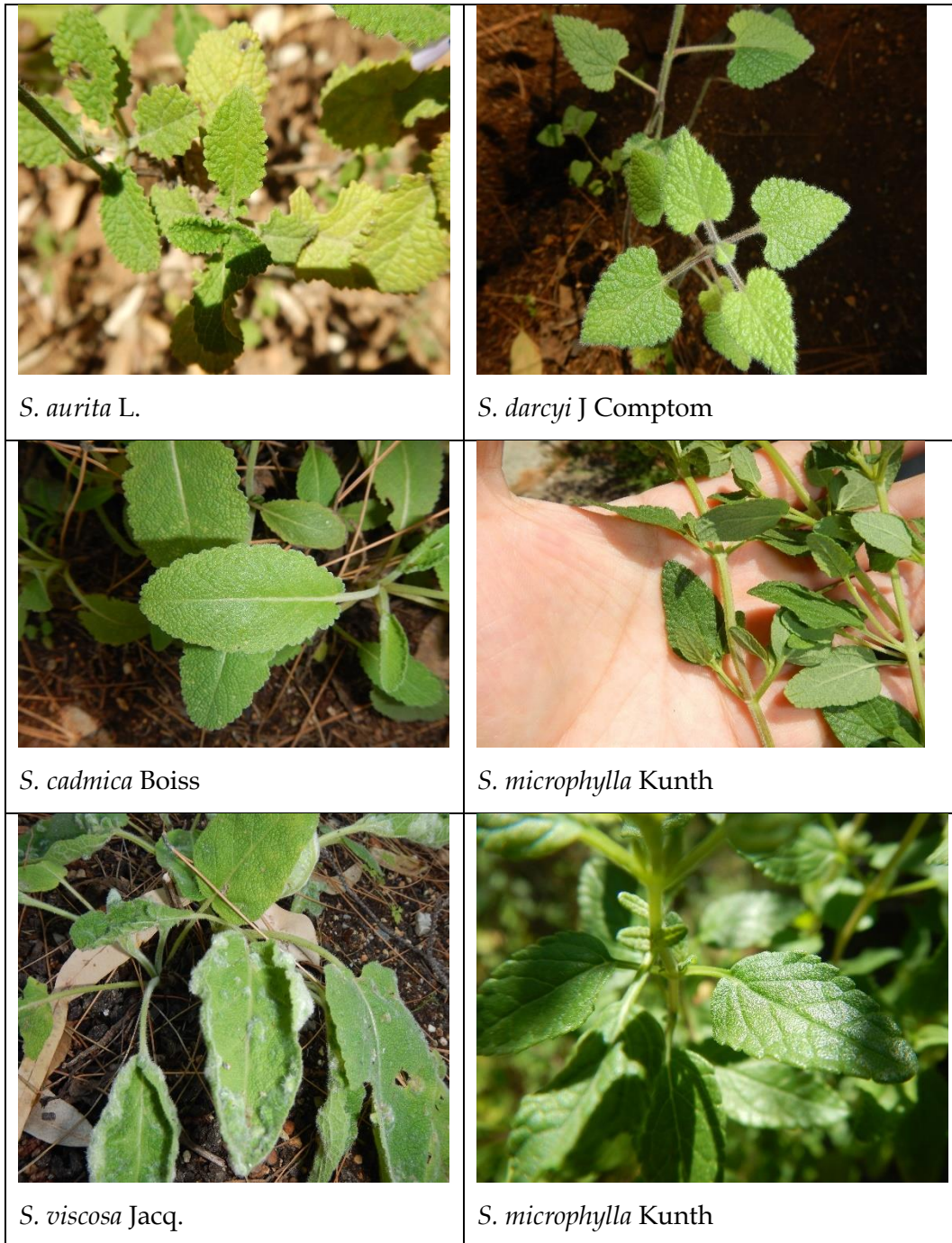
- *Salvia dominica* L. (Σάλβια του Δομίνικου)
- *Salvia virgata* Jacq. (Σάλβια η ραβδωτή)
- *Salvia pratensis* L. (Σάλβια η λειμώνιος)
- *Salvia darcyi* J Comptom, Darcy's Μεξικάνικο φασκόμηλο
- *S. fruticosa* Mill. (συνώνυμο της *S. triloba* L. φασκόμηλο το θαμνώδες ή φασκόμηλο το τρίλοβο ή Ελληνικό φασκόμηλο)
- *S. officinalis* L. (φασκόμηλο το φαρμακευτικό ή κοινό φασκόμηλο)
- διάφορα είδη του γένους *Rosmarinus*:
 - *Rosmarinus officinalis* L. (ορθόκλαδο δεντρολίβανο)
 - *Rosmarinus officinalis* var. *prostratus* Pasq. (έρπον δεντρολίβανο)
- λόγω της μεγάλης τους εξάπλωσης στον Ελλαδικό χώρο και μιας κάποιας μορφολογικής ομοιότητας με το φασκόμηλο:
 - *Phlomis fruticosa* L. (Φλόμις η θαμνώδης, ασφάκα)
 - *Phlomis cretica* C. Presl (Φλόμις της Κρήτης, κρητική ασφάκα)
- φυτά πολύ γνωστά για την φαρμακολογική τους αξία και πολύ διαδεδομένα για την χρήση τους ως εγχύματα-αφεψήματα, ως συστατικά σε συμπληρώματα διατροφής, σε ιατροτεχνολογικά προϊόντα ή ως καρυκεύματα, όπως:
 - *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) (Ελληνική ρίγανη)
 - *Origanum majorana* L. (Ορίγανον η μαντζουράνα)
 - *Origanum dictamnus* L. (Ορίγανον το δίκταμνον)
 - *Coridothymus capitatus* L. (Θύμος ο κεφαλωτός)
 - *Mentha pulegium* L. (Μίνθη η γλήχων, φλισκούνη)
 - *Mentha spicata* L. (Μίνθη η σταχυώδης, δυόσμος)
 - *Mentha longifolia* L. (Μίνθη η μακρόφυλλος)
 - *Sideritis clandestina* Chaub and Bory (Σιδηριτίδα η λαθραία)
 - *Hyssopus officinalis* L. (Υσσωπος ο φαρμακευτικός)
 - *Melissa officinalis* L. (Μέλισσα η φαρμακευτική)
 - *Lavandula angustifolia* Mill. (Λεβάντα η στενόφυλλος)
 - *Ocimum basilicum* L. (Ωκίμον το βασιλικόν, βασιλικός ο πλατύφυλλος)
- φυτά λιγότερο διαδεδομένα όπως:
 - *Satureja thymbra* L. (Σατουρέγια η θύμβρα, θρούμπι),
 - *Betonica officinalis* L. (συνώνυμο του *Stachys officinalis*) (Βετονίκη η φαρμακευτική, συνώνυμο του Στάχης ο φαρμακευτικός)
 - *Nepeta cataria* L. (Νεπέτα η γατόφιλη)
 - *Marrubium album* Garsault (Μαρούβιο το λευκό)
 - *Satureja juliana* L. (Σατουρέγια η ιουλιανή, τραγορίγανος)
 - *Stachys candida* subsp. *chrysantha* Boiss. and Heldr. (Στάχης ο χρυσαυτός)
 - *Stachys iosa* Griseb (Στάχης ο λευκός, τσάι του βουνού το λευκό)
 - *Teucrium capitatum* L. (Τεύκριον το κεφαλωτόν)
 - *Teucrium flavum* L. (Τεύκριον τό ξανθόν)
 - *Lamium album* L. (Λάμιο το λευκό)
 - *Lamium garganicum* L. (Λάμιο το γαργανικό)
 - *Ballota acetabulosa* L. (Βαλωτή η κρατηροειδής, το λυχναράκι)
 - *Lavandula stoechas* L. (Λεβάντα η στοιχάς)

- *Lavandula dentata* L. (Λεβάντα η οδοντωτή)
- *Nepeta melissifolia* Lam. (Νεπέτα η μελισσόφιλη)
- *Stachys officinalis* (L.) Trevis (Στάχυς ο φαρμακευτικός).



Εικόνα 10

Φωτογραφίες φυτών της οικογένειας Labiatae από το βοτανικό κήπο του ΕΚΠΑ, Ιουλίας και Αλεξάνδρου Ν. Διομήδους.



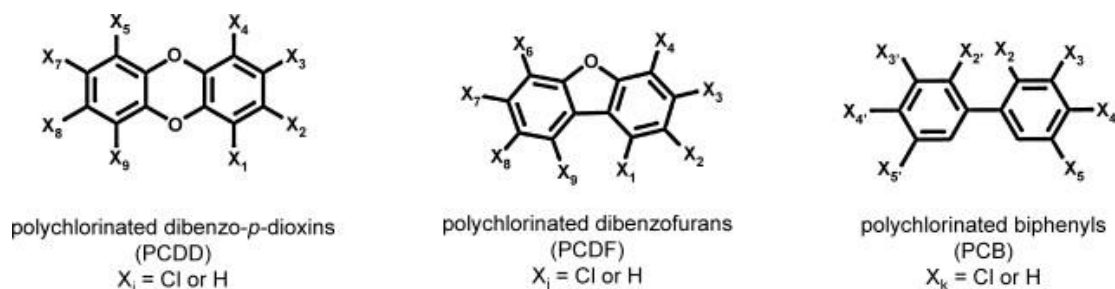
Εικόνα 11

Φωτογραφίες φυτών της οικογένειας Labiatae από το βοτανικό κήπο του ΕΚΠΑ, Ιουλίας και Αλεξάνδρου Ν. Διομήδους.

5. Διοξίνες και τοξικότητα τους

Ο όρος διοξίνες αναφέρεται στις πολυχλωριωμένες διβενζοδιοξίνες (PCDDs), στα πολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια (PCDFs) και στα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) εικόνα 12.

Ορισμένες από τις διοξίνες έχουν επιβλαβή χαρακτηριστικά ανάλογα με τον αριθμό και τη θέση των ατόμων χλωρίου στα μόρια τους. Από τα 210 μέλη PCDD και PCDFs μόνο τα 17 είναι τοξικά. Η 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-*p*-διοξίνη (2,3,7,8-TCDD), ένα μόριο με τέσσερα άτομα χλωρίου, είναι η πιο γνωστή και η πιο τοξική διοξίνη (www.greenfacts.org/en/dioxins/index, Marinkovic et al. 2010).



Εικόνα 12

Οι χημικές δομές των διοξινών: PCDDs, PCDFs και PCBs (Sorg et al. 2014).

Η TCDD έχει το υψηλότερο τοξικό δυναμικό (τοξικό ισοδύναμο παράγοντα), και για αυτό τα τοξικά δυναμικά των άλλων 16 PCDD και PCDF ορίζονται σε σύγκριση με αυτό της TCDD (McKay 2002).

Οι διοξίνες δεν έχουν καμία χρησιμότητα. Οι μοναδικές φυσικές πηγές τους είναι οι δασικές πυρκαγιές και οι ηφαιστειακές δραστηριότητες. Οι περισσότερες διοξίνες σχηματίζονται και απελευθερώνονται ως υποπροϊόντα των ανθρώπινων δραστηριοτήτων, κυρίως μέσω των βιομηχανικών διαδικασιών και τις διαδικασίες ατελούς καύσης, όπως καύσης αποβλήτων. Άλλες πηγές διοξινών στην ατμόσφαιρα περιλαμβάνουν την καύση οργανικών χλωριωμένων ενώσεων όπως τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs). Μολύνουν επίσης διάφορα χλωριωμένα φυτοφάρμακα και ζιζανιοκτόνα. Οι διοξίνες απελευθερώνονται στα απόβλητα ύδατα του χαρτοπολτού και χαρτιού που χρησιμοποιούν χλώριο ή χημικά με χλώριο στη διαδικασία λεύκανσης (www.greenfacts.org/en/dioxins/dioxins-greenfacts-level2.pdf, Marinkovic et al. 2010).

Ωστόσο, οι κύριες βιομηχανικές πηγές εκπομπών των διοξινών, που συμβάλλουν στο 45% των συνολικών εκπομπών, είναι οι αποτεφρωτήρες αποβλήτων, σιδηρούχα και μη σιδηρούχα παραγωγή μετάλλων, η παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας και θέρμανσης ενώ περίπου το 40% των συνολικών εκπομπών απελευθερώνεται από τις ανεξέλεγκτες διεργασίες καύσης (Ren et al. 2009).

Σε καθαρή μορφή οι διοξίνες είναι άχρωμα στερεά ή κρύσταλλοι, αλλά εισέρχονται στο περιβάλλον ως μείγματα που περιέχουν ποικιλία μεμονωμένων συστατικών και σε προσμείξεις. Οι διοξίνες που σχηματίζονται μετά από καύση δεσμεύονται σε σωματίδια όπως η τέφρα. Μικρά σωματίδια μπορεί να μεταφερθούν σε πολύ μεγάλες αποστάσεις από την πηγή εκπομπών. Οι διοξίνες είναι πολύ λιπόφιλες

ενώσεις, και η διαλυτότητά τους στους οργανικές διαλύτες αυξάνεται με την περιεκτικότητα σε χλώριο. Λόγω της υδροφοβίας τους, όταν βρίσκονται σε υδάτινο περιβάλλον, προσκολλούνται σε οτιδήποτε οργανικό, ειδικά σε μικροσκοπικά φυτά και ζώα (πλαγκτόν) που τρώγονται από μεγαλύτερα ζώα. Αυτός είναι ο τρόπος με τον οποίο οι διοξίνες κυκλοφορούν και συσσωρεύονται στα στάδια της τροφικής αλυσίδας.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι διοξίνες βρίσκονται σε μείγματα με άλλες διοξίνες και δομικά συγγενείς ενώσεις (PCBs), είναι πολύ δύσκολο να υπολογιστεί η τοξικότητά τους. Ο παράγοντας τοξικής ισοδυναμίας (TEF) της 2,3,7,8-TCDD είναι 1. Όλες οι άλλες τιμές TEF εκφράζονται σε σχέση με αυτή, και δείχνουν τη σχετική τοξικότητα των άλλων διοξινών. Η τοξική ισχύς ενός μείγματος είναι το άθροισμα των γινομένων του εκάστου TEF με την συγκέντρωση της κάθε ένωσης. Η τιμή που προκύπτει είναι γνωστή ως τοξικό ισοδύναμο (TEQ) (www.greenfacts.org/en/dioxins/dioxins-greenfacts-level2.pdf, Kulkarni et al. 2008).

Ο γενικός πληθυσμός είναι εκτεθειμένος κυρίως σε περιβαλλοντολογικό επίπεδο. Η έκθεση στις διοξίνες περιλαμβάνει και δευτερεύουσες διαδρομές, όπως τρόφιμα ζωικής προέλευσης ή άλλα προϊόντα που τις περιέχουν. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) ζωικά προϊόντα όπως το κρέας, τα ψάρια και τα αυγά αποτελούν σημαντικότερη πηγή διοξινών στους ανθρώπους (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs225/en/index)

Η έκθεση μπορεί επίσης να γίνει με την εισπνοή, με το πόσιμο νερό και με δερματική απορρόφηση. Μόλις οι διοξίνες εισέλθουν στο ανθρώπινο σώμα, ένα μέρος τους μεταβολίζεται και απεκκρίνεται, ενώ το υπόλοιπο αποθηκεύεται στο σωματικό λίπος. Οι διοξίνες, ως εξαιρετικά λιπόφιλες ουσίες, για να καταφέρει ο οργανισμός να τις αποβάλλει, πρέπει να τις μετατρέψει μέσω του μεταβολισμού σε πολικά παράγωγα. Ο βιολογικός χρόνος ημίσειας ζωής διαφέρει μεταξύ τους. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της TCDD είναι 7-11 έτη (Olson et al. 1994).

Η απομάκρυνση εξαρτάται από τη δόση, την ηλικία και την ποσότητα του σωματικού λίπους. Οι Aylward et al. (2005), έδειξαν ότι υπάρχει μεταβλητότητα της ατομικής ικανότητας εξάλειψης της TCDD. Για παράδειγμα η εξάλειψη ήταν ταχύτερη στους άνδρες και τους νέους από ό,τι στις γυναίκες και τους ηλικιωμένους. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η απέκκριση της TCDD είναι δοσο-εξαρτώμενη. Ο ρυθμός απέκκρισης ήταν πολύ μεγαλύτερος στις υψηλότερες δόσεις διοξίνης από ότι συνέβαινε με χαμηλότερες δόσεις (Emond et al. 2005, Aylward et al. 2005). Ο ΠΟΥ έχει καθορίσει πρότυπα για την ανεκτή καθημερινή έκθεση (TDI) των διοξινών σε TEQ = 1- 4 pg/kg βάρος ανά ημέρα. Σε αυτές τις εκθέσεις δεν έχουν παρατηρηθεί τοξικές επιδράσεις (WHO 1998).

Οι διοξίνες συσσωρεύονται στον λιπώδη ιστό. Μπορούν να μεταβολιστούν μέσω των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 και να απομακρυνθούν. Η οξυγόνωση και η μετατροπή τους σε πολικούς μεταβολίτες είναι το πρώτο βήμα για την απομάκρυνση τους από το σώμα. Η επαγωγή του P4501A1 είναι αποτέλεσμα της αυξημένης μεταγραφής του γονιδίου CYP1A1. Οι πιο ισχυροί επαγωγείς της έκφρασης του CYP1A1 είναι το ινδολο-(2,3-b)-καρβαζόλιο και η TCDD (Ma et al. 2001, Whitlock et al. 1999, Fujii-Kuriyama et al. 2005).

Οι άνθρωποι δεν είναι εξίσου εκτεθειμένοι ή εξίσου ευαίσθητοι στις διοξίνες. Τα έμβρυα και τα νεογνά αποτελούν τις πιο ευαίσθητες ομάδες, ιδίως εκείνα που εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα διοξινών μέσω του μητρικού γάλακτος. Μερικοί ενήλικες εκτίθενται σε υψηλότερες ποσότητες διοξινών από την TDI λόγω των ειδικών διατροφικών τους συνθηκών (κυρίως θαλασσινά) ή λόγω του επαγγέλματος (εργαζόμενοι στη βιομηχανία φυτοφαρμάκων ή στους αποτεφρωτήρες επικίνδυνων αποβλήτων). Η βραχυχρόνια έκθεση σε υψηλά επίπεδα διοξινών είναι γνωστό ότι βλάπτει τη λειτουργία του ήπατος και προκαλεί χλωρακμή, μια σπάνια μορφή ακμής (Marinkovic et al. 2010). Οι δερματικές βλάβες της χλωρακμής εντοπίζονται κυρίως στις παρειές, πίσω από τα αυτιά, τις μασχάλες και στη βουβωνική περιοχή, αλλά σε περίπτωση σοβαρής δηλητηρίασης συναντάται επίσης, στους ώμους, το στήθος, την πλάτη, την κοιλιά, τους μηρούς, τα χέρια και τα πόδια. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία φαγεσώρων, κυστών και φλυκταινών. Η χλωρακμή εμφανίζεται μετά από άμεση έκθεση του δέρματος σε διοξίνες, αν και δεν αποκλείεται και ο μηχανισμός της *per os* απορρόφησης ή της εισπνοής τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα συμπτώματα της χλωρακμής ενδέχεται να μην εμφανίζονται τις πρώτες τρεις έως τέσσερις εβδομάδες μετά την έκθεση σε τοξικές ουσίες. Όμως, σε περιπτώσεις έντονης έκθεσης τα συμπτώματα μπορεί να εμφανιστούν μέσα σε λίγες ημέρες. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι βλάβες μπορεί να εξαφανιστούν περίπου σε δυο χρόνια, όμως, σε άλλες περιπτώσεις, οι βλάβες μπορεί να είναι ενεργές για μερικές δεκαετίες μετά την έκθεση. Η χλωρακμή είναι συνήθως ιδιαίτερα ανθεκτική σε κάθε θεραπεία (Sorg et al. 2009).

Η παρατεταμένη παραμονή της TCDD στο σώμα μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στο νευρικό σύστημα, στο ανοσοποιητικό (εκφυλισμό του θύμου αδένου, ανοσοκαταστολή, απόπτωση των T-κυττάρων και των κυττάρων του θύμου αδένου, ατροφία του σπλήνα), στο αναπαραγωγικό (τερατογένεση), στο καρδιαγγειακό (καρδιακή νόσο, αρτηριακή υπέρταση, αρτηριοσκλήρυνση), στο ενδοκρινολογικό (σακχαρώδης διαβήτης), στο ήπαρ και στο δέρμα (Denison et al. 2011, Pelclova et al. 2006).

Η TCDD χαρακτηρίζεται ως "γνωστό καρκινογόνο για τον άνθρωπο", με βάση τα πολλά στοιχεία επιδημιολογίας που προέρχονται από μελέτες σε ανθρώπους και ζώα (International Agency for Research on Cancer-IARC 1997, Denison et al. 2011)

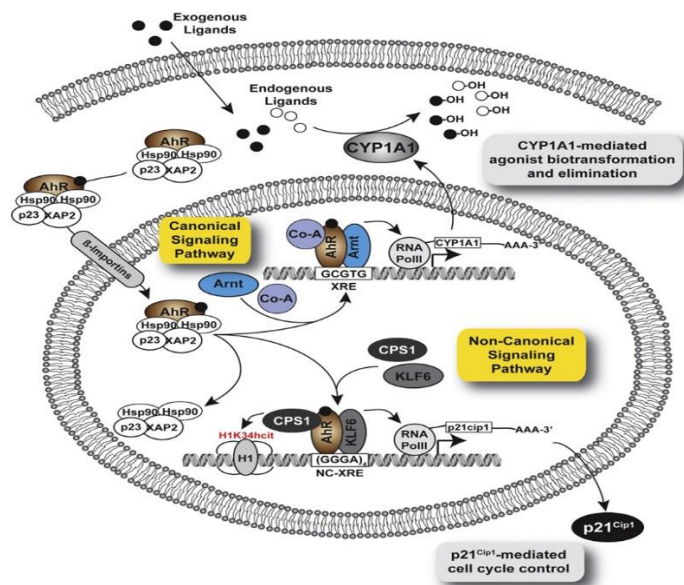
Πολλά ατυχήματα που σχετίζονται με την υπερβολική έκθεση σε διοξίνες που συνέβησαν τον τελευταίο αιώνα μας έχουν δείξει πόσο τοξικές και επικίνδυνες είναι πραγματικά αυτές οι οργανικές ενώσεις. Φαίνεται ότι οι βιολογικές δράσεις των διοξινών πραγματοποιούνται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω του υποδοχέα των διοξινών, AhR (Sorg 2014).

5.1 Υποδοχέας των αρυλοϋδρογονανθράκων (AhR) ή υποδοχέας διοξινών

Ο AhR είναι ένας εξαρτώμενος από το πρόσδεμα μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος, επι απουσίας αγωνιστών, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και διατηρείται σε ανενεργή μορφή μαζί με τις πρωτεΐνες συνοδείας: την p23, την πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (Hsp90) και την πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης AhR (AIP), η οποία ονομάζεται επίσης ARA9 ή πρωτεΐνη 2 που σχετίζεται με το HBV X (XAP-2).

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί βιοχημικοί καταρράκτες που ακολουθούνται μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα των αρυλοϋδρογονανθράκων (AhR) (εικόνα 13):

- η **κανονική οδός (canonical pathway)**, σύμφωνα με την οποία, όταν ένας αγωνιστής διέρχεται από την κυτταρική μεμβράνη και συνδέεται με τον AhR, οι συνοδευτικές πρωτεΐνες απελευθερώνονται και το κυτταροπλασματικό σύμπλεγμα που προκύπτει [AhR-αγωνιστής] συνδέεται με την πρωτεΐνη Arnt. Το νέο σύμπλεγμα [AhR-αγωνιστής-Arnt] μεταναστεύει στον πυρήνα όπου συνδέεται με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA που ονομάζονται στοιχεία ξενοβιοτικής απόκρισης (XRE) και βρίσκονται στην περιοχή προαγωγού διαφόρων γονιδίων, τροποποιώντας την έκφραση των γονιδίων αυτών, μεταξύ των οποίων τα ένζυμα της μεταβολικής φάσης I (π.χ. CYP1A1), τα ένζυμα της φάσης II (π.χ. UGT1A1), αλλά και του καταστολέα του AhR (AhRR), που ρυθμίζει προς τα κάτω τη σηματοδότηση του AhR (Nebert et al. 1993, Stevens et al. 2009, Wright et al. 2017, Napolitano et al. 2018).
- η **μη κανονική οδός (non-canonical pathway)**, στην οποία ο AhR αλληλοεπιδρά με άλλες οδούς σηματοδότησης εξαρτώμενες από άλλους υποδοχείς. Επομένως, ανάλογα με το πρόσδεμα, τον ιστό και/ή τον τύπο των κυττάρων, καθώς και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, η ενεργοποίηση του AhR μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και σε πολλές άλλες κυτταρικές λειτουργίες (Guyot et al. 2013, Ma et al. 2009, Puga et al. 2009).



Εικόνα 13

Οι δύο διαφορετικοί βιοχημικοί καταρράκτες που ακολουθούνται μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα των αρυλοϋδρογονανθράκων (AhR):

- 1) κανονική οδός (canonical pathway)
- 2) μη κανονική οδός (non-canonical pathway) (Wright et al. 2017)

Όπως προαναφέρθηκε ο υποδοχέας των αρυλοϋδρογονανθράκων AhR είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων με πολύπλευρες βιολογικές λειτουργίες. Ο AhR αλληλοεπιδρά τόσο με εξωγενείς όσο και με ενδογενείς ουσίες, με τελικό αποτέλεσμα την διέγερση ή την αναστολή της έκφρασης πολλών

γονιδίων με τοξικές ή προστατευτικές επιδράσεις σε ένα ευρύ φάσμα ειδών και ιστών. Ο AhR εκφράζεται σε όλους τους τύπους των κυττάρων του δέρματος, γεγονός που υποδηλώνει έναν σημαντικό ρόλο του AhR σε αυτό το όργανο φραγμού (Ikuta et al. 2009, Denison et al. 2011, Di Meglio et al. 2014, Napolitano et al. 2018). Πράγματι, ο AhR συμμετέχει στη διατήρηση της ομοιόστασης του δέρματος (Figue et al. 2014), στην ενίσχυση της επούλωσης των πληγών (Barouti et al. 2009) αλλά και στη μερική διαμεσολάβηση της βλάβης της υπεριώδους ακτινοβολίας μέσω της φωτοχημικής ενδοκυτταρικής παραγωγής της 6-φορμυλινδολο[3,2-b]καρβαζόλης (FICZ), ενός πολύ ισχυρού αγωνιστή του AhR (Fritsche et al. 2007).

Επομένως ο AhR, λόγω του πολύπλευρου ρόλου του στην ομοιόσταση και τις ασθένειες του δέρματος, φαίνεται ότι είναι ένας ελκυστικός θεραπευτικός στόχος. Συνεπώς, θα ήταν πολύ σημαντικό να εντοπιστούν φυσικές ενώσεις που θα μπορούσαν να ασκούν τις ευεργετικές βιολογικές τους επιδράσεις μέσω του AhR. Τέτοια μόρια θα μπορούσαν να ήταν χρήσιμα σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως για την πρόληψη ή την αντιμετώπιση του καρκίνου του δέρματος αλλά και για τη θεραπεία των φλεγμονωδών δερματικών παθήσεων.

Περισσότερες πληροφορίες για τον υποδοχέα διοξινών υπάρχουν στο παράρτημα θεωρητικού μέρους στη σελίδα 275.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B1. ΓΕΝΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Όργανα και τεχνικές εκχύλισης, διαχωρισμού, απομόνωσης και ταυτοποίησης των δευτερογενών μεταβολιτών

1.2 Χρωματογραφικές τεχνικές

1.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC).

Αναλυτική ή παρασκευαστική τεχνική χρωματογραφίας για το διαχωρισμό δευτερογενών μεταβολιτών. Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου διαστάσεων 20 x 20 cm (αναλυτική χρωματογραφία και παρασκευαστική) με επίστρωση διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) και με δείκτη φθορισμού. Έγινε χρήση TLC κανονικής φάσεως (normal phase, Silica gel 60 NP F254) και αντίστροφης φάσεως (reverse phase, Silica gel 60 RP-18 F254s)

Για τη ταυτοποίηση των μεταβολιτών απαιτήθηκε ορισμένες φορές μέτρηση του Rf (συντελεστής επιβραδύνσεως) τους στα χρωματογραφήματα. Ο Rf μιας ουσίας προσδιορίζεται από τον ακόλουθο τύπο: $Rf = \frac{\text{Απόσταση που διένυσε το μέτωπο του διαλύτη}}{\text{Απόσταση που διένυσε η ουσία}}$

Αντιδραστήριο εμφάνισης χρωματογραφημάτων TLC:

- Μετά την ανάπτυξη των πλακών επίστρωσης πυριτίου (silica gel) ακολούθησε η παρατήρηση τους στο ορατό φως και στη λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) σε μήκη κύματος 254 nm και 366 nm. Κατόπιν έγινε ψεκασμός με μεθανολικό διάλυμα θειικής βανιλίνης και σύντομη θέρμανση σε θερμοκρασία ~200°C.

Προετοιμασία μεθανολικού διαλύματος θειικής βανιλίνης:

- Ζυγίζονται σε ζυγό (με δύο δεκαδικά ψηφία) 5 g βανιλίνης και διαλύονται σε 100 mL μεθανόλης (αντιδραστήριο 1). Αναμιγνύουμε 5 mL θειικού οξέος σε 95 mL μεθανόλης (αντιδραστήριο 2). Αναμιγνύονται 15 mL από το αντιδραστήριο 1 με 15 mL από το αντιδραστήριο 2 και προκύπτουν 30 mL μεθανολικού διαλύματος θειικής βανιλίνης που συντηρούνται στο ψυγείο.

1.2.2 Χρωματογραφία Στήλης Χαμηλής Πίεσης

Χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των μειγμάτων και των εκχυλισμάτων στα συστατικά τους. Αυτό έγινε με τη βοήθεια διαλυτών έκλουσης αυξανόμενης πολικότητας και τα προϊόντα συλλέχθηκαν σε κλάσματα, ανάλογα με την πολικότητα τους, ενώ η πίεση προερχόταν από την εφαρμογή συμπιεσμένου αέρα επί της στήλης. Η στατική φάση ήταν SiO₂ (Silica gel 40-63μm/Silica flash) και κάθε φορά προστίθετο στη διαχωριστική στήλη ως εναίωρημα στον πρώτο διαλύτη έκλουσης.

Εφαρμόστηκε η τεχνική της ξηρής εναπόθεσης για την προετοιμασία του στερεού μείγματος των ουσιών που θα διαχωρίζονταν. Στην τεχνική αυτή, προστίθεται αρχικά στο στερεό συγκεκριμένη ποσότητα SiO₂ (Silica gel 70-200μm), περίπου διπλάσια από το βάρος του στερεού, και μετά στο μείγμα προστίθεται ένας μη πολικός διαλύτης (CH_x), ο οποίος και εξατμίζεται υπό μειωμένη πίεση. Το αποτέλεσμα είναι το στερεό να γίνει σκόνη με καλές ρεολογικές ιδιότητες. Για να αποφασιστεί ποια από τα

κλάσματα της στήλης θα έπρεπε να συνενωθούν κάθε φορά, πραγματοποιούνταν χρωματογραφήματα TLC κανονικής φάσης.

1.3 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των φυτικών εκχυλισμάτων και ταυτοποίηση των απομονωμένων ουσιών

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των ξηρών εκχυλισμάτων των φυτών, που καθόρισε και την μετέπειτα πορεία της επεξεργασίας τους, έγινε με φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μιας διάστασης (1D $^1\text{H-NMR}$, One-dimension Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy).

Η ταυτοποίηση των απομονωμένων ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη αντιπαραβολή των φασμάτων 1D $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ με αυτά της βιβλιογραφίας.

Η συμβατική 1D-πρωτονιακή NMR φασματοσκοπία έγινε σε όργανο:

- Bruker DRX 400 (400 MHz, ΕΚΠΑ)
- Bruker DRX 500 (500 MHz, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος)
- Bruker DRX 600 (600 MHz, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών)

Τα φάσματα $^{13}\text{C-NMR}$ λήφθηκαν σε όργανο Bruker AC 200 (200 MHz, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος).

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη των φασμάτων ήταν:

- δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3)
- δευτεριωμένη πυριδίνη ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)
- δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD)

Η λήψη φασμάτων 1D $^1\text{H-NMR}$, στα 128 scan με $D1=5$ sec, και κατόπιν η επεξεργασία αυτών μέσω του προγράμματος MestReNova, version 8.0.2.

Ως εσωτερικό πρότυπο στα φάσματα 1D $^1\text{H-NMR}$ χρησιμοποιήθηκε διάλυμα συριγγαλδεΐδης σε ακετονιτριλίο.

Παρασκευή διαλύματος συριγγαλδεΐδης:

- Ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας (τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων) 10,0 mg συριγγαλδεΐδης και τα διαλύουμε σε 20 mL ακετονιτριλίου. Το διάλυμα που προκύπτει διατηρήθηκε στο ψυγείο, 4° C.

Όλες οι χημικές μετατοπίσεις μετρήθηκαν ως δ (ppm), με αναφορά στο εσωτερικό πρότυπο, 3-τριμεθυλοσυλ-2,2',3',3'-τετραδευτεριοπροπιονικό οξύ (TMSP-d₄) ($\delta_{\text{H}} = 0,000$ ppm) γνωστής συγκέντρωσης (0,3 mmol L⁻¹), ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών των φασμάτων είναι η ακόλουθη: s (μονή), brs (ευρεία μονή), d (διπλή), t (τριπλή), q (τετραπλή), quint. (πενταπλή), sept. (επταπλή) και m (πολλαπλή).

Η ποσοτική ανάλυση έγινε με τον υπολογισμό του εμβαδού των κορυφών ενδιαφέροντος σε σχέση με το εμβαδό της κορυφής του εσωτερικού προτύπου που έλαβε την τιμή 1.

Η διαδικασία ποσοτικής ανάλυσης με 1D $^1\text{H-NMR}$ ήταν η εξής: στη σφαιρική φιάλη που περιέχει την κατάλληλη ποσότητα του εκάστοτε εξεταζόμενου δείγματος προστέθηκαν 500 μL διαλύματος συριγγαλδεΐδης με συγκέντρωση 0,5 mg/mL. Ακολούθησε εξάτμιση (υπό κενό σε 40 °C). Κατόπιν το στερεό υπόλειμμα διαλύθηκε με το δευτεριωμένο διαλύτη (π.χ. 700 μL χλωροφορμίου-d, CDCl_3) και μεταφέρθηκε με πιπέτα ακριβείας σε σωληνάκια NMR των 5 mm προς τη λήψη φασμάτων 1D $^1\text{H-NMR}$.

Στην περίπτωση που υπήρχε σήμα στα επίμαχα ppm μιας ουσίας αλλά αντιστοιχούσε σε τιμή συγκέντρωσης:

- μικρότερη του ορίου ανίχνευσης (LOD, Limit Of Detection), τότε η ουσία θεωρήθηκε μη ανιχνεύσιμη (**nd, not detected**)
- μεγαλύτερη ή ίση του LOD αλλά μικρότερη του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ, Limit Of Quantification), η ουσία θεωρείται ανιχνεύσιμη αλλά δεν ήταν εφικτή με μαθηματική ακρίβεια η ποσοτικοποίηση της και αναφέρεται ως ίχνη (**trace**)
- μεγαλύτερη ή ίση του LOQ, τότε η ουσία ταυτοποιήθηκε και έγινε και η ποσοτικοποίηση της.

1.4 Υλικά-Συσκευές

- Διαλύτες: Χρησιμοποιήθηκαν καθαρότητας HPLC (εταιρίες Fluka και Merck).
- Δευτεριωμένοι διαλύτες: Χρησιμοποιήθηκαν CD₃OD (Merck), (C₅D₅N) (Merck) και CDCl₃ (Merck).
- Ακίνητες φάσεις χρωματογραφίας στήλης: Silica gel 0,040-0,063 mm της εταιρίας Merck.
- Πλάκες χρωματογραφίας TLC (20×20 cm): silica gel με υπόστρωμα αλουμινίου και δείκτη φθορισμού της εταιρίας Merck.
- Η συμπύκνωση των διαλυμάτων όπου χρειάστηκε, έγινε υπό μειωμένη πίεση σε Rotavapor R-114 Büchi.
- Η παρατήρηση των χρωματογραφημάτων έγινε σε λάμπα υπεριώδους- ορατού (UV-Vis), σε μήκη κύματος 254nm και 366nm.

2. Συλλογή, αποξήρανση και αποθήκευση των βοτάνων

Για όλα τα υπό εξέταση φυτά της οικογένειας Lamiaceae της παρούσας διατριβής, χρησιμοποιήθηκαν τα φύλλα τους χωρίς κλαδιά. Οι δρόγες συλλέχθηκαν τις πρωινές ώρες κατά την περίοδο της ανθοφορίας των φυτών τον μήνα Ιούλιο.

Η αποξήρανση πραγματοποιήθηκε σε καλά αεριζόμενο δωμάτιο, με σταθερή θερμοκρασία και χωρίς υγρασία, προσέχοντας να είναι οι δρόγες προστατευμένες από το φως. Η αποθήκευση των αποξηραμένων δρογών έγινε σε διάφανα γυάλινα δοχεία με αεροστεγές κάλυμμα σε χώρο χωρίς φως και υγρασία.

Τα φυτά *Salvia argentea* L., *Salvia ringens* Sibth. and Sm., *Salvia pomifera* subsp. *calycina* (Sm) Hayek, *Phlomis cretica* C. Presl, *Phlomis fruticosa* L., *Ballota acetabulosa* L., *Stachys candida* subsp. *chrysantha* (Boiss. and Heldr.), *Stachys iva* Griseb, *Coridothymus capitatus* L., *Mentha pulegium* L., *Mentha spiccata* L., *Mentha longifolia* L., *Melissa officinalis* L., *Sideritis clandestina* Chaub and Bory, *Teucrium capitatum* L., *Teucrium flavum* L., *Lamium garganicum* L., *Satureja thymbra* L. συλλέχθηκαν στο όρος Πάρνωνας της Αρκαδίας, ενώ η *Salvia fruticosa* L. στην Κρήτη (νομός Ηρακλείου, 350m υψόμετρο), τον μήνα Αύγουστο από τον Δρ. Ε. Καλπουτζάκη ο οποίος έκανε και την ταυτοποίηση των φυτών.

Τα φυτά: *Salvia fruticosa* Mill., *Salvia officinalis* L. *Salvia sclarea* L., *Salvia superba*, *Salvia microphylla* Kunth, *Betonica officinalis* L., *Lavandula angustifolia* Mill., *Lavandula stoechas* L., *Lavandula dentata* L., *Satureja Juliana* L., *Salvia bucharica* Popov., *Salvia chionantha* Boiss., *Salvia aurita* L., *Salvia glutinosa* L., *Salvia canariensis* L., *Salvia*

scabiosifolia Lam., *Salvia misella* Kunth, *Salvia viscosa* Jacq., *Salvia desoleana* Atzei and V. Picci, *Salvia cadmica* Boiss., *Salvia sclarea* var. *turkestanica* (Noter) Mottet, *Salvia somalensis* Vatke, *Salvia verticillata* L., *Salvia leucantha* Cav., *Salvia recognita* Fish. and C.A. Mey, *Salvia transsylvanica* Schur, *Salvia dominica* L., *Salvia darcy* J Comptom, *Nepeta melissifolia* Lam., *Rosmarinus officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* var. *Prostratus* Pasq., *Stachys officinalis* (L.) Trevis, *Ocimum basilicum* L., παραλήφθηκαν από τον κ Π. Καλλιμάνη από τον βοτανικό κήπο του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, (Βοτανικός κήπος Ιουλίας και Αλεξάνδρου Ν. Διομήδους, Ιερά οδός 401, Χαϊδάρη), με την βοήθεια της Δρος Ε. Βαλλιανάτου και της κας Παπανικολάου.

Η άγρια *Salvia fruticosa* Mill. Συλλέχθηκε από την περιοχή Άνω Μέλπεια Μεσσηνίας, σε υψόμετρο 600 m από τον κ. Π. Καλλιμάνη. Η *Salvia pomifera* subsp. *pomifera* L. και το *Origanum dictamnus* L., συλλέχθηκαν από το όρος Ψηλορείτης της Κρήτης, σε υψόμετρο 600 m, τα *Origanum majorana* L. και *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) από το Άγιον Όρος, Χαλκιδική, σε υψόμετρο 500 m από τον κ. Δ. Καλλιμάνη.

Τα φυτά *Marrubium album* Garsault, *Hyssopus officinalis* L., *Lamium album* L., *Nepeta cataria* L. και *Betonica officinalis* L., αγοράστηκαν από εξειδικευμένα βοτανοπωλεία στην Αθήνα (“Sensities” Νίκης 33 και “Elixir” Ευρυπίδου 41).

Β2. ΕΙΔΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ_ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

Απομονώσεις των προς μελέτη δευτερογενών μεταβολιτών από τα φύλλα των φυτών:

Rosmarinus officinalis L.,

Salvia microphylla Kunth και

Salvia fruticosa Mill.

“Άλλο να διαβάζεις
και άλλο να μελετάς,
γιατί άλλο την ώρα σου να περνάς
και άλλο να αγαπάς...!”

1. Διαδικασία εκχύλισης

Οι δρόγες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα αποξηραμένα φύλλα των φυτών:

- *Rosmarinus officinalis* L.,
- *Salvia microphylla* Kunth και
- *Salvia fruticosa* Mill., που συλλέχθηκαν από τον βοτανικό κήπο του ΕΚΠΑ.

Το φυτικό υλικό ξηράνθηκε υπό σκιά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ως μέθοδος εκχύλισης των αποξηραμένων δρογών ακολουθήθηκε:

- η εμβροχή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με διαλύτη τη μεθανόλη
- η αφέψηση με νερό

Για την αρχική εκχύλιση των αποξηραμένων φύλλων του *Rosmarinus officinalis* L. και της *Salvia microphylla* Kunth χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εμβροχής σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, αρχικά τεμαχίζεται η δρόγη ώστε να μειωθεί ο όγκος της και να μεγαλώσει το εμβαδό της επιφάνειας επαφής της με το διαλύτη αυξάνοντας την απόδοση της εκχύλισης. Στη συνέχεια η δρόγη φέρεται σε φιάλη (γυάλινη με πώμα) και προστίθεται ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί. Η φιάλη πωματίζεται και αφήνεται διαλύτης-δρόγη σε ηρεμία, προστατευόμενο από το φως, ανακινώντας μία έως τρεις φορές την ημέρα. Με αυτόν τον τρόπο η δρόγη διαβρέχεται από τον διαλύτη. Στην μέθοδο εκχύλισης με εμβροχή ο διαλύτης μένει σε επαφή με την δρόγη για **7 ημέρες**, αν και πολλοί συγγραφείς αναφέρουν και άλλα χρονικά διαστήματα, όπως **5**, **10** και **21 ημέρες**. Στη συνέχεια γίνεται διήθηση. Στο διήθημα που προκύπτει προβλέπεται η επαναφορά του στην αρχική ποσότητα ή όγκο χρησιμοποιώντας τον ίδιο διαλύτη. Συνήθως αυτή η κατεργασία επαναλαμβάνεται με την ίδια δρόγη για δεύτερη και τρίτη φορά, χρησιμοποιώντας τον ίδιο ή διαφορετικό διαλύτη.

Οι αναλογίες δρόγη/διαλύτης που ακολουθούνται μπορεί να είναι %κ.β (βάρος δρόγης σε γραμμάρια/100 γραμμάρια διαλύτη) ή %κ.ο. (βάρος δρόγης σε γραμμάρια σε 100 mL διαλύτη) που είναι και η πιο συχνή. Η δρόγη μπορεί να είναι νωπή ή αποξηραμένη. Η επιλογή του διαλύτη γίνεται με βάση την πολικότητα των μεταβολιτών που επιδιώκεται να εκχυλιστούν (Bettiol et al. 2009, Carasso et al. 2006, Firenzuoli 2009).

Στην παρούσα διατριβή ως αναλογία δρόγη/διαλύτης χρησιμοποιήθηκε η 1:10 βάρος/όγκος (w/v).

Οι χρόνοι εμβροχής ήταν: **12 ώρες**, **48 ώρες**, **7 ημέρες**, **2 μήνες** και **1 χρόνος**.

Τα αποξηραμένα φύλλα του φυτού *Salvia fruticosa* Mill. επεξεργάστηκαν με τη διαδικασία της αφέψησης με διαλύτη το νερό, σε αναλογία Δρόγη : Νερό= 1,5 : 150 w/v. Ο χρόνος αφέψησης ήταν 10 min.

2. Επεξεργασία φύλλων δεντρολίβανου (*Rosmarinus officinalis* L.)

2.1 Παρασκευή ξηρού εκχυλισματος [ROS-7d] και διηθήματος [ΔΒ7] με εμβροχή 7 ημερών

100,0 g αποξηραμένων φύλλων δεντρολίβανου τεμαχίστηκαν (μικρότερα ή ίσα των 0,25 cm). Τοποθετήθηκαν σε γυάλινο φαιόχρωμο περιέκτη που κλείνει αεροστεγώς. Προστέθηκαν 1000 mL μεθανόλης, και αφέθηκε (προστατευμένο από το φως) για 7 ημέρες (7 X 24= 168 ώρες). Κατά το διάστημα αυτό ο περιέκτης

ανακινούνταν 3 φορές την ημέρα. Με τη συμπλήρωση του χρόνου εμβροχής, το περιεχόμενο διηθήθηκε με διηθητικό χαρτί σε κωνική φιάλη (3 L). Στο διήθημα [ΔΑ7] προστέθηκε μεθανόλη μέχρι την επαναφορά του όγκου στο 1 L. Κατόπιν προστέθηκε διπλάσιος όγκος αποσταγμένου ύδατος (2 L) από αυτό του διηθήματος (1 L). Άμεσα εμφανίστηκε ίζημα και ακολούθησε νέα διήθηση. Μετά το τέλος της διήθησης παραλήφθηκε το φίλτρο (διηθητικό χαρτί) με το ίζημα και στέγνωσε σε απαγωγό (εικόνα 14), ενώ το διήθημα [ΔΒ7] μεταφέρθηκε σε αδιάφανο περιέκτη καλά κλεισμένο.

Το ξηρό ίζημα παραλήφθηκε με προσοχή από το διηθητικό χαρτί τοποθετήθηκε σε γουδί πορσελάνης όπου με ιγδίο κονιοποιήθηκε και ζυγίστηκε (9,83 g).



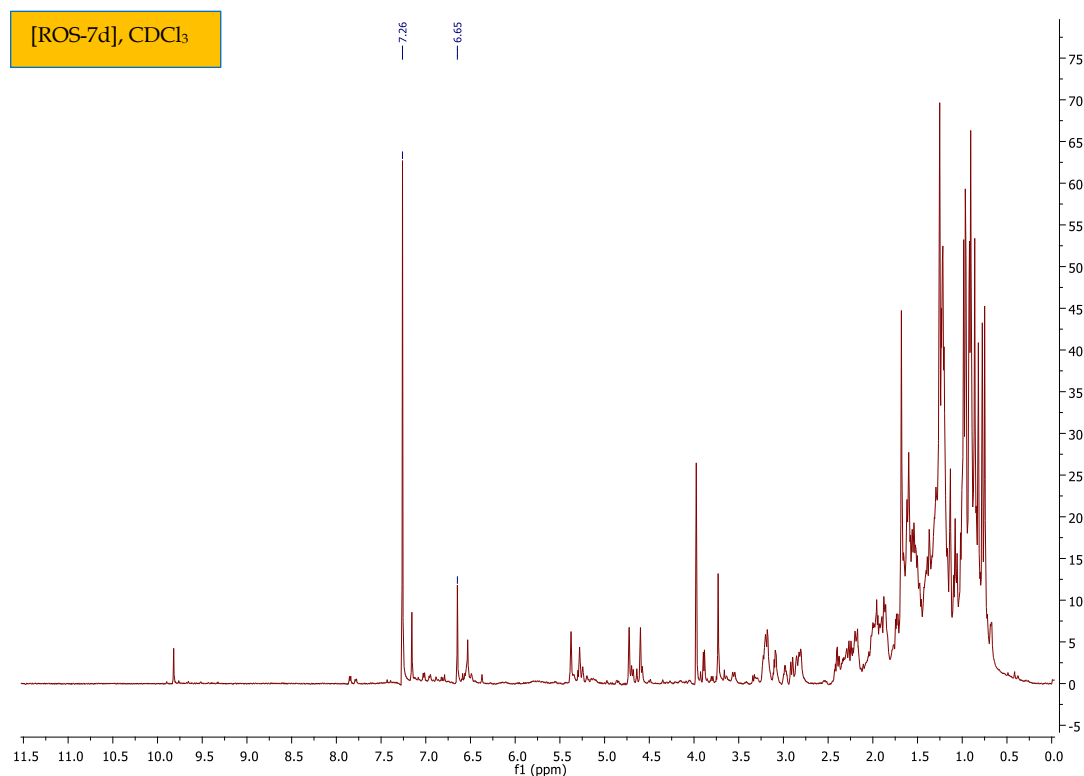
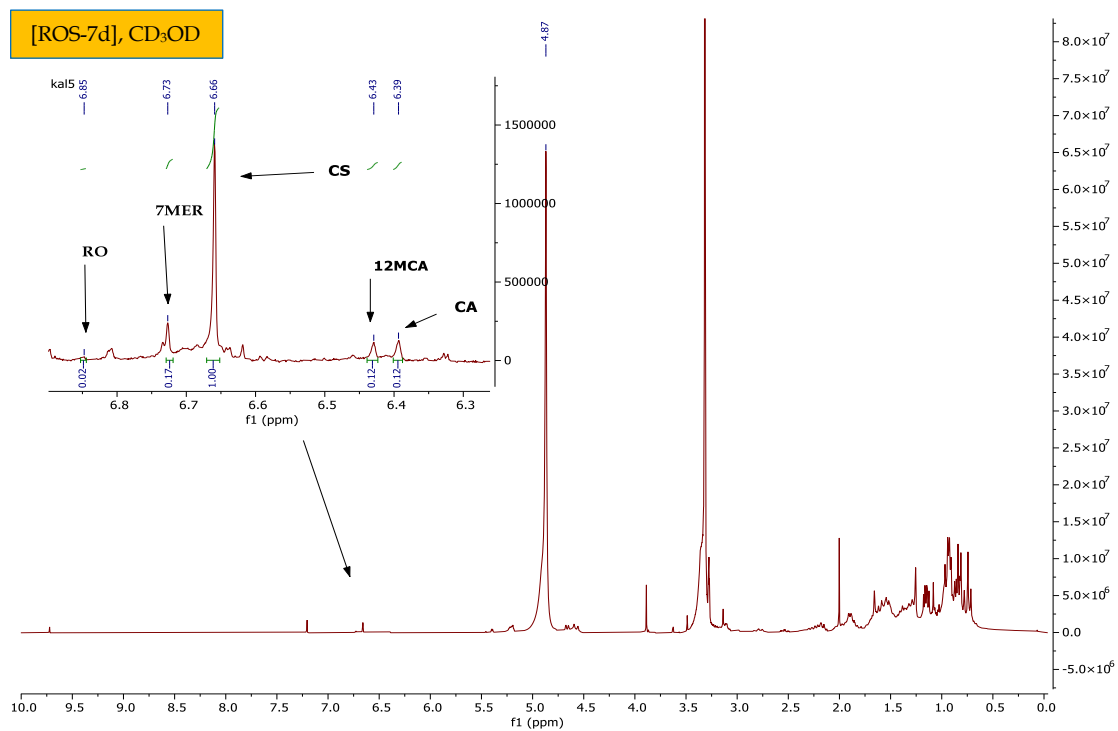
Εικόνα 14

Ξηρό εκχύλισμα [ROS-7d] φύλλων *R. officinalis* L.

Μεταφέρθηκε η σκόνη σε αδιάφανο περιέκτη (που σφραγίζει αεροστεγώς) και αποτελεί το ξηρό εκχύλισμα φύλλων δεντρολίβανου, [ROS-7d].

Λήφθηκαν δύο φάσματα $^1\text{H-NMR}$ του [ROS-7d], ένα με διαλυτή δευτεριωμένο χλωροφόρμιο και ένα σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Τα φάσματα συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας: Amaro-Luis et al. 1997, Ahmed et al. 2006, Ateya et al. 2017, Aydogmus et al. 2006, Dimayuga et al. 1991, Djarmati et al. 1993, Etsassala et al. 2019, Fishedick et al. 2013, Kerkoub et al. 2018, Liu et al. 2013, Macías-Alonso et al. 2019, Marrero et al. 2002, Matloubi et al. 2000, Nishizaki et al. 2019, Pukalskas et al. 2005, Rodriguez-Meizoso et al. 2007, Yamahara et al. 2016, Xiao et al. 2008, Cuvelier et al. 1994, Topcu et al. 2013, Gonzalez et al. 1989, Shun-Hua et al. 1993. Η ανάλυση των φασμάτων έδειξε ότι, όσον αφορά τα διτερπένια αβιετανίου, το ξηρό εκχύλισμα δεντρολίβανου [ROS-7d] είναι πολύ πλούσιο σε καρνοσόλη (CS) και παρουσιάζει μικρότερες ποσότητες σε καρνοσικό οξύ (CA), 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ (12MCA), ροσμανόλη (RO) και 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη (7MER) (σε CD_3OD , CS: CA: 12MCA: RO: 7MER = 1: 0,12: 0,12: 0,02: 0,17) (εικόνα 15).

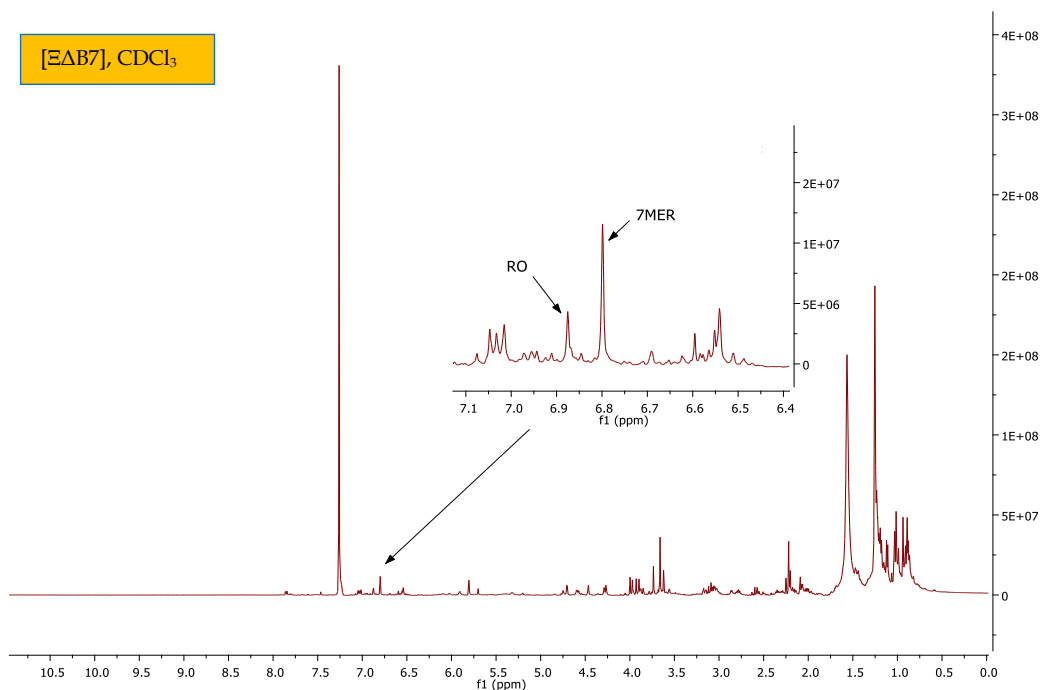


Εικόνα 15

Φάσμα ¹H-NMR σε CDCl₃ και CD₃OD του ξηρού εκχυλίσματος δεντρολίβανου [ROS-7d]. Η ανάλυση του φάσματος δείχνει ότι το εκχύλισμα περιέχει κυρίως CS και μικρότερες ποσότητες σε CA, 12MCA, RO, 7MER. Σε λεπτομέρεια οι μονές κορυφές που αντιστοιχούν στο πρωτόνιο της θέσης 14 των προαναφερόμενων ουσιών και οι αντίστοιχες ολοκληρώσεις.

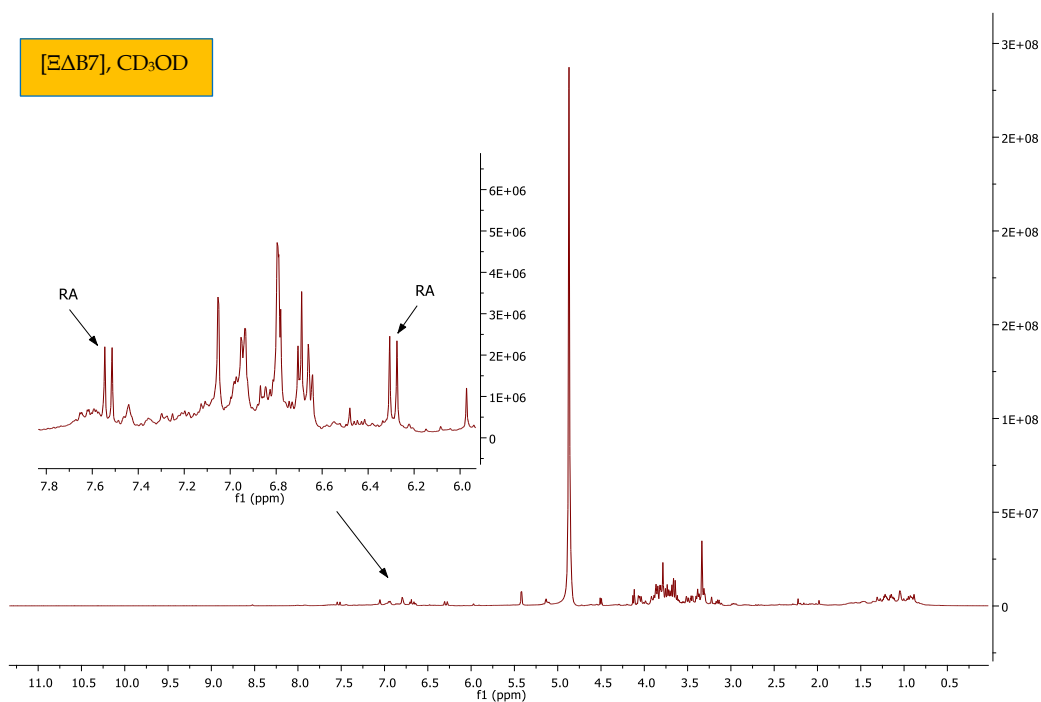
2.1.1 Επεξεργασία του διηθήματος [ΔΒ7]

Από τη συνολική ποσότητα του διηθήματος [ΔΒ7], μετρήθηκαν 200 mL και συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού (50 °C) [ΞΔΒ7]. Το τελικό βάρος ήταν 252,3 mg. Υποβλήθηκε σε ¹H-NMR σε CDCl₃ και CD₃OD (εικόνα 16, 17)



Εικόνα 16

Φάσμα ¹H-NMR του [ΞΔΒ7] σε CDCl₃. Σε λεπτομέρεια οι χαρακτηριστικές μονές κορυφές της 7MER στα 6,79 ppm και της RO στα 6,86 ppm που αντιστοιχούν στο πρωτόνιο της θέσης 14.



Εικόνα 17

Φάσμα ¹H-NMR του [ΞΔΒ7] σε CD₃OD. Σε λεπτομέρεια οι χαρακτηριστικές κορυφές του ροσμαρινικού οξέος (RA).

Κατόπιν πραγματοποιήθηκε αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, αντίστροφης φάσης, για την εύρεση του καλύτερου συστήματος διαλυτών έκλυσης για το διαχωρισμό των πολικών ενώσεων που περιέχονται στο διήθημα [ΔΒ7].

Δοκιμάστηκε το σύστημα μεθανόλη-νερό σε διάφορες αναλογίες:

- CH₃OH: H₂O = 50: 50 v/v
- CH₃OH: H₂O = 25: 75 v/v
- CH₃OH: H₂O = 75: 25 v/v

Το σύστημα (CH₃OH): (H₂O)= 75: 25 v/v βρέθηκε ως το καταλληλότερο.

Ύστερα ζυγίστηκαν 25,4 mg του ξηρού διηθήματος [ΞΔΒ7] και έγινε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, αντίστροφης φάσης, με σύστημα κινητής φάσης CH₃OH: H₂O = 75: 25 v/v.

Η ανάλυση της pTLC στη λάμπα UV έδειξε την παρουσία 7 ζωνών. Παραλήφθηκαν οι ζώνες Α, Δ, Ζ και Η, που στη συνέχεια εκχυλίστηκαν με EtOAc. Ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη 1D ¹H-NMR με διαλύτη CD₃OD. Προκύπτει ότι:

- στη [ΞΔΒ7]-ζώνη-Α ταυτοποιήθηκε το ροσμαρινικό οξύ (ρόδινο χρώμα μετά από ψεκασμό/θέρμανση) και με φασματοσκοπία ¹³C-NMR σε CD₃OD. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας: Chunhong 2013, Paek et al. 2013, Lu et al. 1999, Akoury 2017.

Η ποσότητα του ροσμαρινικού οξέος ήταν 4,7 mg. **Rf= 0,8.**

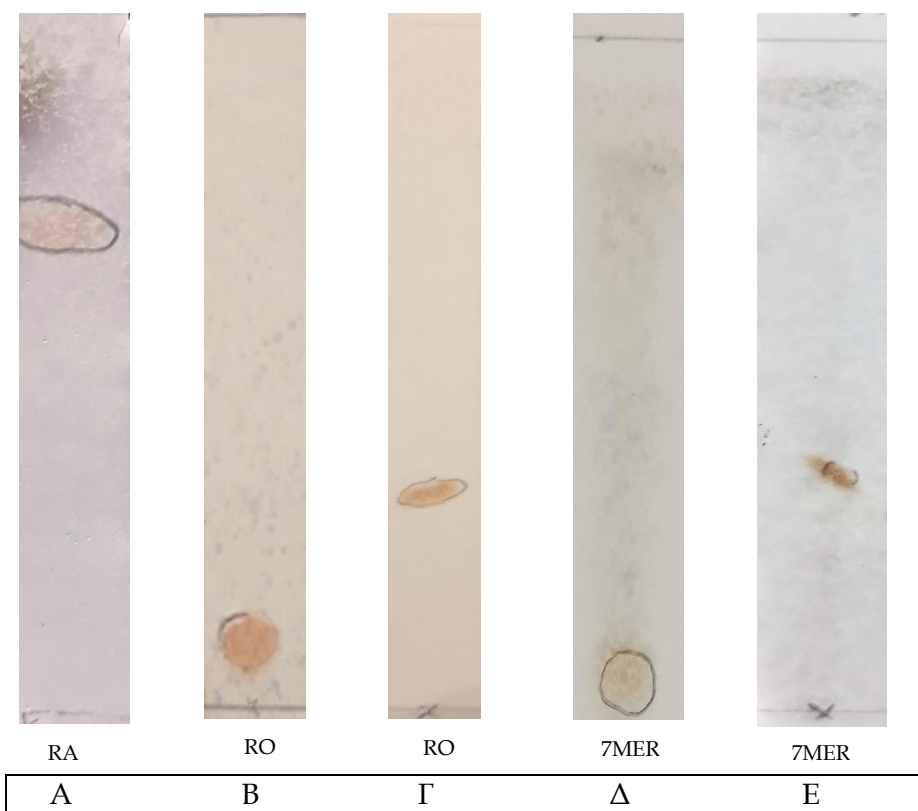
- η [ΞΔΒ7]-ζώνη-Ζ εμφάνισε πορτοκαλί χρώμα μετά τον ψεκασμό/θέρμανση. Η φασματοσκοπική μελέτη (¹H-NMR και σε CDCl₃) κατέληξε στη ταυτοποίηση της ροσμανόλης. Η ταυτοποίηση του μορίου επιβεβαιώθηκε και με φασματοσκοπία ¹³C-NMR σε CDCl₃. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας: Amaro-Luis 1997, Liu et al. 2013, Marrero et al. 2002, Takenaka et al. 1997.

Η ποσότητα της ροσμανόλης ήταν 0,8 mg. **Rf= 0,11.**

- η [ΞΔΒ7]-ζώνη-Η εμφάνισε καστανό χρώμα μετά τον ψεκασμό/θέρμανση. Η φασματοσκοπική μελέτη (1D ¹H-NMR και σε CDCl₃) έδειξε την ύπαρξη της 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλης. Η ταυτοποίηση του μορίου επιβεβαιώθηκε και με φασματοσκοπία ¹³C-NMR σε CDCl₃. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας: Liu et al. 2013, Marrero et al. 2002, Takenaka et al. 1997, Ahmed et al. 2006.

Η ποσότητα της 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλης ήταν 0,9 mg. **Rf= 0,09.**

Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν αναλυτικές TLC με τις απομονωμένες ουσίες, ροσμαρινικό οξύ (RA), 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη (7MER) και ροσμανόλη (RO) (εικόνα 18)



Εικόνα 18

- A) Αναλυτική TLC αντίστροφης φάσης με καθαρό ροσμαρινικό οξύ (RA). Σύστημα κινητής φάσης CH₃OH: H₂O= 75: 25 v/v. **Rf= 0,8**.
- B) Αναλυτική TLC αντίστροφης φάσης με καθαρή ροσμανόλη. Σύστημα κινητής φάσης CH₃OH: H₂O= 75: 25 v/v. **Rf= 0,11**.
- Γ) Αναλυτική TLC κανονικής φάσης με καθαρή ροσμανόλη. Σύστημα κινητής φάσης CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v. **Rf= 0,33**.
- Δ) Αναλυτική TLC αντίστροφης φάσης με καθαρή 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη. Σύστημα κινητής φάσης CH₃OH: H₂O= 75: 25 v/v. **Rf= 0,09**.
- E) Αναλυτική TLC κανονικής φάσης με καθαρή 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη. Σύστημα κινητής φάσης CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v. **Rf= 0,41**.

Η παρούσα διαδικασία απομόνωσης του ροσμαρινικού οξέος, της 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλης και της ροσμανόλης, είναι απλή στην εφαρμογή της, πρωτότυπη και, αναφορικά με το ροσμαρινικό οξύ, υψηλής απόδοσης.

2.1.2 Επεξεργασία του ξηρού εκχυλίσματος [ROS- 7d]

Αρχικά πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, κανονικής φάσης, για την εύρεση του καταλληλότερου συστήματος διαλυτών διαχωρισμού για τις διτερπενικές φαινόλες που περιέχονται στο ξηρό εκχύλισμα, όπως αυτό προέκυψε με την προαναφερόμενη διαδικασία.

Δοκιμάστηκαν τα παρακάτω συστήματα ανάπτυξης:

- CHx: EtOAc= 80: 20 v/v
- CHx: EtOAc= 60: 40 v/v
- CHx: CH₂Cl₂= 10: 90 v/v

- CH₂Cl₂: CH₃CH₂OH) = 95: 5 v/v
- CH₂Cl₂: CH₃OH= 95: 5 v/v
- CH₂Cl₂: CH₃OH= 98: 2 v/v
- CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v

Το σύστημα CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v επιλέχθηκε ως το καταλληλότερο για το διαχωρισμός της καρνοσόλης από τους άλλους μεταβολίτες.

Ακολούθησε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, κανονικής φάσεως, με το ξηρό εκχύλισμα δεντρολίβανου [ROS-7d] με το παραπάνω σύστημα. Για το λόγο αυτό ζυγίστηκαν 20,60 mg εκχυλίσματος [ROS-7d].

Η ανάλυση της pTLC στο UV έδειξε την παρουσία 6 ζωνών. Ακολούθησε ψεκασμός/θέρμανση (άκρου της χρωματογραφικής πλάκας). Παραλήφθηκαν οι ζώνες A, B, Γ, Δ, E και Z οι οποίες στη συνέχεια εκχυλίστηκαν με EtOAc. Ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη 1D ¹H-NMR με διαλύτη CDCl₃ και για τις 6 ζώνες:

- η TLC-[ROS-7d]-ζώνη-B είχε αχνό κίτρινο χρώμα μετά τον ψεκασμό/θέρμανση της χρωματογραφικής πλάκας. Από τη TLC-[ROS-7d]-ζώνη-B παραλήφθηκε καθαρή καρνοσόλη. Ακολούθησε φασματοσκοπία 1D ¹H-NMR και σε CD₃OD, και ¹³C-NMR σε CDCl₃ και CD₃OD. Τα φασματοσκοπικά συμπεράσματα ήταν συμβατά με αυτά της βιβλιογραφίας: Amaro-Luis 1997, Ahmed et al. 2006, Ateya et al. 2017, Aydogmus et al. 2006, Dimayuga et al. 1991, Kerkoub et al. 2018, Liu et al. 2013, Marrero et al. 2002, Matloubi et al. 2000, Pukalskas et al. 2005, Yamahara et al. 2016, Xiao et al. 2008, Cuvelier et al. 1994, Topcu et al. 2013.

Το βάρος της καρνοσόλης ήταν 1,8 mg. **Rf=0,63.**

- στη TLC-[ROS-7d]-ζώνη-Γ ταυτοποιήθηκε το μπετουλινικό οξύ το οποίο απέκτησε ένα ιώδες χρώμα μετά τον ψεκασμό/θέρμανση. Έγινε φάσμα 1D ¹H-NMR και σε CD₃OD, και ¹³C-NMR σε CDCl₃. Τα φασματοσκοπικά συμπεράσματα ήταν συμβατά με αυτά της βιβλιογραφίας: Sut et al. 2018, Yili et al. 2009, Eyoung et al. 2018, Haque et al. 2013, Ding et al. 2018, Fomogne-Fodjoa et al. 2017.

Το βάρος του μπετουλινικού οξέος ήταν 1,9 mg. **Rf = 0,52.**

- στη TLC-[ROS-7d]-ζώνη-Z απομονώθηκε ολεανολικό οξύ που εμφάνισε κυανό χρώμα μετά τον ψεκασμό/θέρμανση. Έγινε φάσμα 1D ¹H-NMR, ¹³C-NMR σε C₅D₅N και ¹³C-NMR σε CDCl₃. Τα φασματοσκοπικά συμπεράσματα ήταν συμβατά με αυτά της βιβλιογραφίας: Hung et al. 2001, Martins et al. 2013, Seebacher et al. 2003.

Το βάρος ήταν 0,5 mg. **Rf = 0,21.**

Η όλη διαδικασία απομόνωσης της καρνοσόλης επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα του πειράματος. Στα τρία αυτά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν φύλλα από διαφορετικές παρτίδες *Rosmarinus officinalis* L. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10

Απομόνωση της καρνοσόλης από τρεις διαφορετικές παρτίδες αποξηραμένων φύλλων *Rosmarinus officinalis* L.

Βάρος φύλλων <i>R. officinalis</i> L.	Βάρος εκχυλίσματος [ROS-7d]	Βάρος εκχυλίσματος [ROS-7d] για pTLC	Βάρος καρνοσόλης μετά από pTLC	%καρνοσόλης στο [ROS-7d] (mg/100 mg εκχυλίσματος)
100 g	9,85 g	20,6 mg	1,8 mg	8,73 %
100 g	10,43 g	23,6 mg	1,9 mg	8,04%
100 g	9,71 g	22,2 mg	1,7 mg	7,62%

Πείραμα σύγκρισης της καρνοσόλης στο ίδιο [ROS-7d] που μετρήθηκε με ^1H -qNMR δύο φορές με χρονική απόσταση μεταξύ των δύο μετρήσεων τα 6 χρόνια, έδειξε ότι η διαφορά τους ήταν αμελητέα (0,2 mg). Δηλαδή η ποσότητα της καρνοσόλης στο ξηρό εκχύλισμα των φύλλων δεντρολίβανου [ROS-7d] μπορεί να διατηρηθεί για αρκετά χρόνια, τουλάχιστον για πέντε, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε καλά κλεισμένο περιέκτη που προστατεύει από το φως. Συνεπώς το εκχύλισμα [ROS-7d] αποτελεί ένα άριστο υλικό για την άμεση απομόνωση της καρνοσόλης.

Η παρούσα διαδικασία απομόνωσης της καρνοσόλης είναι απλή στην εφαρμογή της, επαναλήψιμη, υψηλής απόδοσης, χαμηλού κόστους και πρωτότυπη.

Ύστερα πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία ανοικτής στήλης χαμηλής πίεσης με το δείγμα [ROS-7d]. Τα τεχνικά χαρακτηριστικά της χρωματογραφίας παρατίθενται συνοπτικά στον πίνακα 11:

Πίνακας 11

Τα τεχνικά χαρακτηριστικά της χρωματογραφίας στήλης με του δείγματος [ROS-7d].

Διαστάσεις Στήλης	51 cm ύψος στήλης, 2,5 cm διάμετρος στήλης
Στατική Φάση	Silica gel 36 g
Κινητή φάση	CH _x , EtOAc
Ποσότητα Δείγματος	1,20 g εκχυλίσματος [ROS- 7d]
Τρόπος Εισαγωγής	Ξηρή εναπόθεση 2,4 g silica (70-200μm) σε 20 mL CH _x
Όγκος Κλάσματος	40 mL τα πέντε πρώτα 15 mL από το κλάσμα 6 έως το κλάσμα 125 50 mL από το κλάσμα 126 έως το κλάσμα 133

Η έκλουση ήταν βαθμιδωτή από 100% CH_x σε CH_x: EtOAc= 50: 50% v/v. Παραλήφθηκαν 133 κλάσματα, όπως φαίνονται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12

Κλάσματα της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-7d].

Διαλύτες	Αναλογία v/v	Όγκος (mL)	Κλάσματα	mL κλασμάτων
CHx	100	200 mL	1-5	40
CHx: EtOAc	95: 5	300 mL	6-25	15
CHx: EtOAc	90: 10	300mL	26-45	15
CHx: EtOAc	85: 15	300 mL	46-65	15
CHx: EtOAc	80: 20	300 mL	66-85	15
CHx: EtOAc	75: 25	300 mL	86-105	15
CHx: EtOAc	50: 50	300 mL	106-125	15
CHx: EtOAc	50: 50	400 mL	126-133	50

Όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν με αναλυτική TLC (σύστημα ανάπτυξης CH₂Cl₂: MeOH= 97: 3 v/v) σε λάμπα UV, με ακόλουθο ψεκασμό/θέρμανση. Τα κλάσματα συνενώθηκαν όπως φαίνονται στον πίνακα 13.

Πίνακας 13

Συνενώσεις κλασμάτων της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-7d].

Κλάσματα	Βάρος (mg)	Επόμενη Κατεργασία
A: 20-25	24,1	-
B: 26-32	16,6	-
Γ: 33-42	34,9	-
Δ: 43-40	21,2	-
E: 51-60	145,8	¹ H-NMR (CDCl ₃) και pTLC
Z: 61-77	335,4	-
H: 78-87	55,7	-
Θ: 88-100	74,3	-
I: 101-108	37,9	-
K: 109-113	44,5	pTLC
Λ: 114-125	74,3	-
M: 126-133	44,4	-

Στο **LC-[ROS-7d]-κλάσμα-E** έγινε φάσμα $^1\text{H-NMR}$ με διαλύτη CDCl_3 . Η επεξεργασία του φάσματος, αναφορικά με τα διτερπένια αβιετανίου, έδειξε ότι το εν λόγω κλάσμα είναι πλούσιο σε καρνοσόλη και περιέχει και ίχνη ροσμανόλης (CS: RO = 1: 0,03).

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε pTLC κανονικής φάσεως με 21,2 mg του **LC-[ROS-7d]-κλάσματος-E**, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση το σύστημα CH_2Cl_2 : CH_3OH = 97: 3 v/v.

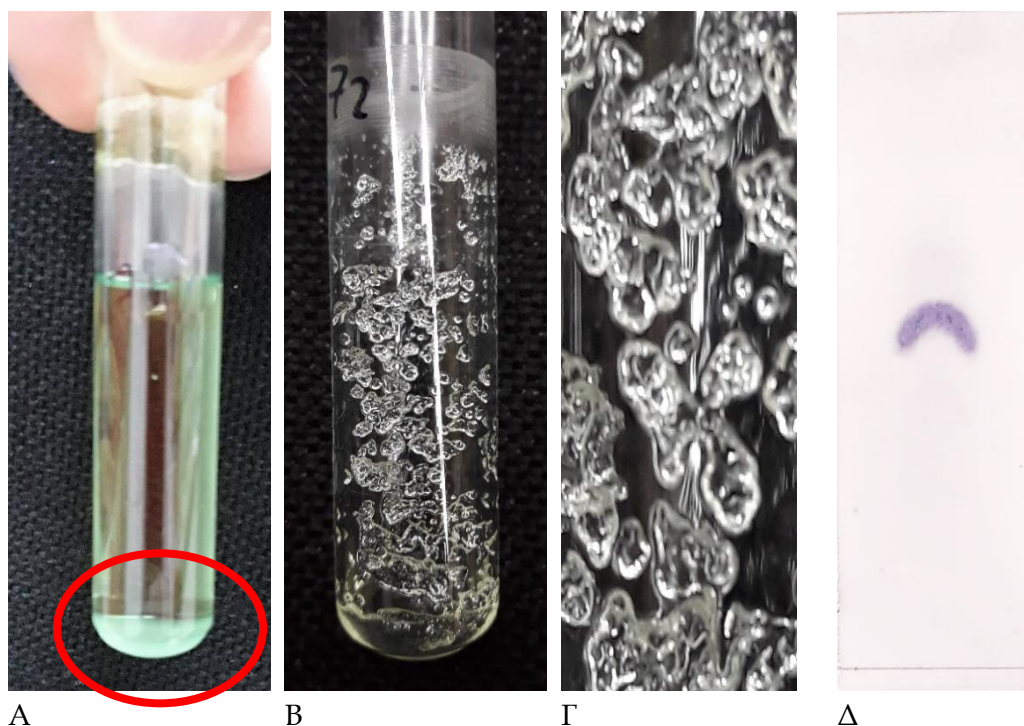
Η ανάλυση της pTLC στο UV έδειξε την παρουσία 3 ζωνών. Παραλήφθηκαν οι ζώνες A, B, Γ και ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη ($^1\text{H-NMR}$ με διαλύτη CDCl_3):

- στη **LC-[ROS-7d]-κλάσμα-E-ζώνη-A** εμφανίσθηκε καθαρή καρνοσόλη με έντονο κίτρινο χρώμα μετά τον ψεκασμό/θέρμανση.

Το βάρος της καρνοσόλης ήταν 3,7 mg. **Rf= 0,63**.

Μετά από 48 ώρες από τη στιγμή που παραλήφθηκαν τα αρχικά κλάσματα της υγρής χρωματογραφίας, πριν τις συνενώσεις, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κρυστάλλων στα κλάσματα από 68 έως και 73. Μετά από σχετική κατεργασία (παραλαβή και έκπλυση, των κρυστάλλων με CH_2 : EtOAc = 80: 20 v/v) (εικόνα 19) ακολούθησε επαναδιάλυση σε μεθανόλη και παραλαβή μετά από συμπύκνωση υπό κενό. Το υπόλειμμα ζυγίστηκε (11,1 mg) και αναλύθηκε φασματοσκοπικά (1D $^1\text{H-NMR}$ σε CD_3OD και σε CDCl_3). Η σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων με αυτά της βιβλιογραφίας: Sut et al. 2018, Yili et al. 2009, Eyoung et al. 2018, Haque et al. 2013, Ding et al. 2018, Fomogne-Fodjoa et al. 2017, οδήγησαν στην ταυτοποίηση του μπετουλινικού οξέος.

Η παρούσα διαδικασία απομόνωσης του μπετουλινικού οξέος είναι επαναλήψιμη, εξαιρετικά απλή στην εφαρμογή της, υψηλής απόδοσης και πρωτότυπη.



Εικόνα 19

- A) Κρύσταλλοι μπετουλινικού οξέος που σχηματίστηκαν στα κλάσματα 68-73 μετά από 48 ώρες
 B) Κρύσταλλοι μπετουλινικού οξέος μετά πλύση με 10 mL μίγματος CH_x: EtOAc= 80: 20 v/v
 Γ) Λεπτομέρεια των κρυστάλλων
 Δ) Αναλυτική TLC κανονικής φάσεως με μπετουλινικό οξύ (κινητή φάση: CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v). Ιώδης κηλίδα μετά από ψεκασμό/θέρμανση. **R_f = 0,52**.

Κατόπιν ακολούθησε pTLC κανονικής φάσεως με 22,3 mg του **LC-[ROS-7d]-κλάσματος-Κ**, (κινητή φάση: πετρελαϊκός αιθέρας: οξικός αιθυλεστέρας: ακετόνη= 82: 18: 1 v/v).

Η παρατήρηση στο UV έδειξε την παρουσία 3 ζωνών. Παραλήφθηκαν οι ζώνες Α, Β, Γ, Δ. Ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη ¹H-NMR με διαλύτη CDCl₃:

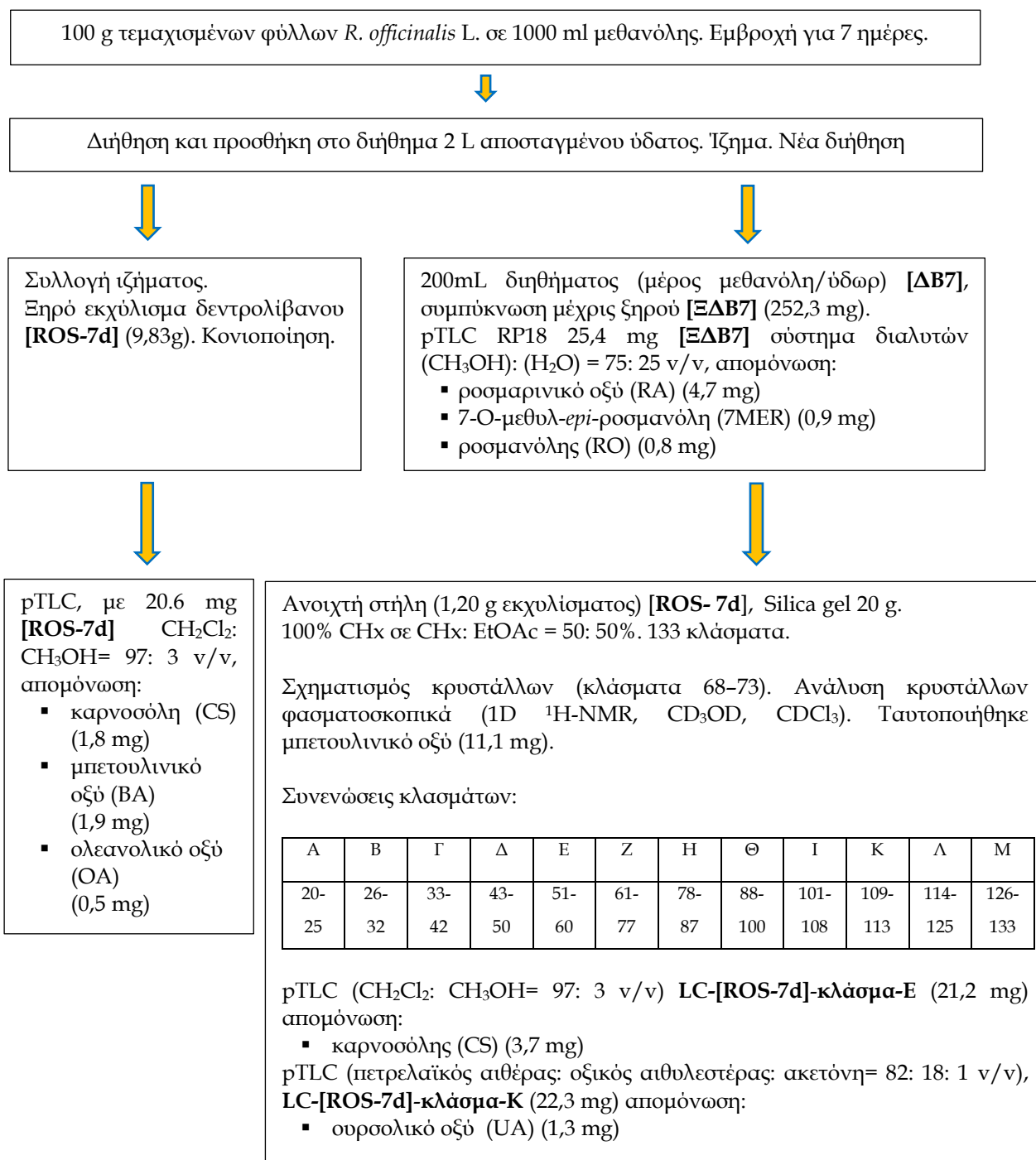
- στη **LC-[ROS-7d]-κλάσμα-Κ-ζώνη-Γ** υπήρχε ουρσολικό οξύ (αχνό κυανό χρώμα μετά από ψεκασμό/θέρμανση). Ακολούθησε φασματοσκοπία 1D ¹H-NMR και ¹³C-NMR σε C₅D₅N και ¹³C-NMR σε CDCl₃. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ήταν σύμφωνα με αυτά της βιβλιογραφίας: Hung et al. 2001, Martins et al. 2013, Seebacher et al. 2003.

Το βάρος ήταν 1,3 mg. **R_f= 0,18**.

Στον πίνακα 14 υπάρχει το συνοπτικό διάγραμμα δημιουργίας και επεξεργασίας του **[ROS-7d]**.

Πίνακας 14

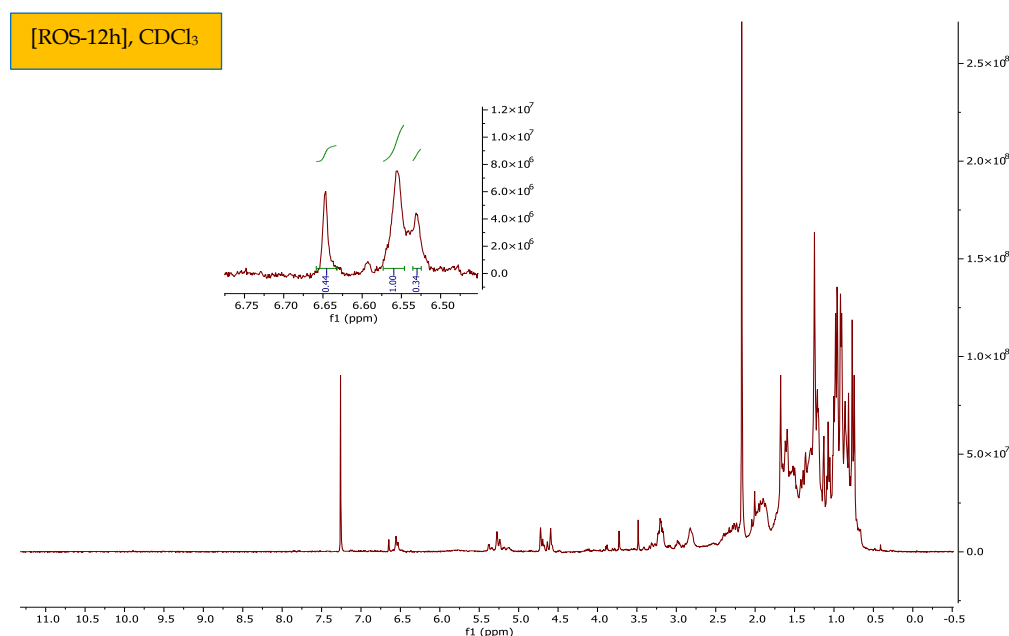
Συνοπτικό διάγραμμα παρασκευής και επεξεργασίας του [ROS-7d] και του [ΞΔΒ7].



2.2 Παρασκευή ξηρού εκχυλίσματος [ROS-12h] και διηθήματος [ΔB12] με εμβροχή 12 ωρών

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ακριβώς η ίδια με τη προηγούμενη για τη παρασκευή του [ROS-7d], με διαφορά ότι δρόγη εκχυλίσθηκε με μεθανόλη για 12 ώρες. Από 100 g αποξηραμένων φύλλων *R. officinalis* L. προέκυψαν 10,11 g ξηρού εκχυλίσματος [ROS-12h]. Μετά την δεύτερη διήθηση είχαμε το διήθημα [ΔB12].

Η ανάλυση του φάσματος 1D ¹H-NMR σε CDCl₃, έδειξε ότι όσον αφορά τα διτερπένια αβιετανίου το [ROS-12h] είναι πλούσιο σε καρνοσικό οξύ, περιέχει 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ και καρνοσόλη (CA: CS: 12MCA= 1: 0,44: 0,34), ενώ δεν υπάρχει ροσμανόλη και 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη. Τα φάσματα συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας: Amaro-Luis 1997, Ahmed et al. 2006, Ateya et al. 2017, Aydogmus et al. 2006, Dimayuga et al. 1991, Djarmati et al. 1993, Etsassala et al. 2019, Fishedick et al. 2013, Kerkoub et al. 2018, Liu et al. 2013, Macías-Alonso et al. 2019, Marrero et al. 2002, Matloubi et al. 2000, Nishizaki et al. 2019, Pukalskas et al. 2005, Rodriguez-Meizoso et al. 2007, Yamahara et al. 2016, Xiao et al. 2008, Cuvelier et al. 1994, Topcu et al. 2013, Gonzalez et al. 1989, Shun-Hua et al. 1993 (εικόνα 20).



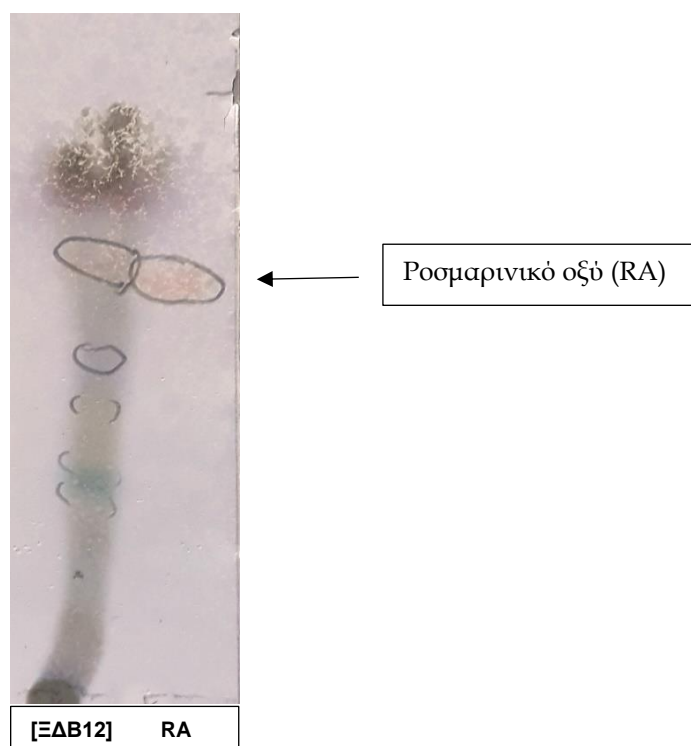
Εικόνα 20

Φάσμα 1D ¹H-NMR σε CDCl₃ του ξηρού εκχυλίσματος δεντρολίβανου [ROS-12h] που περιέχει κυρίως CA, μικρότερες ποσότητες 12MCA και CS, ενώ δεν περιέχει RO και 7MER. Σε λεπτομέρεια οι ολοκληρώσεις του H-14 των CA, CS και 12MCA.

2.2.1 Επεξεργασία του διηθήματος [ΔB12]

Από τη συνολική ποσότητα του διηθήματος [ΔB12], 200 mL συμπυκνώθηκαν υπό κενό (50 °C) έως ξηρού [ΞΔB12] και λήφθηκαν 223,4 mg.

Πραγματοποιήθηκε αναλυτική TLC RP18 του [ΞΔB12] (εικόνα 21) και του ροσμαρινικού οξέος (RA) (που απομονώθηκε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1.1)



Εικόνα 21

Συγχρωματογράφιση [ΞΔΒ12] με ροσμαρινικό οξύ (TLC RP18, κινητή φάση: CH₃OH: H₂O= 75: 25 v/v).

Το αποτέλεσμα της συγχρωματογράφισης κατέστησε σαφή την ύπαρξη ροσμαρινικού οξέος στο [ΞΔΒ12].

2.2.2 Επεξεργασία του ξηρού εκχυλίσματος [ROS- 12h]

Πραγματοποιήθηκε pTLC σε 25,0 mg του [ROS-12h] (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v).

Η ανάλυση της pTLC στο UV κατέδειξε την παρουσία 4 ζωνών. Παραλήφθηκαν οι ζώνες Α, Β, Γ, Δ. Ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη (1D ¹H-NMR σε CD₃OD και CDCl₃):

- Από τη TLC-[ROS-12h]-ζώνη-Α παραλήφθηκε καθαρή καρνοσόλη (αχνοκίτρινο χρώμα μετά απο ψεκασμό/θέρμανση).

Το βάρος της καρνοσόλης ήταν 0,9 mg.

- Από τη TLC-[ROS-12h]-ζώνη-Β ταυτοποιήθηκε το 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ (αχνοκίτρινο χρώμα μετά τον ψεκασμό/θέρμανση). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συμφωνούσαν πλήρως με αυτά της βιβλιογραφίας: Aydogmus et al. 2006, Djarmati et al. 1993, Fishedick et al. 2013, Kerkoub et al. 2018, Pukalskas et al. 2005, Torcu et al. 2013.

Το βάρος ήταν 0,6 mg. **Rf= 0,24.**

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία ανοικτής στήλης με το δείγμα [ROS-12h] (πίνακας 15).

Πίνακας 15

Χαρακτηριστικά της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-12h].

Διαστάσεις Στήλης	3 cm διάμετρος, 51 cm ύψος στήλης
Στατική Φάση	Silica gel 20 g
Κινητή φάση	CH _x , EtOAc
Ποσότητα Δείγματος	1,29 g εκχυλίσματος [ROS- 12h]
Τρόπος Εισαγωγής	Ξηρή εναπόθεση (2,4 g silica (70-200μm) σε 20 mL CH _x)
Όγκος Κλάσματος	40 mL τα πέντε πρώτα 15 mL από το κλάσμα 6 έως το κλάσμα 134

Η έκλουση ήταν βαθμιδωτή, από 100% CH_x σε CH_x: EtOAc= 50: 50%. Παραλήφθηκαν 134 κλάσματα όπως φαίνονται στον πίνακα 16.

Πίνακας 16

Κλάσματα της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-12h].

Διαλύτες	Αναλογία v/v	Όγκος (mL)	Κλάσματα	mL κλασμάτων
CH _x	100	200	1-5	40
CH _x : EtOAc	95: 5	300	6-27	15
CH _x : EtOAc	90: 10	300	28-48	15
CH _x : EtOAc	85: 15	300	49-69	15
CH _x : EtOAc	80: 20	300	70-90	15
CH _x : EtOAc	75: 25	300	91-111	15
CH _x : EtOAc	50: 50	300	112-134	15

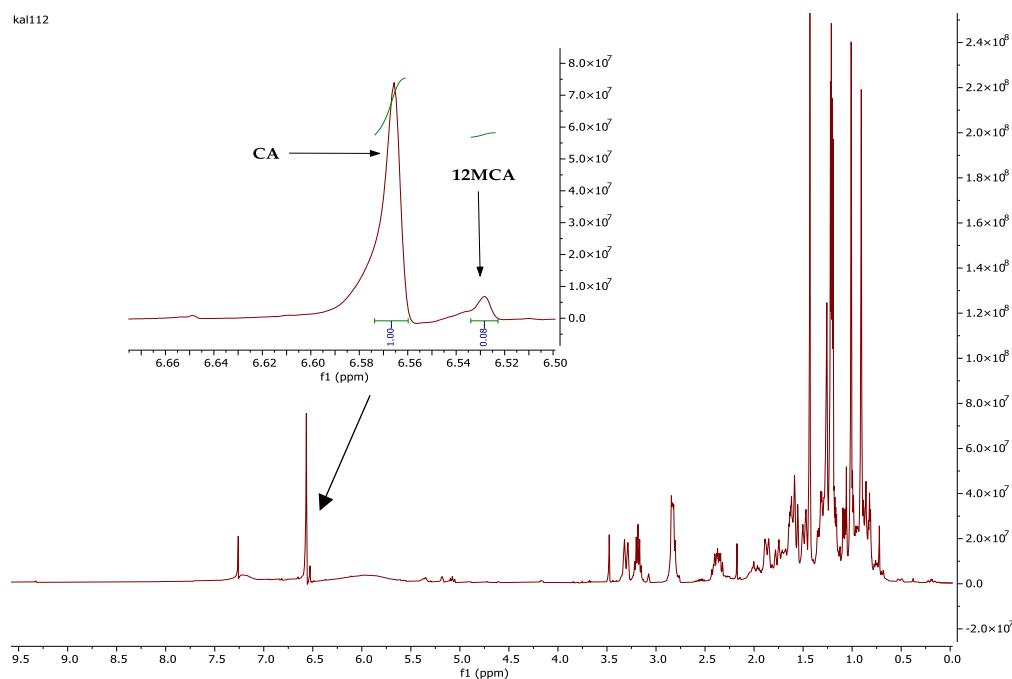
Όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν με αναλυτικές TLC (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v) στο UV, και στο ορατό μετά από ψεκασμό/θέρμανση. Μετά από τις συνενώσεις παραλήφθηκαν τα δείγματα όπως φαίνονται στον πίνακα 17.

Πίνακας 17

Συνενώσεις κλασμάτων της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-12h].

Κλάσματα	Βάρος (mg)	Επόμενη Κατεργασία
A: 36-40	47,6	$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) pTLC
B: 41-47	80,8	-
Γ: 48-58	17,0	$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)
Δ: 59-65	11,7	-
E: 66-71	23,6	-
Z: 72-90	54,3	-
H: 91-111	71,9	-
Θ: 116-126	62,2	-

Το LC-[ROS-12h]-κλάσμα-A υποβλήθηκε σε φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) όπου φάνηκε πως στο δείγμα περιέχεται κυρίως το CA και ίχνη 12MCA (CA: 12MCA= 1: 0,08) (εικόνα 22) (Aydogmus et al. 2006, Djarmati et al. 1993, Fishedick et al. 2013, Kerkoub et al. 2018, Pukalskas et al. 2005, Topcu et al. 2013, Rodriguez-Meizoso et al. 2007, Xiao et al. 2008, Cuvelier et al. 1994).



Εικόνα 22

Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ LC-[ROS-12h]-κλάσματος-A (συνένωση 36-40). Περιέχεται κυρίως το CA και ίχνη 12MCA (CA: 12MCA= 1: 0,08).

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε pTLC με 20,1 mg **LC-[ROS-12h]-κλάσμα-A**, (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 97: 3 v/v). Η ανάλυση της pTLC στο UV έδειξε την παρουσία 4 ζωνών (A-Δ). Ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη $^1\text{H-NMR}$ με διαλύτη CDCl_3 .

- στην **LC-[ROS-12h]-κλάσμα-A-ζώνη-A** παραλήφθηκε καρνοσικό οξύ, αλλά λιγότερο καθαρό από το αρχικό δείγμα, δεδομένου ότι υπήρχε και καρνοσόλη σε αναλογία CA: CS= 1: 0,45.

Συμπερασματικά, η **LC-[ROS-12h]-κλάσμα-A-ζώνη-A** περιείχε CA αλλά λιγότερο καθαρό σε σχέση με το **LC-[ROS-12h]-κλάσμα-A**. Συνεπάγεται ότι με τη συγκεκριμένη χρωματογραφική διαδικασία (pTLC) και σύστημα διαλυτών, μειώνεται το ποσοστό καθαρότητας του CA λόγω της πιθανής μετατροπής μέρους του καρνοσικού οξέος σε καρνοσόλη. Για το λόγω αυτό το **LC-[ROS-12h]-κλάσμα-A** χρησιμοποιήθηκε ως έχει, ως CA καθαρότητας ~90% (**LC-[ROS-12h]-κλάσμα-A**, CA: 12MCA= 1: 0,08).

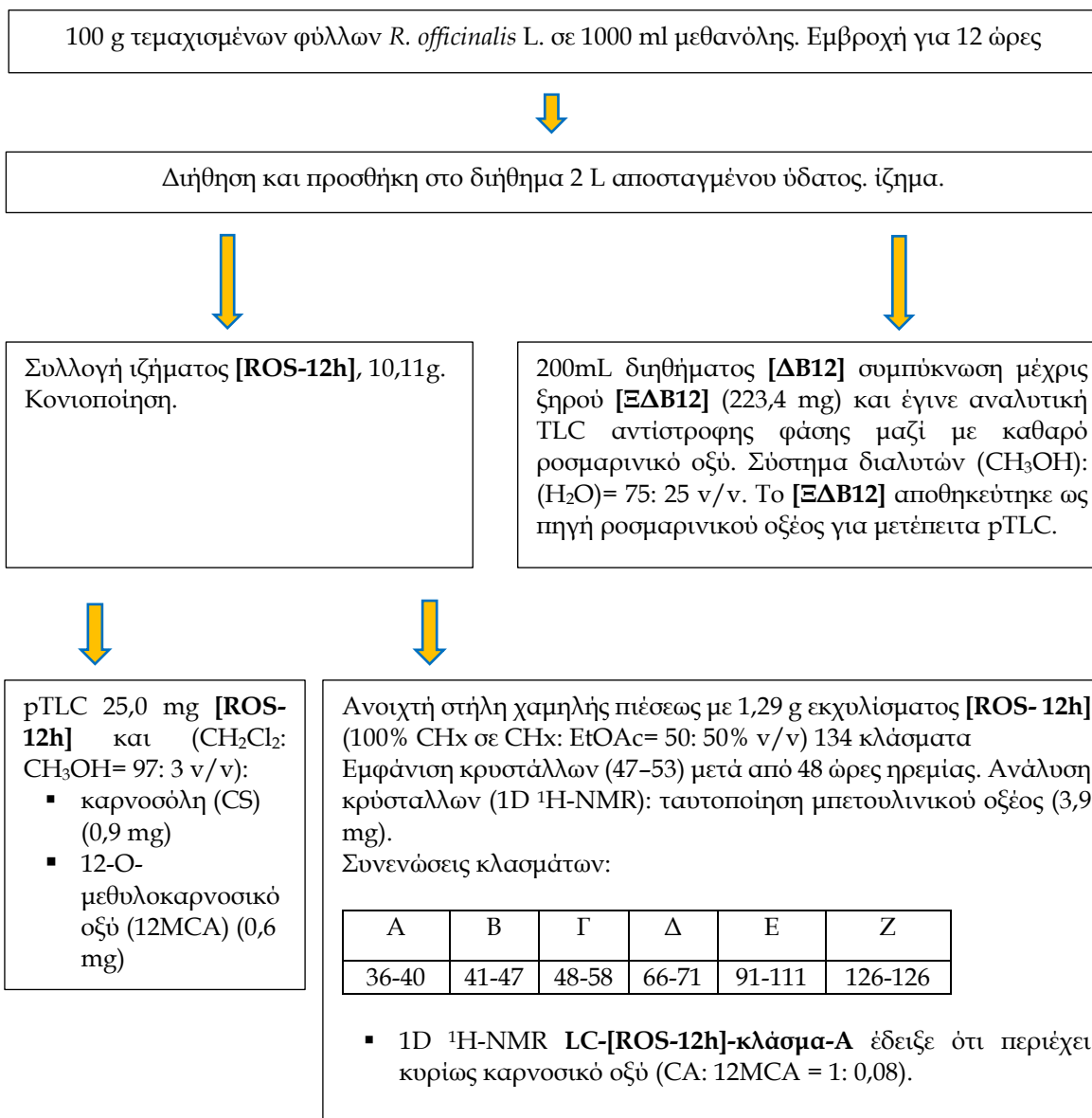
Στο **LC-[ROS-12h]-κλάσμα-Γ** ακολούθησε λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) όπου φάνηκε η ύπαρξη καρνοσικού οξέος, καρνοσόλης, και 12-O-μεθυλοκαρνοσικού οξέος σε αναλογία 1: 0,78: 1,03 αντίστοιχα.

Μετά από 48 ώρες ηρεμίας των αρχικών κλασμάτων της υγρής χρωματογραφίας, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κρυστάλλων στα κλάσματα 47-53. Οι κρύσταλλοι παραλήφθηκαν, εκπλύθηκαν (CH_2 : EtOAc = 80: 20 v/v), διαλύθηκαν σε μεθανόλη και συμπυκνώθηκαν υπό κενό μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα ήταν 3,9 mg. Η ανάλυση με 1D $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπία (CDCl_3 και CD_3OD) έδειξε ότι η ουσία ταυτίζεται με τη δομή του μπετουλινικού οξέος, όπως ακριβώς είχε παρατηρηθεί στη χρωματογραφική στήλη και κατεργασία του **[ROS-7d]**.

Στον πίνακα 18 υπάρχει το συνοπτικό διάγραμμα παρασκευής και επεξεργασίας του **[ROS-12h]**.

Πίνακας 18

Συνοπτικό διάγραμμα παρασκευής και επεξεργασίας του [ROS-12h] και του [ΞΔΒ12].



2.3 Παρασκευή ξηρού εκχυλίσματος [ROS-12h.7]

Το εκχύλισμα [ROS-12h] που διατηρήθηκε για 7 μήνες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προστατευμένο από το φως ονομάστηκε [ROS-12h.7]

2.3.1 Επεξεργασία ξηρού εκχυλίσματος [ROS-12h.7]

Πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία ανοικτής στήλης χαμηλής πίεσης, όπως φαίνεται παρακάτω:

Πίνακας 19

Χαρακτηριστικά της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-12h.7].

Διαστάσεις Στήλης	3 cm διάμετρος, 51 cm ύψος στήλης
Στατική Φάση	20,0 g Silica gel 0,035-0,070 mm
Ποσότητα Δείγματος	1,21 g εκχυλίσματος
Τρόπος Εισαγωγής	Ξηρή εναπόθεση (2,4 g silica σε 20mL CH _x)
Διαλύτες έκλουσης	CH _x , EtOAc, MeOH
Όγκος Κλάσματος	40 mL (1-5), 15 mL (6 -61).

Η έκλουση ήταν βαθμιδωτή, από 100% CH_x σε CH_x: EtOAc= 50: 50% και 100% EtOAc και τέλος MeOH: EtOAc= 50: 50% v/v. Παραλήφθηκαν 61 κλάσματα (πίνακας 20).

Πίνακας 20

Κλάσματα της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-12h.7].

Διαλύτες	Αναλογία v/v	Όγκος (mL)	Κλάσματα	mL κλασμάτων
CH _x	100	200	1-5	40
CH _x : EtOAc	75 : 25	200	6-19	15
CH _x : EtOAc	50 : 50	200	20-35	15
CH _x : EtOAc	25 : 75	100	36-43	15
EtOAc	100	100	44-51	15
MeOH: EtOAc	50 : 50	100	52-61	15

Όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν με TLC (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v) στο υπεριώδες και στο ορατό μετά από θέρμανση/ψεκασμό. Προέκυψαν οι παρακάτω συνενώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα 21.

Πίνακας 21

Συνενώσεις κλασμάτων της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-12h.7].

Κλάσματα	Βάρος (mg)	Επόμενη Κατεργασία
A: 9	50,3	pTLC
B: 10	102,7	-
Γ: 11-12	96,3	-
Δ: 13-18	175,8	pTLC
E: 19-24	167,0	pTLC
Z: 25-36	189,4	-
H: 37-48	112,7	-
Θ: 49-61	69,7	-

Έγινε έλεγχος TLC (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v) όλων των συνενωμένων κλασμάτων, A- Θ.

Ακολούθησε pTLC (22,2 mg) του LC-[ROS-12h.7]-κλάσματος-A, (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v). Η ανάλυση στο UV έδειξε την παρουσία 4 ζωνών που παραλήφθηκαν (A, B, Γ και Δ). Ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη ¹H-NMR (CDCl₃) και προέκυψε ότι:

- στη LC-[ROS-12h.7]-κλάσμα-A-ζώνη-Γ ταυτοποιήθηκε καθαρό 12MCA, (αχνοκίτρινο χρώμα μετά τον ψεκασμό/θέρμανση).

Το βάρος 12MCA ήταν 1,3 mg. Rf= 0,24.

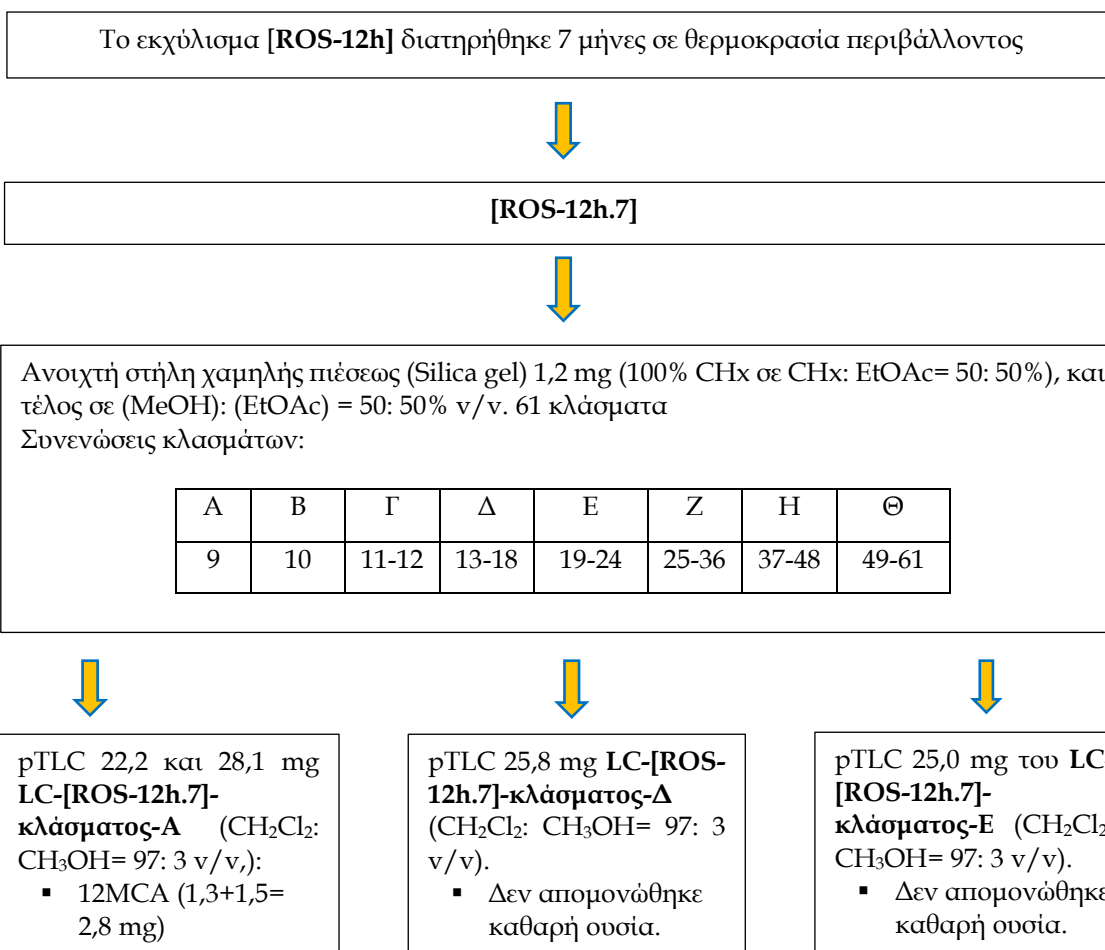
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε pTLC (25,8 mg) του LC-[ROS-12h.7]-κλάσματος-Δ, (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v). Η ανάλυση στο UV έδειξε την παρουσία τεσσάρων ζωνών: A, B, Γ και Δ που παραλήφθηκαν και μελετήθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H-NMR (CDCl₃): Δεν προέκυψε κάποια καθαρή ουσία.

Ακολούθως έγινε pTLC (25,0 mg) του LC-[ROS-12h.7]-κλάσματος-E, (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v) και παραλήφθηκαν 3 ζώνες (A, B, Γ). Ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη ¹H-NMR (CDCl₃): Δεν προέκυψε κάποια καθαρή ουσία.

Η παρασκευή και η επεξεργασία του [ROS-12h.7], περιγράφεται συνοπτικά στον πίνακα 22.

Πίνακας 22

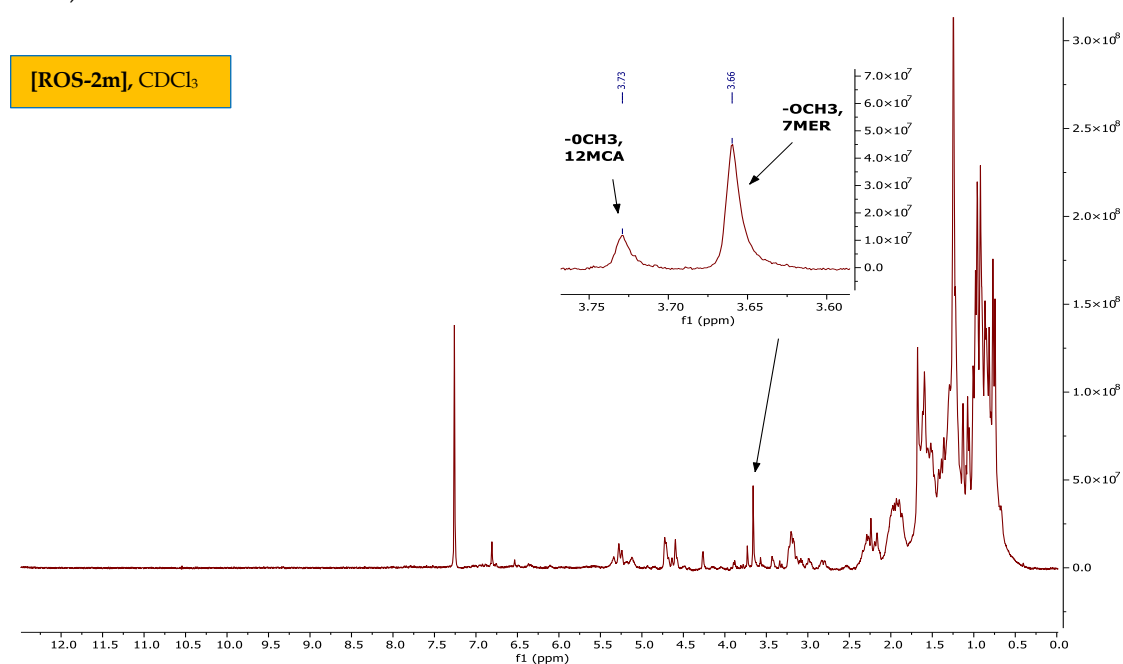
Συνοπτικό διάγραμμα παρασκευής και επεξεργασίας του [ROS-12h.7].

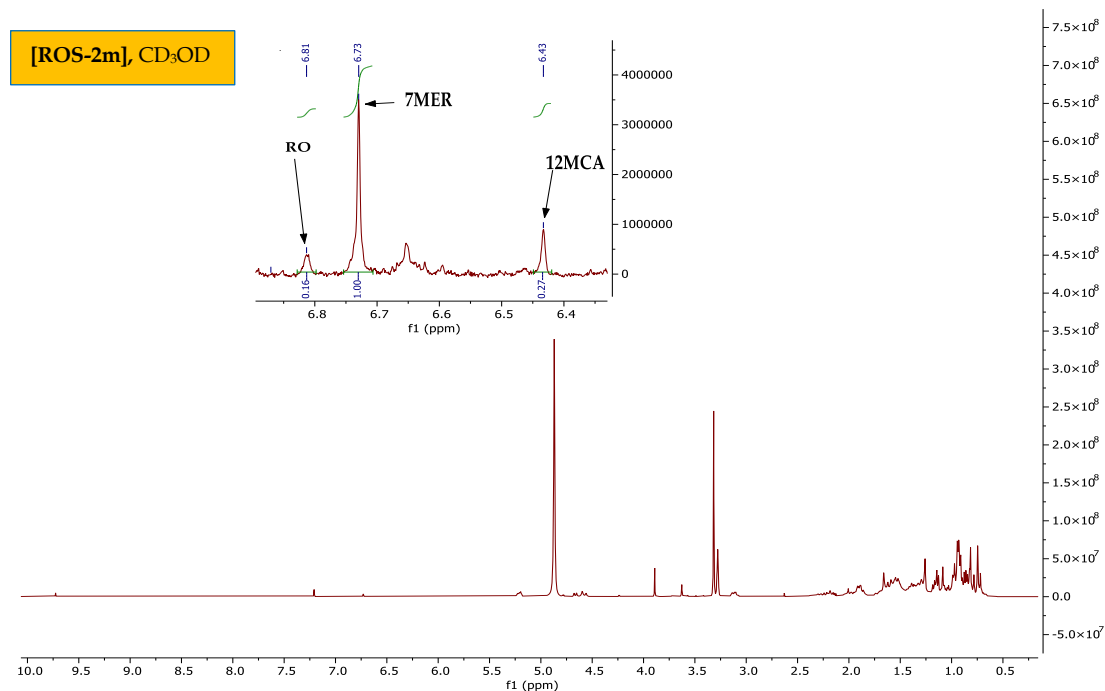


2.4 Παρασκευή ξηρού εκχυλίσματος [ROS-2m] με εμβροχή 2 μηνών

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ακριβώς η ίδια με αυτή της παρασκευής ξηρού εκχυλίσματος δεντρολίβανου πλούσιου σε καρνοσόλη [ROS-7d] και περιγράφηκε αναλυτικά στη παράγραφο 2.1, με τη μόνη διαφορά ότι η δρόγη εκχυλίσθηκε με την μεθανόλη για 2 μήνες (60 μέρες). Από τα 100 g αποξηραμένων φύλλων προέκυψαν 9,10 g ξηρού εκχυλίσματος [ROS-2m].

Η ανάλυση του φάσματος 1D $^1\text{H-NMR}$, σε CDCl_3 και CD_3OD έδειξε ότι το ξηρό εκχύλισμα δεντρολίβανου που προκύπτει με αυτή τη διαδικασία, είναι πλούσιο σε 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη, παρουσιάζει μικρότερες ποσότητες σε 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ και ροσμανόλη (7MER: 12MCA: RO= 1: 0,27: 0,16), ενώ δεν υπάρχει καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη (εικόνα 23) (Amaro-Luis 1997, Ahmed et al. 2006, Ateya et al. 2017, Aydogmus et al. 2006, Dimayuga et al. 1991, Djarmati et al. 1993, Etsassala et al. 2019, Fishedick et al. 2013, Kerkoub et al. 2018, Liu et al. 2013, Macías-Alonso et al. 2019, Marrero et al. 2002, Matloubi et al. 2000, Nishizaki et al. 2019, Pukalskas et al. 2005, Rodriguez-Meizoso et al. 2007, Yamahara et al. 2016, Xiao et al. 2008, Cuvelier et al. 1994, Topcu et al. 2013, Gonzalez et al. 1989, Shun-Hua et al. 1993).





Εικόνα 23

Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$, (CDCl_3 και CD_3OD) ξηρού εκχυλίσματος **[ROS-2m]** που περιέχει κυρίως 7MER και μικρότερες ποσότητες 12MCA και RO. Δεν υπάρχουν CA, CS. Σε μεγέθυνση φαίνεται η απλή κορυφή του υδρογόνου της θέσης 14 των προαναφερόμενων ουσιών.

2.4.1 Επεξεργασία του ξηρού εκχυλίσματος **[ROS-2m]**

Αρχικά πραγματοποιήθηκε pTLC κανονικής φάσης (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 97: 3 v/v), με 25,5 mg του **[ROS-2m]**. Η ανάλυση στο UV έδειξε την παρουσία 4 ζωνών (Α-Δ).

Ακολούθησε φασματοσκοπική μελέτη $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD και CDCl_3):

- στη ζώνη Β ταυτοποιήθηκε η 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη, (καστανό χρώμα μετά τον ψεκασμό/θέρμανση). Το βάρος ήταν 1,4 mg. **Rf=0,41**.

Ύστερα πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία ανοικτής στήλης με το δείγμα **[ROS-2m]** όπως περιγράφεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα 23:

Πίνακας 23

Χαρακτηριστικά της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος **[ROS-2m]**.

Διαστάσεις Στήλης	3 cm διάμετρος, 51 cm ύψος στήλης
Στατική Φάση	20,0 g Silica gel 0,035-0,070 mm
Ποσότητα Δείγματος	1,2 g εκχυλίσματος [ROS-2m]
Τρόπος Εισαγωγής	Ξηρή εναπόθεση (2,4 g silica σε 20mL κυκλοεξάνιο)
Διαλύτες έκλουσης	CH_x , EtOAc.
Όγκος Κλάσματος	40 mL 1 -5, 20 mL 6 - 21, 15 mL 22 -126

Η έκλουση ξεκίνησε με 100% CH_x, ύστερα με μίγμα CH_x-EtOAc διάφορων αναλογιών μέχρι CH_x: EtOAc= 50: 50 v/v. Παραλήφθηκαν 126 κλάσματα (πίνακας 24).

Πίνακας 24

Κλάσματα της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-2m].

Διαλύτες	Αναλογία	Όγκος (mL)	Κλάσματα	mL κλασμάτων
CH _x	100	200	1-5	40
CH _x : EtOAc	95: 5	300	6-21	20
CH _x : EtOAc	90: 10	300	22-42	15
CH _x : EtOAc	85: 15	300	43-63	15
CH _x : EtOAc	80: 20	300	64-84	15
CH _x : EtOAc	75: 25	300	85-105	15
CH _x : EtOAc	50: 50	300	106-126	15

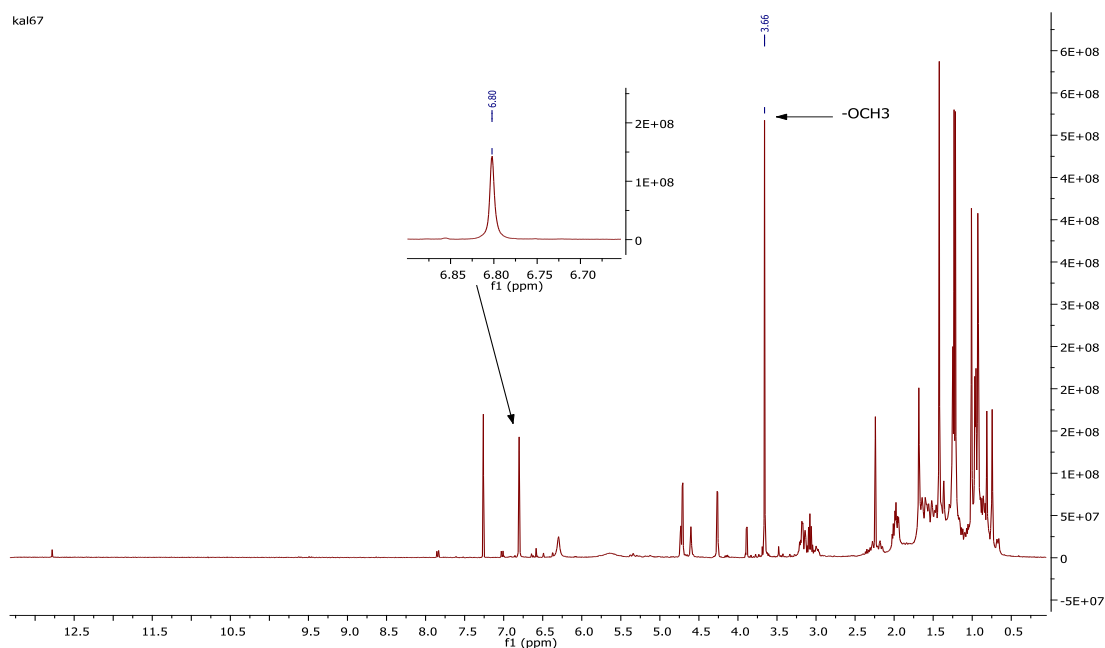
Όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν με αναλυτική TLC (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v), στο UV και στο ορατό μετά από ψεκασμό/θέρμανση και ακολούθησαν οι συνενώσεις τους όπως φαίνονται στον πίνακα 25.

Πίνακας 25

Συνενώσεις κλασμάτων της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-2m].

Κλάσματα	Βάρος (mg)	Επόμενη Κατεργασία
A. 47-53	78,5	¹ H-NMR (CDCl ₃), Prep. TLC
B. 54-61	71,3	¹ H-NMR (CDCl ₃), Prep. TLC
Γ. 62-73	134,6	-
Δ. 74-88	129,3	-
E. 89-126	248,2	¹ H-NMR (CDCl ₃), Prep. TLC

Στο φάσμα 1D ¹H-NMR του LC-[ROS-2m]-κλάσματος-A φάνηκε ότι, όσον αφορά τα διτερπένια αβιτανίου, υπάρχει 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη χωρίς την παρουσία του 12-O-μεθυλοκαρνοσικού οξέος (εικόνα 24).



Εικόνα 24

Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$, (CDCl_3) **LC-[ROS-2m]-κλάσματος-A**. Σε λεπτομέρεια η απλή κορυφή στα 6,80 ppm του H-14 της 7MER.

Ακολούθησε pTLC (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 97: 3 v/v), σε 15,5 mg του **LC-[ROS-2m]-κλάσματος-A**. Η ανάλυση στο UV έδειξε την παρουσία 2 ζωνών (A, B) που παραλήφθηκαν και μελετήθηκαν φασματοσκοπικά 1D $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):

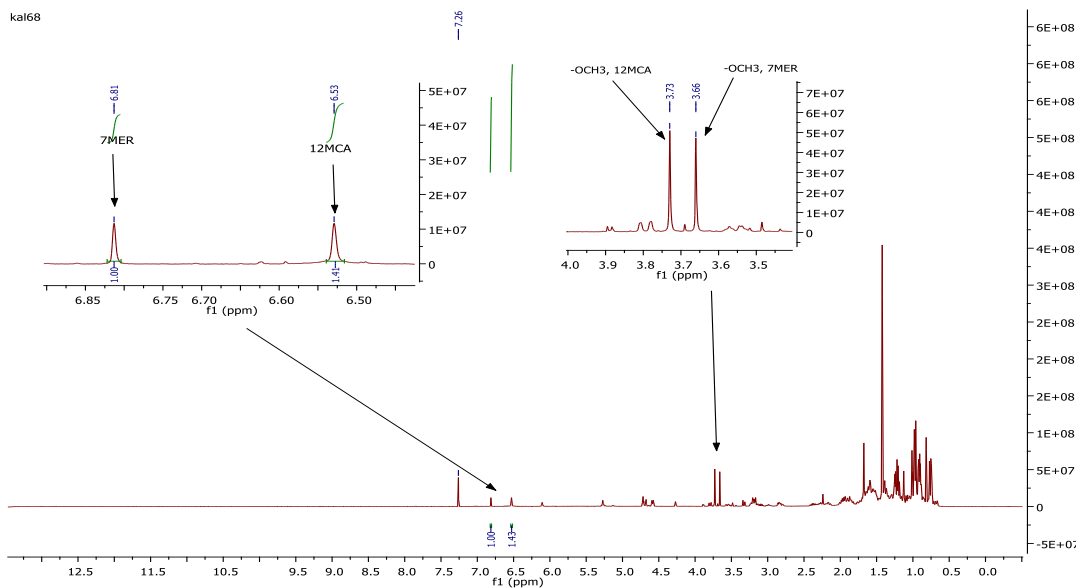
- στη **LC-[ROS-2m]-κλάσμα-A-ζώνη-A** υπάρχει καθαρή 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνη, με αχνό κίτρινο χρώμα μετά τον ψεκασμό/θέρμανση. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ήταν ανάλογα με αυτά της βιβλιογραφίας: Gohari et al. 2011, Saraswathy et al. 2012.

Το βάρος της 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνης ήταν 0,4 mg.

- στη **LC-[ROS-2m]-κλάσμα-A-ζώνη-B** ταυτοποιήθηκε καθαρή 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη η οποία εμφανίζει καστανό χρώμα μετά από ψεκασμό/θέρμανση. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας: Liu et al. 2013, Marrero et al. 2002, Takenaka et al. 1997, Ahmed et al. 2006.

Το βάρος της 7MER ήταν 3,9 mg.

Η φασματοσκοπική ανάλυση 1D $^1\text{H-NMR}$ του **LC-[ROS-2m]-κλάσματος-B** έδειξε ότι, όσον αφορά τα διτερπένια αβιετανίου, υπάρχει 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη και 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ σε αναλογία 1: 1,43 αντίστοιχα (εικόνα 25).



Εικόνα 25

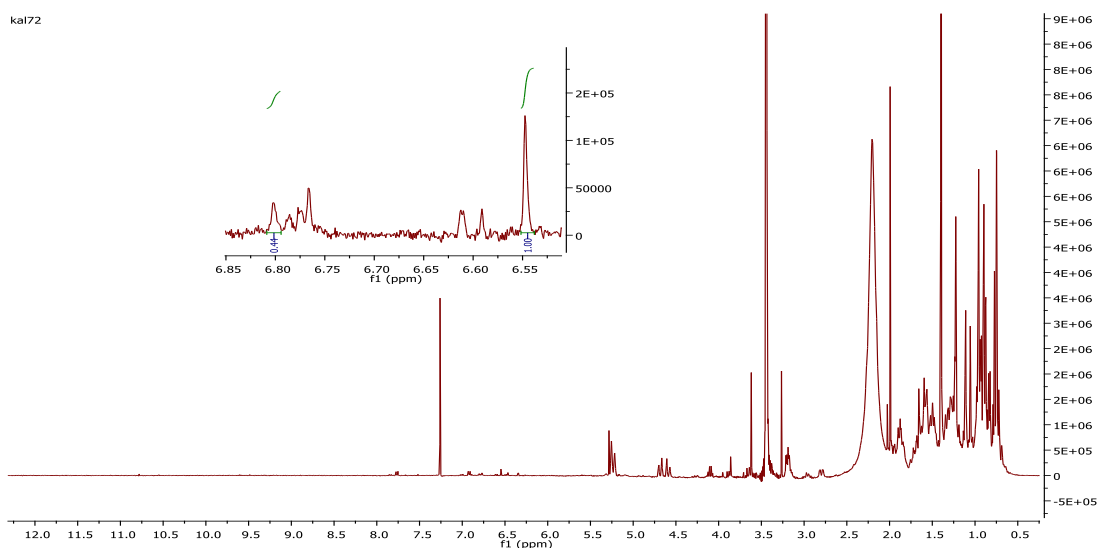
Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$, (CDCl_3) **LC-[ROS-2m]-κλάσματος-B**. Σε λεπτομέρεια, αριστερά οι απλές κορυφές των H-14 του 12MCA και της 7MER, δεξιά οι απλές κορυφές των $-\text{OCH}_3$ του 12MCA και της 7MER που ολοκληρώνουν για 3H.

Ακολούθησε pTLC (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 97: 3 v/v), σε 14,9 mg του **LC-[ROS-2m]-κλάσματος-B**. Η ανάλυση στο UV έδειξε την εμφάνιση 6 ζωνών Α, Β, Γ, Δ, Ε και Ζ, που μετά από φασματοσκοπική μελέτη 1D $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) φάνηκε ότι:

- στη **LC-[ROS-2m]-κλάσμα-B-ζώνη-A** ταυτοποιήθηκε καθαρή 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη.

Το βάρος της ήταν 4,9 mg.

Η φασματοσκοπική ανάλυση 1D $^1\text{H-NMR}$ του **LC-[ROS-2m]-κλάσματος-E** έδειξε ότι, όσον αφορά τα διτερπένια αβιετανίου, περιέχει 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη και 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ σε αναλογία 0,44: 1,0 αντίστοιχα (εικόνα 26).



Εικόνα 26

Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$, (CDCl_3) **LC-[ROS-2m]-κλάσματος-E**.

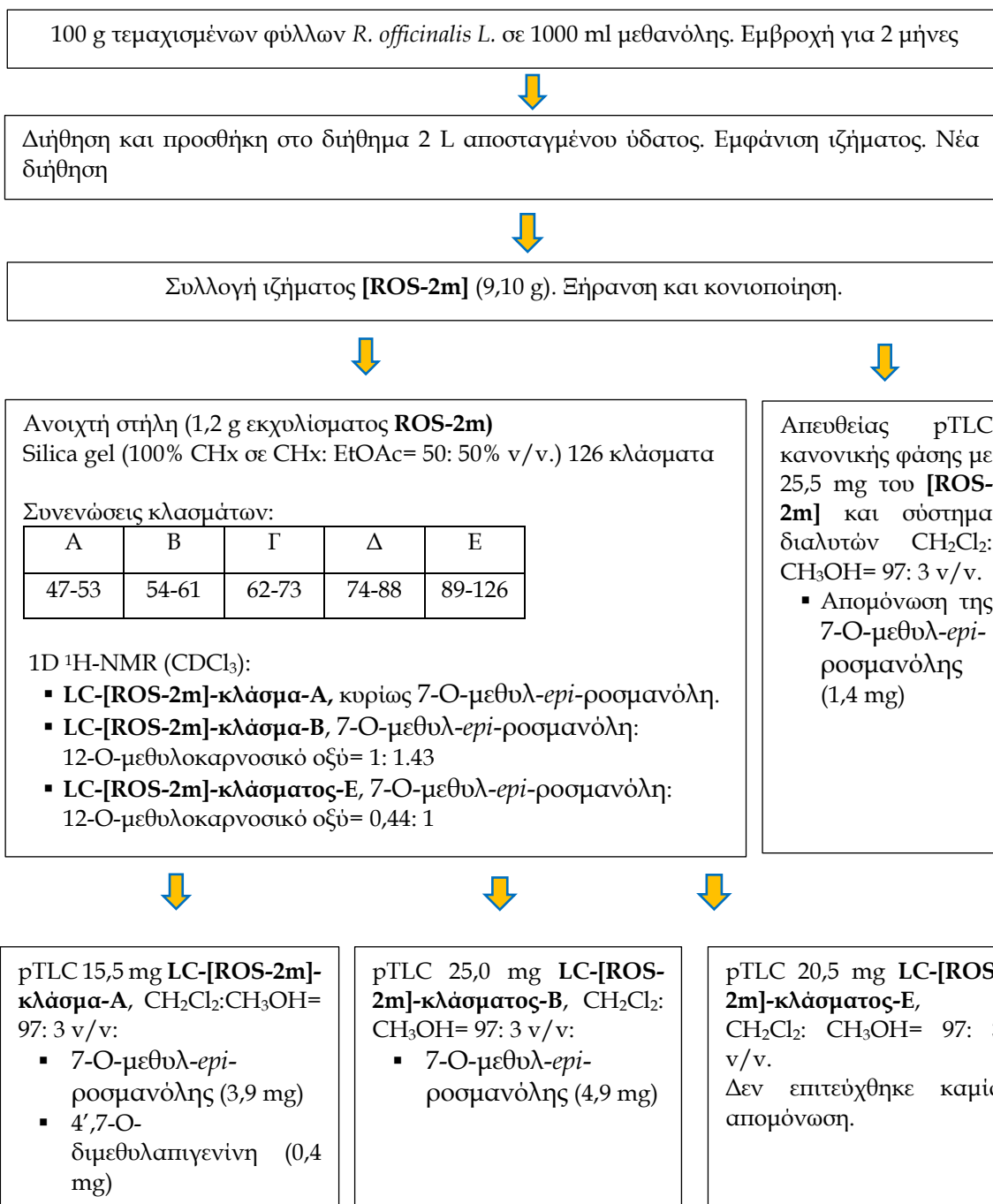
Έγινε pTLC, (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v) σε 20,5 mg LC-[ROS-2m]-κλάσματος-Ε. Η ανάλυση στο UV έδειξε την παρουσία 4 ζωνών (Α-Δ). Η φασματοσκοπική τους μελέτη με ¹H-NMR (CDCl₃) έδειξε ότι δεν ταυτοποιήθηκε καθαρή ουσία παρά μόνο μίγματα ουσιών.

Η διαδικασία απομόνωσης της 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλης, όπως περιγράφηκε σε αυτή την ενότητα, είναι απλή στην εφαρμογή της, υψηλής απόδοσης και πρωτότυπη. Το σημαντικότερο στοιχείο της διαδικασίας αυτής φαίνεται να είναι ο χρόνος εκχύλισης.

Η παρασκευή και η επεξεργασία του [ROS-2m] περιγράφεται συνοπτικά στον πίνακα 26.

Πίνακας 26

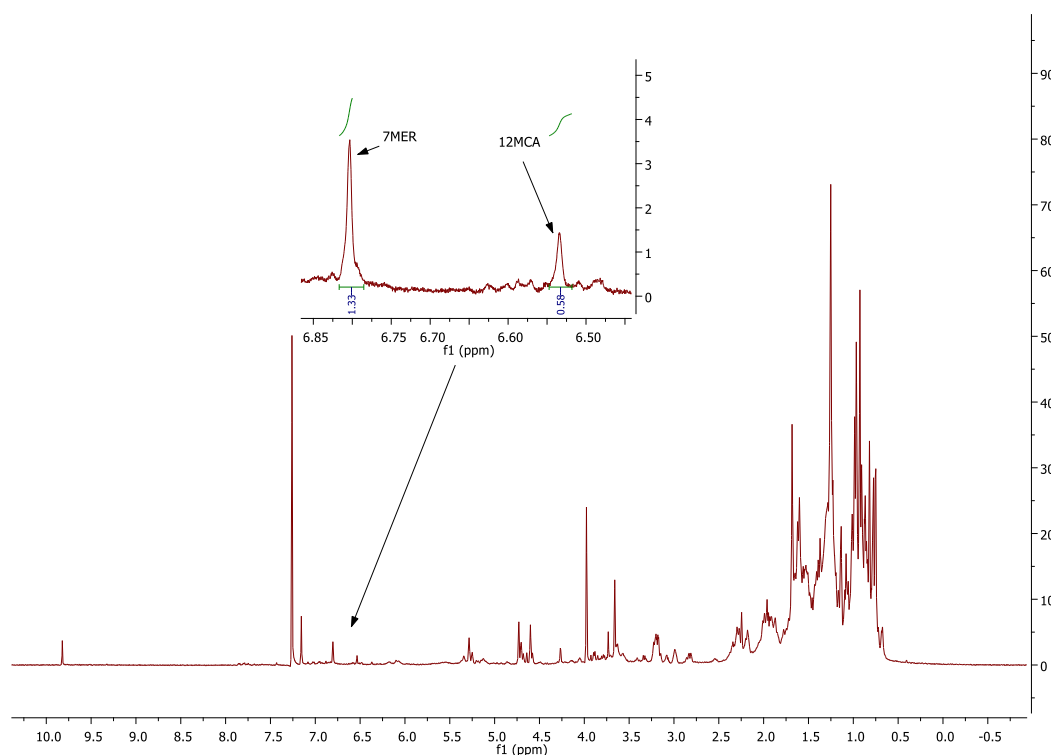
Συνοπτικό διάγραμμα παρασκευής και επεξεργασίας του [ROS-2m]



2.5 Παρασκευή ξηρού εκχυλίσματος [ROS-1y] με εμβροχή 1 έτους

Πραγματοποιήθηκε πείραμα με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παραγωγή του ξηρού εκχυλίσματος [ROS-2m], με διάρκεια εκχύλισης ένα έτος (12 μήνες). Το εκχύλισμα που προέκυψε, [ROS-1y], παρουσίαζε ποιοτικά το ίδιο προφίλ στα υπό εξέταση διτερπένια αβιετανίου με αυτό του [ROS-2m], όπως προκύπτει από την ανάλυση του φάσματος 1D $^1\text{H-NMR}$ του [ROS-1y] σε CDCl_3 . Δηλαδή, περιέχει κυρίως 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη και μικρές ποσότητες 12-O-μεθυλοκαρνοσικού οξέος (7MER: 12MCA= 1,0: 0,38), ενώ δεν περιέχει καθόλου καρνοσικού οξύ, καρνοσόλη και ροσμανόλη (εικόνα 27).

Ωστόσο, ποσοτικά υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ του [ROS-2m] και του [ROS-1y], με το πρώτο εκχύλισμα να είναι σαφώς πιο πλούσιο από το δεύτερο στις συγκεκριμένες ουσίες. Έτσι, π.χ. σε 16,8 mg [ROS-1y] υπάρχουν 0,3 (1,6%) mg 7MER και 0,1 (0,6%) mg 12MCA, ενώ αντίστοιχα στο [ROS-2m] ήταν 3,3% 7MER και 0,7% 12MCA. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η 7MER και το 12MCA είναι αρκετά σταθερές ουσίες στη μεθανόλη σε σχέση με τα άλλα διτερπένια αβιετανίου, CA, CS και RO που μελετώνται στην παρούσα διδακτορική διατριβή.



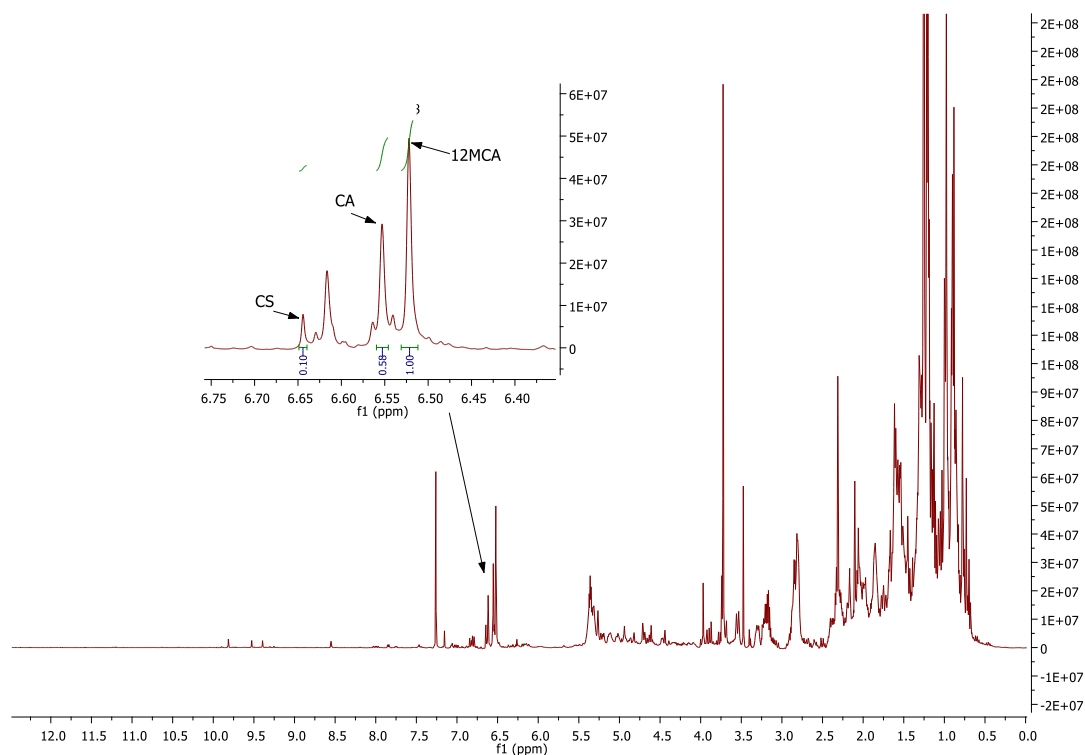
Εικόνα 27

Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) ξηρού εκχυλίσματος [ROS-1y].

3. Επεξεργασία της *Salvia microphylla* Kunth

Χρησιμοποιήθηκαν τα αποξηραμένα φύλλα *Salvia microphylla*. Ποσότητα 1 g τεμαχισμένης δρόγης εκχυλίστηκε με 30 mL MeOH για 30 min στο υδατόλουτρο υπερήχων. Ύστερα έγινε διήθηση και το διήθημα εξατμίστηκε υπό κενό μέχρι ξηρού και παραλήφθηκαν συνολικά 129 mg εκχυλίσματος. Σε 10 mg του εκχυλίσματος έγινε φασματοσκοπική μελέτη $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) που έδειξε ότι, όσον αφορά τα διτερπένια

αβιετανίου, ανιχνεύονται: CS, CA και 12MCA σε αναλογία 0,10: 0,58: 1,0 αντίστοιχα, ενώ απουσίαζαν η 7MER και η RO (εικόνα 28).



Εικόνα 28

Φάσμα 1D ^1H -NMR, σε CDCl_3 , μεθανολικού εκχυλίσματος της *Salvia microphylla*. Σε μεγέθυνση η περιοχή 6,50-6,90 ppm, όπου φαίνονται οι μονές κορυφές του H-14 των 12MCA, CA και CS.

Στη συνέχεια 15,0 g αποξηραμένων φύλλων τεμαχίστηκαν και εκχυλίστηκαν με 200 mL MeOH για 2h σε υδατόλουτρο υπερήχων. Το εκχύλισμα διηθήθηκε και το διήθημα εξατμίστηκε υπό κενό μέχρι ξηρού δίνοντας 2,1751 g [SMe] βαθυπράσινου ξηρού εκχυλίσματος ιδιάζουσας, ευχάριστης οσμής.

Ακολούθησε κατεργασία του παραπάνω εκχυλίσματος με μίγμα νερού: μεθανόλης 2:1, συνολικού όγκου 150 mL, για 5 min σε υδατόλουτρο υπερήχων. Κατόπιν έγινε διήθηση με ηθμό χάρτου. Το υπόλειμμα υποβλήθηκε σε περαιτέρω κατεργασία με (25 mL) ακετόνη και συμπυκνώθηκε δίνοντας 1,9071 g ξηρού εκχυλίσματος [SM].

Πραγματοποιήθηκε pTLC με το ξηρό εκχύλισμα [SM] (24,1 mg), (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 97: 3 v/v). Η ανάλυση στο UV έδειξε την παρουσία 3 ζωνών (A-Γ) που παραλήφθηκαν και υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπική μελέτη 1D ^1H -NMR (CDCl_3):

- στην TLC-[SM]-ζώνη-B ταυτοποιήθηκε 12MCA (εμφάνιση αχνοκίτρινου χρώματος μετά από ψεκασμό/θέρμανση).

Το βάρος του 12MCA ήταν 1,1 mg

Ακολούθησε χρωματογραφία ανοικτής στήλης με το εκχύλισμα [SM]. Τα χαρακτηριστικά της παρατίθενται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα 27:

Πίνακας 27

Χαρακτηριστικά της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [SM].

Διαστάσεις Στήλης	3 cm διάμετρος, 13 cm ύψος στατικής φάσης
Στατική Φάση	20,0 g Silica gel 0,035-0,070 mm
Ποσότητα Δείγματος	1,23 g εκχυλίσματος [SM]
Τρόπος Εισαγωγής	Ξηρή εναπόθεση (2,4 g silica σε 20mL κυκλοεξάνιο)
Διαλύτες έκλουσης	CH _x , EtOAc
Όγκος Κλάσματος	40 mL (1-5), 15 mL (6-69)

Η έκλουση ήταν βαθμιδωτή, από 100% CH_x σε CH_x: EtOAc= 85: 15% v/v. Παραλήφθηκαν 69 κλάσμα (πίνακας 28).

Πίνακας 28

Κλάσματα της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [SM].

Διαλύτες	Αναλογία	Όγκος (mL)	Κλάσματα	mL κλασμάτων
CH _x	100	200	1-5	40
CH _x : EtOAc	95: 5	300	6-27	15
CH _x : EtOAc	90: 10	300	28-48	15
CH _x : EtOAc	85: 15	300	49-69	15

Όλα τα κλάσματα ελέγχθηκαν με αναλυτική TLC στο UV και στο ορατό μετά από ψεκασμό/θέρμανση (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v), και ακολούθησαν συνενώσεις όπως φαίνονται στον πίνακα 29.

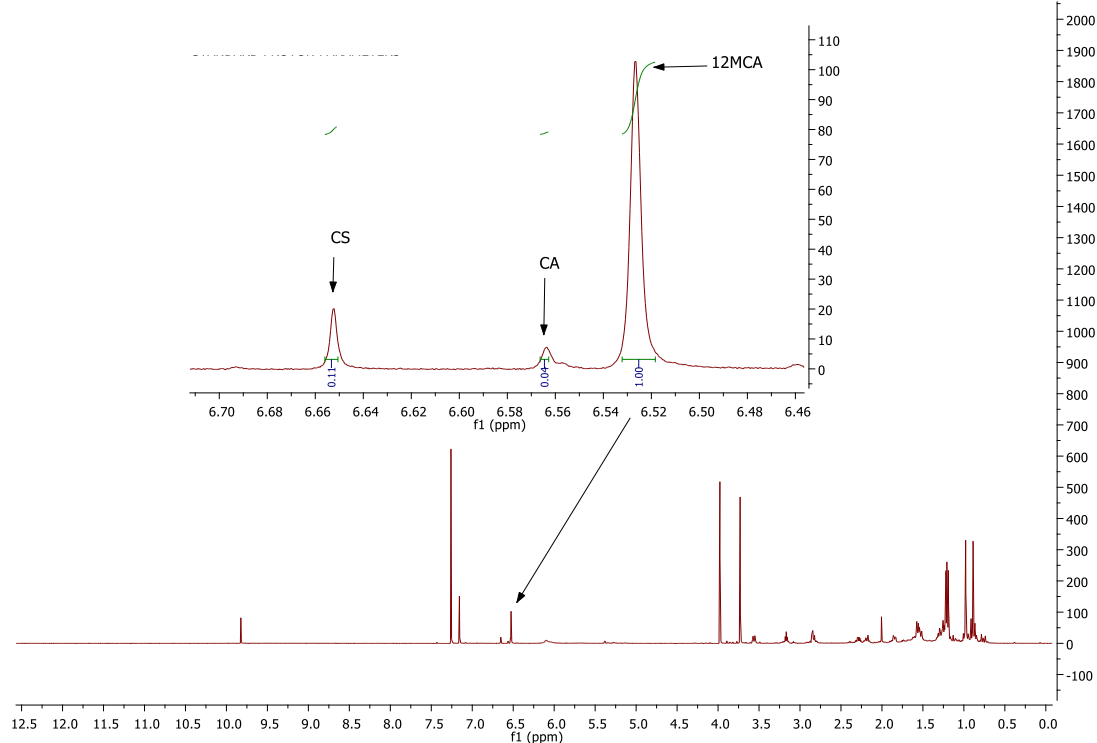
Πίνακας 29

Συνενώσεις κλασμάτων της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [SM].

Κλάσματα	Βάρος (mg)	Επόμενη Κατεργασία
A. 18-34	32,4	-
B. 35-45	77,2	¹ H- NMR (CDCl ₃)
Γ. 46-50	35,1	¹ H- NMR (CDCl ₃)
Δ. 51-61	115,5	-
E. 62-69	51,5	-

Στο **LC-[SM]-κλάσμα-B** έγινε ανάλυση με $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) που κατέδειξε την εμφάνιση μίγματος 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικού οξέος με καρνοσικό οξύ.

Στο **LC-[SM]-κλάσμα-Γ** έγινε ανάλυση με $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) στην οποία εμφανίστηκε (~85%) 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ με ελάχιστη πρόσμιξη από καρνοσόλη και καρνοσικό οξύ σε αναλογία 1,0: 0,11: 0,04 αντίστοιχα (εικόνα 29)



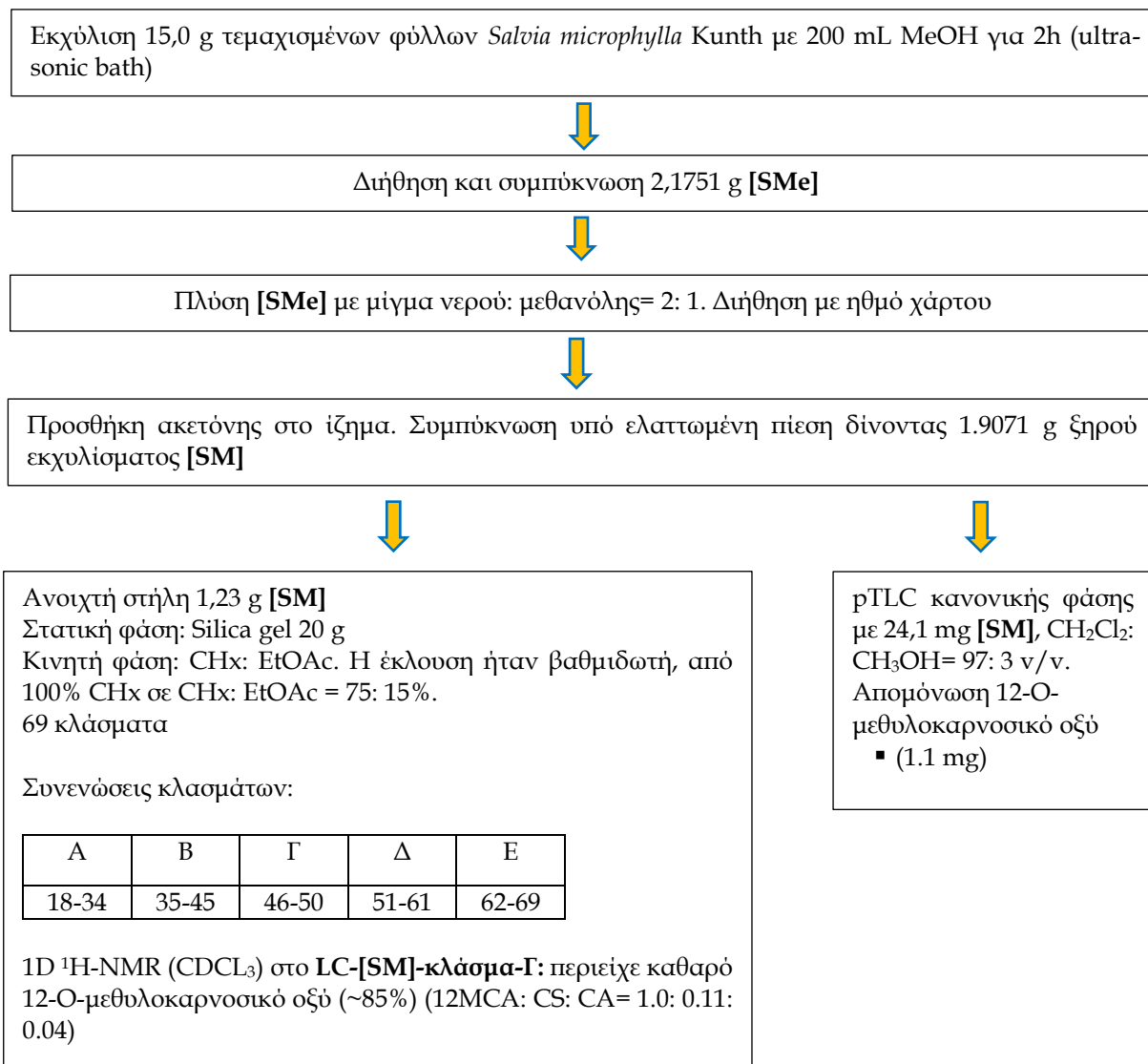
Εικόνα 29

Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ του **LC-[SM]-κλάσμα-Γ** που περιέχει κυρίως 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ, μικρή ποσότητα καρνοσόλης και ίχνη καρνοσικού οξέος.

Το **κλάσμα Γ** (35,1 mg) χρησιμοποιήθηκε ως 12MCA. Στον πίνακα 30 περιγράφεται συνοπτικά η παρασκευή και επεξεργασία του εκχυλίσματος **[SM]**.

Πίνακας 30

Συνοπτικό διάγραμμα παρασκευής και επεξεργασίας του εκχυλίσματος [SM]

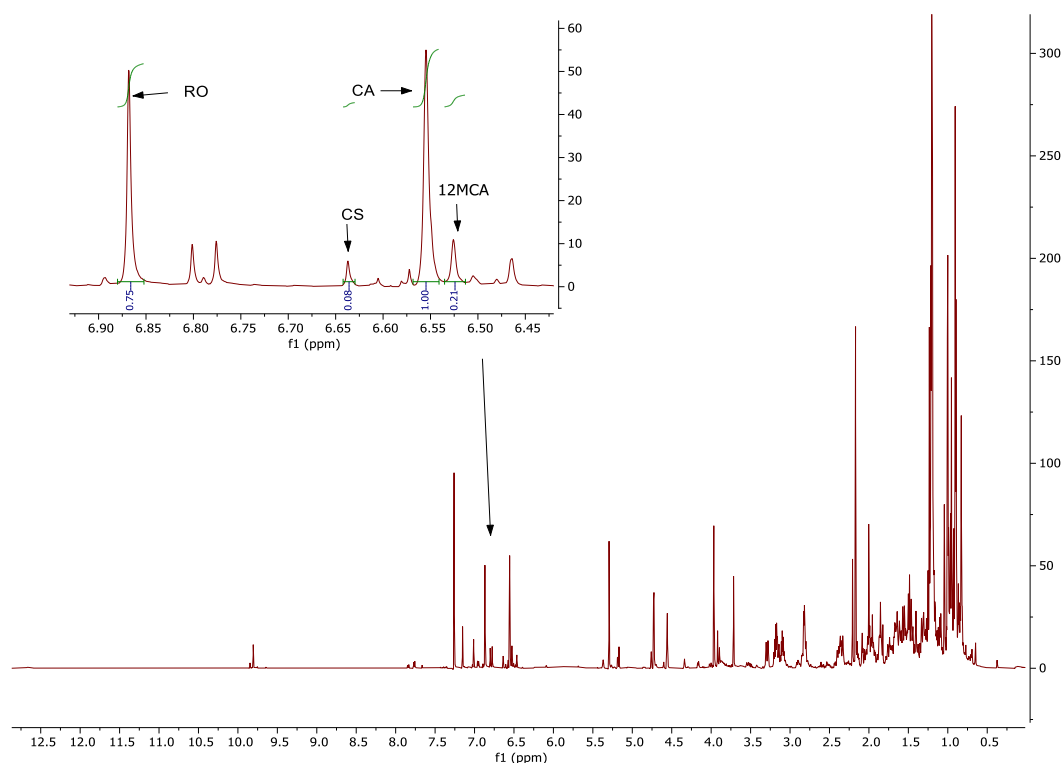


4. Επεξεργασία της *Salvia fruticosa* Mill.

1,5 g τεμαχισμένων αποξηραμένων φύλλων *Salvia fruticosa* τοποθετήθηκαν σε ειδικό ανοξείδωτο σκεύος για αφέψηση (χωρητικότητας 300 mL) με 150 mL ύδατος. Τοποθετήθηκε το σκεύος με το περιεχόμενο του σε θερμαινόμενη εστία και ακολούθησε βρασμός (αφέψηση), για 10min. Το αφέψημα διηθήθηκε με ηθμό χάρτου και το διήθημα εκχυλίστηκε σε διαχωριστική χοάνη με προσθήκη 75 mL CH₂Cl₂. Παραλήφθηκε η οργανική φάση σε σφαιρική φιάλη και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το ξηρό εκχύλισμα της *Salvia fruticosa* που προέκυψε [SF-d] (20,7 mg) αποτελεί το υλικό της περαιτέρω εργασίας.

Το [SF-d] αναλύθηκε με 1D ¹H-qNMR (CDCl₃) με εσωτερικό πρότυπο (εικόνα 30). Το αποτέλεσμα έδειξε ότι στο [SF-d] περιέχονται 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ, καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη και ροσμανόλη σε αναλογία 0,21: 1,0: 0,08: 0,75. Παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα [SF-d] είναι το πιο πλούσιο σε ροσμανόλη από όλα τα ξηρά εκχυλίσματα που έχουν προαναφερθεί στο συγκεκριμένο κεφάλαιο. Συνεπώς αποτελεί μια σημαντική πρώτη ύλη για την απομόνωση της ροσμανόλης.

Έγινε επανάληψη του πειράματος με 3,0 g δρόγης και 300 mL ύδατος σε κατάλληλο σκεύος. Το συνολικό βάρος [SF-d] που προέκυψε ήταν 42,7 mg.



Εικόνα 30

Φάσμα 1D ¹H-NMR (CDCl₃) του εκχυλίσματος [SF-d]. Σε μεγέθυνση η περιοχή 6,50-6,90 ppm, όπου φαίνονται οι απλές κορυφές του H-14 των RO, 12MCA, CA, και CS.

Ακολούθησε αναλυτική TLC (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v) με καθαρή ροσμανόλη (RO), απομονωμένη όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1.1, και το εκχύλισμα [SF-

d]. Η κηλίδα που αντιστοιχεί στη ροσμανόλη εμφανίστηκε με χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα (εικόνα 31).



Εικόνα 31

TLC κανονικής φάσεως με **[SF-d]** και ροσμανόλη (RO) (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 97: 3 v/v).

Στη συνέχεια έγινε pTLC κανονικής φάσης με 23,7 mg **[SF-d]** (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 97: 3 v/v), όπου στο ένα άκρο της χρωματογραφικής πλάκας τοποθετήθηκε ποσότητα ροσμανόλης. Μετά από ανάλυση στο UV παραλήφθηκε μία ζώνη A. Η φασματοσκοπική μελέτη $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 και CD_3OD) έδειξε ότι:

- στη **TLC-[SF-d]-ζώνη-A** υπήρχε καθαρή ροσμανόλη (χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα μετά απο ψεκασμό/θέρμανση του ενός άκρου της TLC)

Το βάρος της ροσμανόλης ήταν 0,9 mg.

Στον πίνακα 31 περιγράφεται η παρασκευή και επεξεργασία του ξηρού εκχυλίσματος **[SF-d]**.

Πίνακας 31

Συνοπτικό διάγραμμα παρασκευής και επεξεργασίας του εκχυλίσματος **[SF-d]**.

Αφέψηση 3.0 g αποξηραμένων φύλλων *Salvia fruticosa* Mill. με 300 mL ύδατος για 10 λεπτά



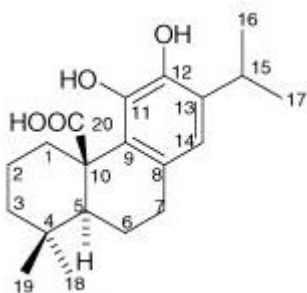
Εκχύλιση σε διαχωριστική χοάνη μετά από προσθήκη 150 mL CH_2Cl_2 . Παραλαβή και συμπόκνωση της οργανικής στιβάδας. Εκχύλιμα **[SF-d]** (42,7 mg).



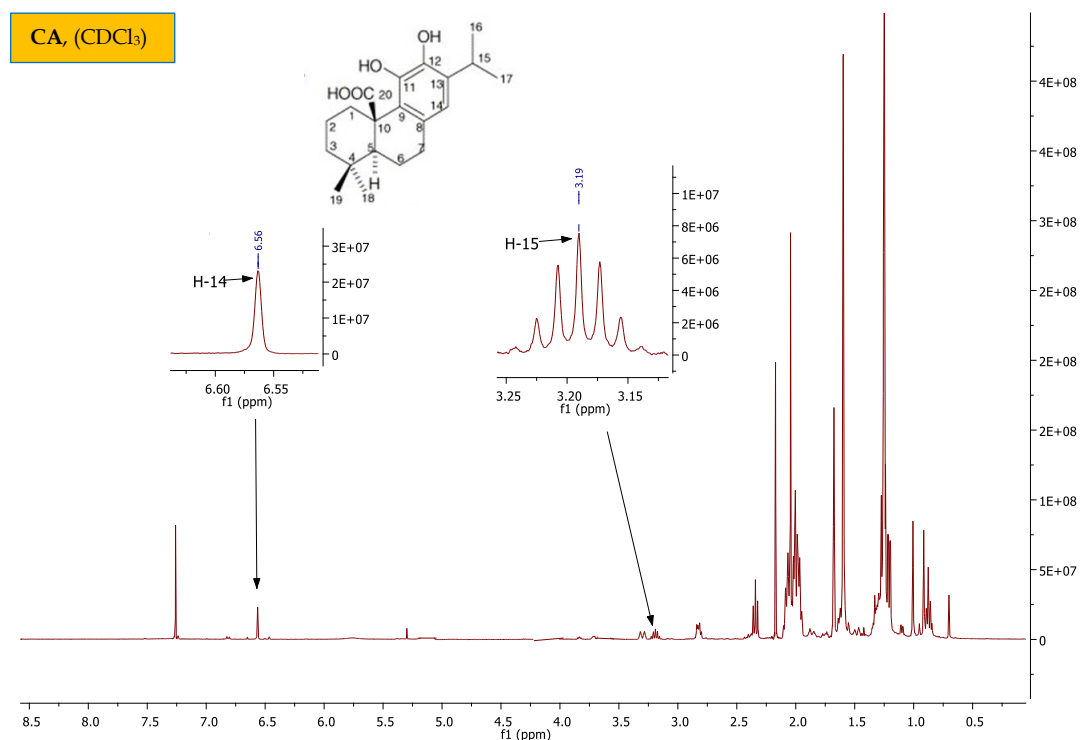
pTLC κανονικής φάσεως με 23,7 mg του **[SF-d]** (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 97: 3 v/v). Απομόνωση της ροσμανόλης (0,9 mg)

5. Φασματοσκοπική μελέτη των απομονωθεισών μεταβολιτών

5.1 Φασματοσκοπική μελέτη καρνοσικού οξέος (CA, Carnosic acid)



Το καρνοσικό οξύ (CA) απομονώθηκε μετά από χρωματογραφική επεξεργασία από το εκχύλισμα [ROS-12h], όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 2.2.2, στο κεφάλαιο 1 του ειδικού πειραματικού μέρους. Μελετήθηκε με φασματοσκοπία 1D ^1H -NMR (CDCl_3) (Bruker DRX 400 MHz) και ^{13}C -NMR (Bruker AC 200 MHz). Η εξέταση των φασμάτων και η σύγκριση με δεδομένα της βιβλιογραφίας: Fishedick et al. 2013, Pukalskas et al. 2005, Torcu et al. 2013, Rodriguez-Meizoso et al. 2007, Xiao et al. 2008, Cuvelier et al. 1994, οδήγησαν στην ταυτοποίηση του καρνοσικού οξέος (CA).



Εικόνα 32

Φάσμα 1D ^1H -NMR του CA. Σε λεπτομέρεια η χαρακτηριστική απλή κορυφή στα 6,56 ppm του H-14, και η επιταπλή κορυφή στα 3,19 ppm του H-15.

Οι χημικές μετατοπίσεις των κορυφών άνθρακα και πρωτονίου, οι ολοκληρώσεις, οι πολλαπλότητες και οι σταθερές σύζευξης (J) του καρνοσικού οξέος, σε CDCl_3 αναφέρονται στον πίνακα 32.

Πίνακας 32

1D ¹H-NMR, ¹³C-NMR του CA σε CDCl₃.

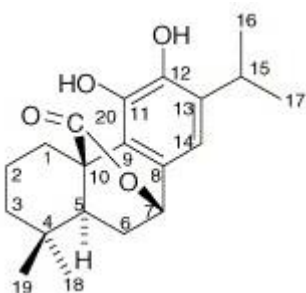
Θέση	δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	δ _c (ppm)
1	α 1,56	1	m		34,5
	β 1,65	1	m		
2	α 2,00	1	m	13,3	23,6
	β 1,48	1	br d		
3	α 2,83	1	m		46,2
	νβ 1,33	1	m		
4	-	-	-	-	38,1
5	1,74	1	m		53,2
6	α 1,86	1	d	13,2	59,1
	β 2,34	1	t	7,5	
7	α 2,81	1	m	14	36,3
	β 3,30	1	br d		
8	-	-	-	-	133,8
9	-	-	-	-	135,2
10	-	-	-	-	48,9
11	-OH 6,99	1	br s		148,5
12	-OH 5,76	1	br s		144,2
13	-	-	-	-	132,1
14	6,56	1	s		120,2
15	3,19	1	sept		29,1
16	1,22	3	d	2,9	25,2
17	1,20	3	d	3,2	26,3
18	1,01	3	s		34,8
19	0,91	3	s		23,4
20	-	-	-	-	184,2

Αναλυτικότερα, στο φάσμα ¹H-NMR, (400MHz) οι πιο χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν ήταν οι παρακάτω:

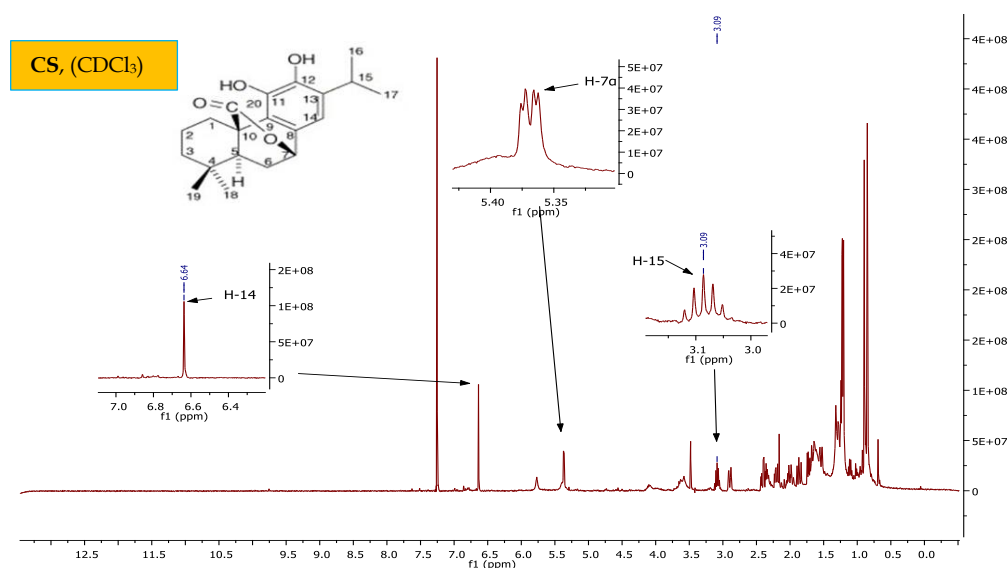
- μια απλή κορυφή (s) στα 6,56 ppm που αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 14 και ολοκληρώνει για 1H
- δύο ευρείες απλές κορυφές (brs) στα 6,99 ppm και στα 5,76 ppm που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των δύο ομάδων -OH (θέσεις 11 και 12) του αρωματικού δακτυλίου
- μια ευρεία διπλή (brd) κορυφή στα 3,30 ppm (J=14 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 7β και ολοκληρώνει για 1H
- μια επταπλή (sept) κορυφή στα 3,19 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 15 και ολοκληρώνει για 1H
- μια ευρεία διπλή (brd) κορυφή (J=13,3 Hz) στα 1,48 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2β και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή (d) κορυφή (J= 3,2 Hz) στα 1,22 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 16 και ολοκληρώνει για 3H
- μια διπλή (d) κορυφή (J= 3,2 Hz) στα 1,20 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 17 και ολοκληρώνει για 3H

- μια απλή κορυφή (s) στα 1,01 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 18 και ολοκληρώνει για 3H
- μια απλή κορυφή (s) στα 0,91 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 19 και ολοκληρώνει για 3H
- μια πολλαπλή κορυφή (m) στα 2,20 που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2α και ολοκληρώνει για 1H

5.2 Φασματοσκοπική μελέτη καρνοσόλης (CS, Carnosol)

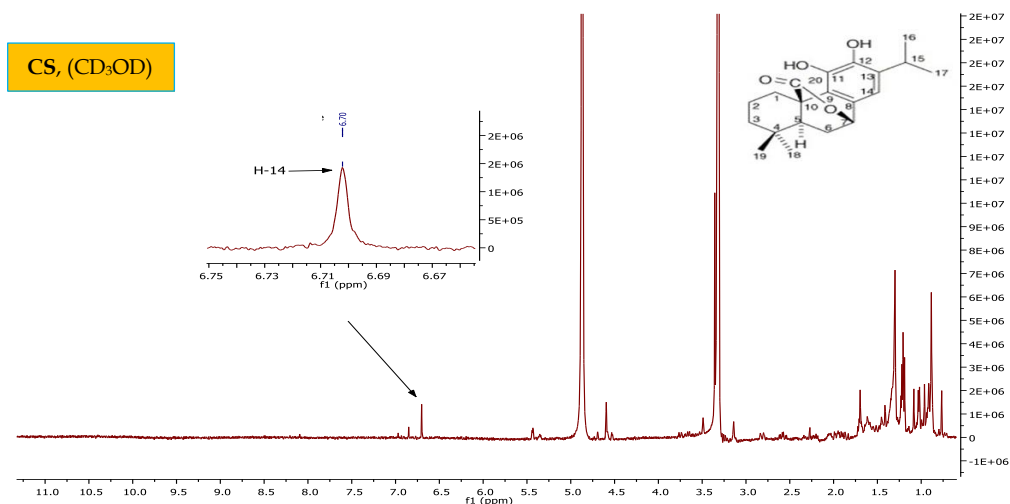


Η καρνοσόλη απομονώθηκε από τα εκχυλίσματα [ROS-7d] και [ROS-12h], (2.1.2 και 2.2.2, κεφάλαιο 1 ειδικού πειραματικού μέρους). Η ταυτοποίηση του μορίου της καρνοσόλης έγινε με φασματοσκοπία 1D $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , CD_3OD) (Bruker DRX 400 MHz) και $^{13}\text{C-NMR}$ (Bruker AC 200 MHz). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συγκρίθηκαν και βρέθηκαν ανάλογα με τη βιβλιογραφία (Amaro-Luis 1997, Ahmed et al. 2006, Ateya et al. 2017, Aydogmus et al. 2006, Dimayuga et al. 1991, Kerkoub et al. 2018, Liu et al. 2013, Marrero et al. 2002, Matloubi et al. 2000, Pukalskas et al. 2005, Yamahara et al. 2016, Xiao et al. 2008, Cuvelier et al. 1994, Topcu et al. 2013).



Εικόνα 33

Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ της CS (CDCl_3). Σε λεπτομέρεια η χαρακτηριστική απλή κορυφή στα 6,64 ppm του H-14, η επιταπλή κορυφή στα 3,19 ppm του H-15 και η διπλή διπλών κορυφή στα 5,37 ppm του H-7α.



Εικόνα 34

Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ CS (CD_3OD). Σε λεπτομέρεια η χαρακτηριστική απλή κορυφή στα 6,70 ppm του H-14.

Αναλυτικότερα, στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$, (400MHz) οι πιο χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις της καρνοσόλης παρουσιάζονται στους πίνακες 33, 34.

Πίνακας 33

1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ της καρνοσόλης σε CDCl_3 .

Θέση	δ_{H} (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
1	α 2,39	1	td	4,3/ 13,3	29,5
1	β 2,90	1	brd	13	
2	α 1,65	1	m		19,3
2	β 2,0	1	dt		
3	α 1,29	1	dd	3,5/ 13,2	41,2
3	β 1,54	1	brd	13,5	
4	-	-	-		34,7
5	1,72	1	q	7	45,6
6	α 2,20	1	m		29,9
6	β 1,87	1	td		
7	α 5,37	1	dd	1,4/ 4	78,3
8	-	-	-		132,3
9	-	-	-		121,4
10	-	-	-		48,2
11	-OH, 5,77	1	brs		141,8
12					141,5
13	-	-	-		132,9
14	6,64	1	s		112,3
15	3,09	1	sept	7	27,4
16	1,21	3	d	2,8	22,6
17	1,22	3	d	2,8	21,9
18	0,85	3	s		31,9
19	0,90	3	s		19,7
20	-	-	-		176,1

Αναλυτικότερα, στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$, (400MHz, CDCl_3) οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις ήταν:

- μια απλή κορυφή (s) στα 6,64 ppm που αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 14 και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή-διπλή κορυφή (dd) στα 5,37 ppm ($J_1=1,4$ Hz, $J_2=4,0$ Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 7α και ολοκληρώνει για 1H
- μια ευρεία απλή κορυφή (brs) στα 5,77 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της ομάδας -OH στη θέση 11 και ολοκληρώνει για 1H
- μια επταπλή (sept) κορυφή στα 3,09 ppm ($J=7$ Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 15 και ολοκληρώνει για 1H
- μια ευρεία διπλή (brd) κορυφή ($J=13$ Hz) στα 2,90 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 1β και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή-τριπλή (dt) κορυφή στα 2,0 ppm, που αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 2β και ολοκληρώνει για 1H
- μια ευρεία διπλή (brd) κορυφή ($J=13,5$ Hz) στα 1,54 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3β και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή-διπλών (dd) κορυφή ($J_1=3,5$, $J_2=13,2$ Hz) στα 1,29 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3α και ολοκληρώνει για 1H
- μια τετραπλή κορυφή (q) ($J=7$ Hz) στα 1,72 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5 και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή (d) κορυφή ($J=2,8$ Hz) στα 1,21 ppm, που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 16 και ολοκληρώνει για 3H
- μια διπλή (d) κορυφή ($J=2,8$ Hz) στα 1,22 ppm, που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 17 και ολοκληρώνει για 3H
- μια τριπλή-διπλή (td) κορυφή ($J_1=3,5$, $J_2=13,2$ Hz) στα 1,87 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6β και ολοκληρώνει για 1H
- μια πολλαπλή κορυφή (m) στα 2,20 που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6α και ολοκληρώνει για 1H

Πίνακας 34

1D ¹H-NMR, ¹³C-NMR της καρνοσόλης σε CD₃OD.

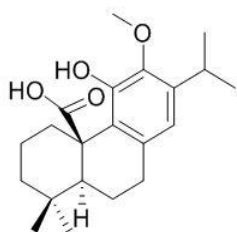
Θέση	δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	δ _c (ppm)
1	α 2,58	1	ddd	4,2/ 14	30,3
	β 2,81	1	brd	13,9	
2	α 1,63	1	m		20,1
	β 1,92	1	m		
3	α 1,33	1	ddd	13,5/ 13,5/ 3,4	42,6
	β 1,53	1	brd	14	
4	-	-	-		35,7
5		1			47,4
6	α 1,86	1	m	4/ 5,8/ 14	30,9
	β 2,19	1	ddd		
7	α 5,44	1	dd	1,7/ 3,7	78,5
8	-	-	-	-	129,3
9	-	-	-	-	123,1
10	-	-	-	-	49,9
11	-	-	-	-	139,9
12	-	-	-	-	144,9
13	-	-	-	-	136,3
14	6,70	1	s		112,8
15	3,24	1	m		28,6
16	1,20	3	d	7	23,2
17	1,23	3	d	4,5	23,2
18	0,88	3	s		32,9
19	0,87	3	s		20,1
20	-	-	-		179,8

Στο φάσμα ¹H-NMR, (CD₃OD) οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις ήταν:

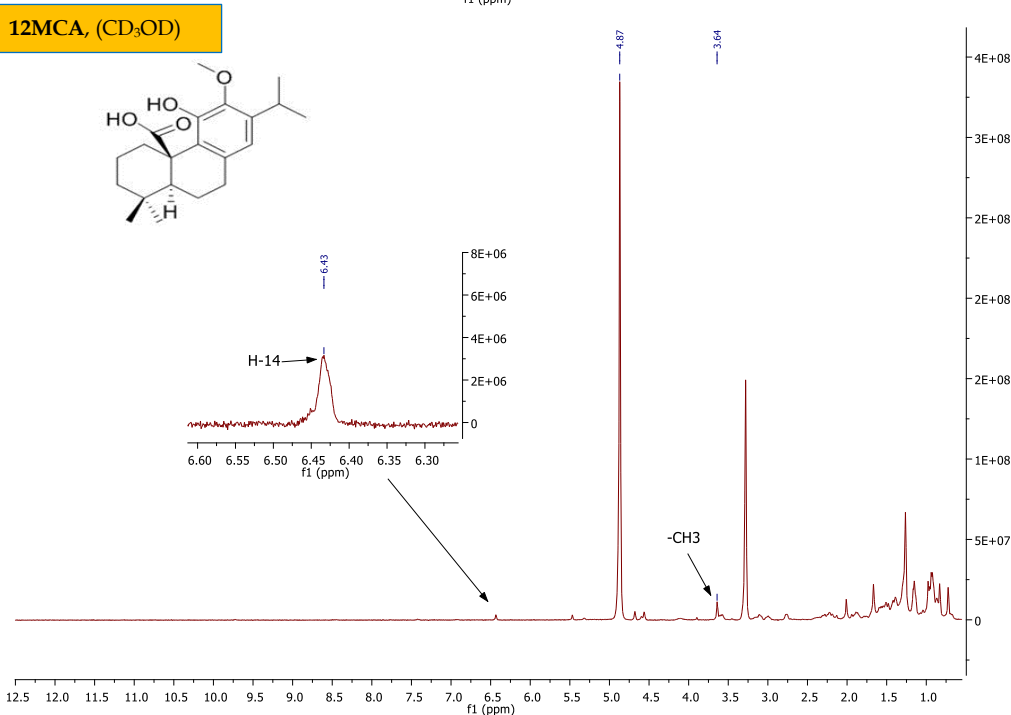
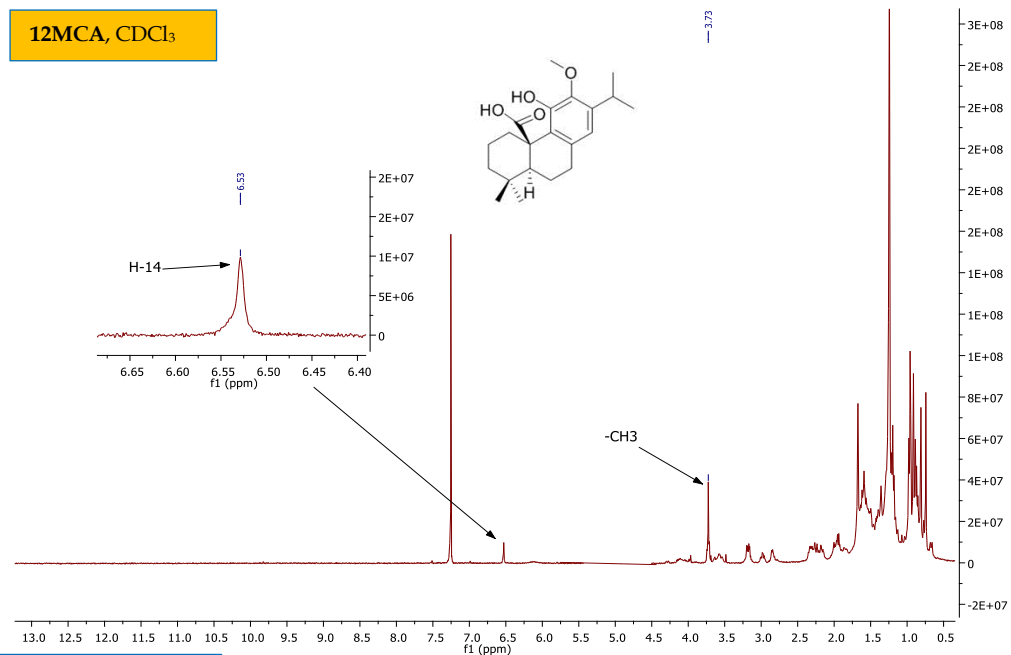
- μια απλή κορυφή (s) στα 6,70 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 14 και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή-διπλών κορυφή (dd) στα 5,40 ppm (J₁=1,7 Hz, J₂=3,7 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 7α και ολοκληρώνει για 1H
- μια πολλαπλή κορυφή (m) στα 3,24 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 15 και ολοκληρώνει για 1H
- μια ευρεία διπλή (brd) κορυφή (J=13,9 Hz) στα 2,81 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 1β και ολοκληρώνει για 1H
- μια πολλαπλή (m) κορυφή στα 1,92 ppm, που αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 2β και ολοκληρώνει για 1H
- μια ευρεία διπλή (brd) κορυφή (J=14 Hz) στα 1,53 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3β και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή (d) κορυφή (J=7 Hz) στα 1,20 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 16 και ολοκληρώνει για 3H
- μια διπλή (d) κορυφή (J=4,5 Hz) στα 1,23 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 17 και ολοκληρώνει για 3H
- μια τριπλή-διπλών (td) κορυφή (J₁=4, J₂=5,8 J₃=14 Hz) στα 2,20 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6β και ολοκληρώνει για 1H

- μια πολλαπλή κορυφή (m) στα 1,86 που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6α και ολοκληρώνει για 1H

5.3 Φασματοσκοπική μελέτη του 12-O-μεθυλοκαρνοσικού οξέος (12MCA, 12-O-methylcarnosic acid)



Το 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ απομονώθηκε από τα εκχυλίσματα **[ROS-12h.7]**, **[ROS- 12h]** και **[Sm]** (2.2.2, 2.3.1 και 3 αντίστοιχα, κεφάλαιο 1 ειδικού πειραματικού μέρους). Η ταυτοποίηση του μορίου 12MCA έγινε με φασματοσκοπία 1D $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 και CD_3OD) (Bruker DRX 400 MHz) και $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) (Bruker AC 200 MHz). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συγκρίθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με την διεθνή βιβλιογραφία: Aydogmus et al. 2006, Djarmati et al. 1993, Fishedick et al. 2013, Kerkoub et al. 2018, Pukalskas et al. 2005, Topcu et al. 2013.



Εικόνα 35

Φάσμα 1D ¹H-NMR του 12MCA (CDCl₃ και CD₃OD). Σε λεπτομέρεια η χαρακτηριστική απλή κορυφή (στα 6,53 και στα 6,43 ppm αντίστοιχα) του H-14 και η απλή κορυφή (στα 3,73 και 3,64 ppm αντίστοιχα) των τριών πρωτονίων της μεθύξυ ομάδας στη θέση 12.

Οι χημικές μετατοπίσεις των κορυφών άνθρακα και πρωτονίου, οι ολοκληρώσεις, οι πολλαπλότητες και οι σταθερές σύζευξης (J) του 12-O-μεθυλοκαρνοσικού οξέος, σε CDCl₃ και CD₃OD αναφέρονται στους πίνακες 35,36.

Πίνακας 35

1D ¹H-NMR, ¹³C-NMR του 12MCA σε CDCl₃.

Θέση	δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	δ _c (ppm)
1	α 1,16	1	m	-	33,8
	β 3,57	1	m		
2	α 2,16	1	m	-	19,6
	β 1,56	1	m		
3	α 1,53	1	m	-	41,7
	β 1,30	1	m		
4	-	-	-	-	34,1
5	1,59	1	m	-	59,8
6	α 1,85	1	m	-	19,7
	β 2,25	1	m		
7	α 2,84	1	m	-	34,3
	β 0,96	1	d		
8	-	-	-	-	134,6
9	-	-	-	-	125,3
10	-	-	-	-	47,8
11, -OH	6,13	1	br s		145,9
12	-	-	-	-	147,1
13	-	-	-	-	139,7
14	6,53	1	s	-	117,5
15	3,18	1	sept	6,7	26,7
16	1,22	3	m	-	23,5
17	1,19	3	m	-	23,9
18	0,98	3	s		33,3
19	0,87	3	s		18,9
20	-	-	-	-	178,9
-OCH ₃	3,73	3	s		54,8

Αναλυτικότερα, στο φάσμα ¹H-NMR, (400MHz, CDCl₃) οι πιο χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν ήταν:

- μια απλή κορυφή (s) στα 6,53 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 14 και ολοκληρώνει για 1H
- μια απλή κορυφή (s) στα 3,73 ppm που αντιστοιχεί στο μεθύλιο (-CH₃) της θέσης 12 και ολοκληρώνει για 3H
- μια απλή κορυφή (brs) στα 6,13 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της ομάδας -OH στη θέση 11 και ολοκληρώνει για 1H
- μια επταπλή (sept) κορυφή στα 3,18 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 15 και ολοκληρώνει για 1H
- μια πολλαπλή κορυφή (m) στα 1,85 που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6α και ολοκληρώνει για 1H
- μια απλή κορυφή (s) στα 0,98 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 18 και ολοκληρώνει για 3H
- μια απλή κορυφή (s) στα 0,87 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 19 και ολοκληρώνει για 3H

- μια μονή κορυφή στα 3,73 ppm που οφείλεται στην παρουσία του -OCH₃ και ολοκληρώνει για 3H.

Πίνακας 36

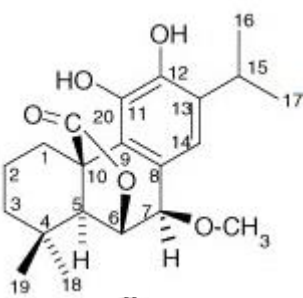
1D ¹H-NMR του 12MCA σε CD₃OD.

Θέση	δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)
1	α 1,07	1	ddd	12,9/ 12,2/ 4,4
	β 3,59	1	m	
2	α 2,22	1	m	
	β 1,53	1	m	
3	α 1,53	1	m	
	β 1,32	1	m	
4	-	-	-	-
5	1,51	1	m	
6	α 1,77	1	brd	12
	β 2,22	1	m	
7	α 2,76	1	m	
	β 2,76	1	m	
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	6,43	1	s	
15	3,13	1	m	
16	1,13	3	d	7,1
17	1,15	3	d	7,3
18	0,98	3	s	
19	0,83	3	s	
20	-	-	-	-
-OCH ₃	3,64	3	s	

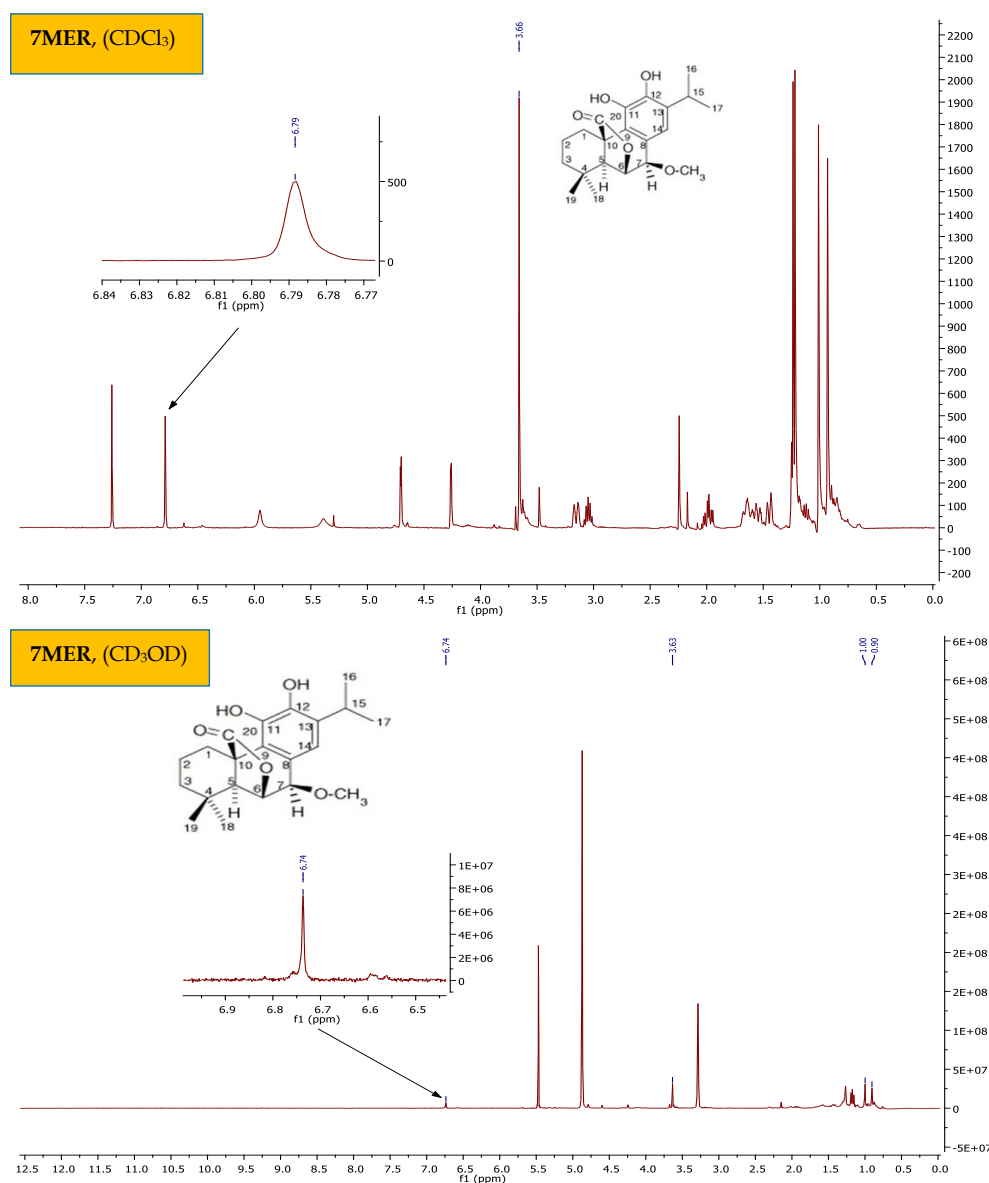
Στο φάσμα ¹H-NMR, (CD₃OD) οι πιο χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν ήταν:

- μια απλή κορυφή (s) στα 6,43 ppm που αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 14 και ολοκληρώνει για 1H
- μια απλή κορυφή (s) στα 3,64 ppm που αντιστοιχεί στη μεθύλο ομάδα (-OCH₃) της θέσης 12 και ολοκληρώνει για 3H

5.4 Φασματοσκοπική μελέτη 7-O-μεθύλ-*epi*-ροσμανόλη (7MER, 7-O-methyl-*epi*-rosmanol)



Η 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη 7MER απομονώθηκε από τα εκχυλίσματα [ROS-7d] και [ROS-2m] (2.1.1 και 2.4.1, στο κεφάλαιο 1 του ειδικού πειραματικού μέρους). Η ταυτοποίηση του μορίου έγινε με φασματοσκοπία 1D ^1H -NMR (CDCl_3 και CD_3OD) (Bruker DRX 400 MHz) και ^{13}C -NMR (CDCl_3 και CD_3OD) (Bruker AC 200 MHz). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συγκρίθηκαν με τις βιβλιογραφικές αναφορές: Liu et al. 2013, Marrero et al. 2002, Takenaka et al. 1997, Ahmed et al. 2006, Gonzalez et al. 1989, Shun-Hua et al. 1993.



Εικόνα 36

Φάσμα 1D ^1H -NMR 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλης. Σε λεπτομέρεια η χαρακτηριστική μονή κορυφή, στα 6,79 και στα 6,74 ppm αντίστοιχα, του H-14. Στα 3,73 και 3,64 ppm αντίστοιχα

φαίνονται οι απλές κορυφές των τριών πρωτονίων της μεθύλυ ομάδας στη θέση 12 σε CDCl_3 και CD_3OD αντιστοιχα.

Οι χημικές μετατοπίσεις των κορυφών άνθρακα και πρωτονίου, ολοκληρώσεις, οι πολλαπλότητες και οι σταθερές σύζευξης (J) της 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλης (CDCl_3 , CD_3OD) αναφέρονται στους πίνακες 37,38.

Πίνακας 37

$1\text{D } ^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ του 7MER σε CDCl_3 .

Θέση	δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	δ_c (ppm)
1	α 1,99	1	td	5/ 13,5 13,8	27,1
	β 3,16	1	brd		
2	α 1,64	1	m		19,7
	β 1,56	1	m		
3	α 1,45	1	brd	13	38,1
	β 1,12	1	m		
4	-	-	-	-	31,3
5	2,24	1	s		51,1
6	4,71	1	d	3	75,1
7	4,26	1	d	3	77,6
8	-	-	-	-	125,9
9	-	-	-	-	124,8
10	-	-	-	-	47,3
11	-OH, 5,40	1	br s		143,5
12	-OH, 5,95	1	br s		142,1
13	-	-	-	-	135,7
14	6,79	1	s		120,8
15	3,05	1	sept	7,2	27,1
16	1,23	3	d	7,5	22,2
17	1,23	3	d	7,5	22,5
18	0,93	3	s		22,1
19	1,01	3	s		31,5
20	-	-	-	-	179,9
-OCH ₃	3,66	3	s		58,3

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$, (CDCl_3) οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν ήταν:

- μια απλή κορυφή (s) στα 6,79 ppm που αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 14 και ολοκληρώνει για 1H
- μια απλή κορυφή (s) στα 3,66 ppm που αντιστοιχεί στο -OCH₃ της θέσης 7 και ολοκληρώνει για 3H
- μια ευρεία απλή κορυφή (brs) στα 5,40 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της φαινυλικής ομάδας Ar-OH στη θέση 11 και ολοκληρώνει για 1H
- μια ευρεία απλή κορυφή (brs) στα 5,95 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της φαινυλικής ομάδας Ar-OH στη θέση 12 και ολοκληρώνει για 1H
- μια επταπλή (sept) κορυφή στα 3,05 ppm (J=7,20 Hz) που αντιστοιχεί στο ισοπροπυλικό πρωτόνιο της θέσης 15 και ολοκληρώνει για 1H

- μια ευρεία διπλή κορυφή ($J=13,80$ Hz) στα 3,16 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 1β και ολοκληρώνει για 1H
- μια ευρεία διπλή κορυφή ($J=13,00$ Hz) στα 1,45 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3α και ολοκληρώνει για 1H
- μια απλή κορυφή (s) στα 0,93 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 18 και ολοκληρώνει για 3H
- μια απλή κορυφή (s) στα 1,01 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 19 και ολοκληρώνει για 3H
- μια διπλή κορυφή στα 1,23 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια στη θέση 16 και 17 που ολοκληρώνουν για 6H

Πίνακας 38

$1D$ 1H -NMR, ^{13}C -NMR του 7MER σε CD_3OD .

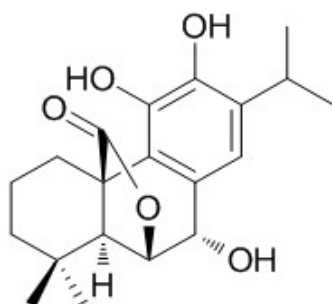
Θέση	δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	δ_c (ppm)
1	α 1,94	1	td	13,7/ 5	28,3
	β 3,29	1	m		
2	α 1,48	1	m		19,9
	β 1,57	1	m		
3	α 1,24	1	td	13,2/ 3	38,9
	β 1,43	1	brd		
4	-	-	-	-	32,9
5	2,15	1	s		56,5
6	4,79	1	d	3,2	80,1
7	4,25	1	d	3,2	75,7
8	-	-	-	-	128,6
9	-	-	-	-	125,5
10	-	-	-	-	47,8
11	-	-	-	-	145,8
12	-	-	-	-	142,7
13	-	-	-	-	138,3
14	6,73	1	s		120,2
15	3,19	1	sept	7,2	28,4
16	1,18	3	d	7	23,8
17	1,16	3	d	7	31,4
18	0,90	3	s		32,2
19	1,00	3	s		22,5
20	-	-	-	-	20,9
-OCH ₃	3,63	3	s		56,4

Στο φάσμα 1H -NMR, (CD_3OD) οι πιο χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν ήταν:

- μια απλή κορυφή (s) στα 6,73 ppm που αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 14 και ολοκληρώνει για 1H
- μια απλή κορυφή (s) στα 3,63 ppm που αντιστοιχεί στη μεθύξο ομάδα (-OCH₃) της θέσης 7 και ολοκληρώνει για 3H
- μια επταπλή (sept) κορυφή στα 3,19 ppm ($J=7,20$ Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 15 και ολοκληρώνει για 1H

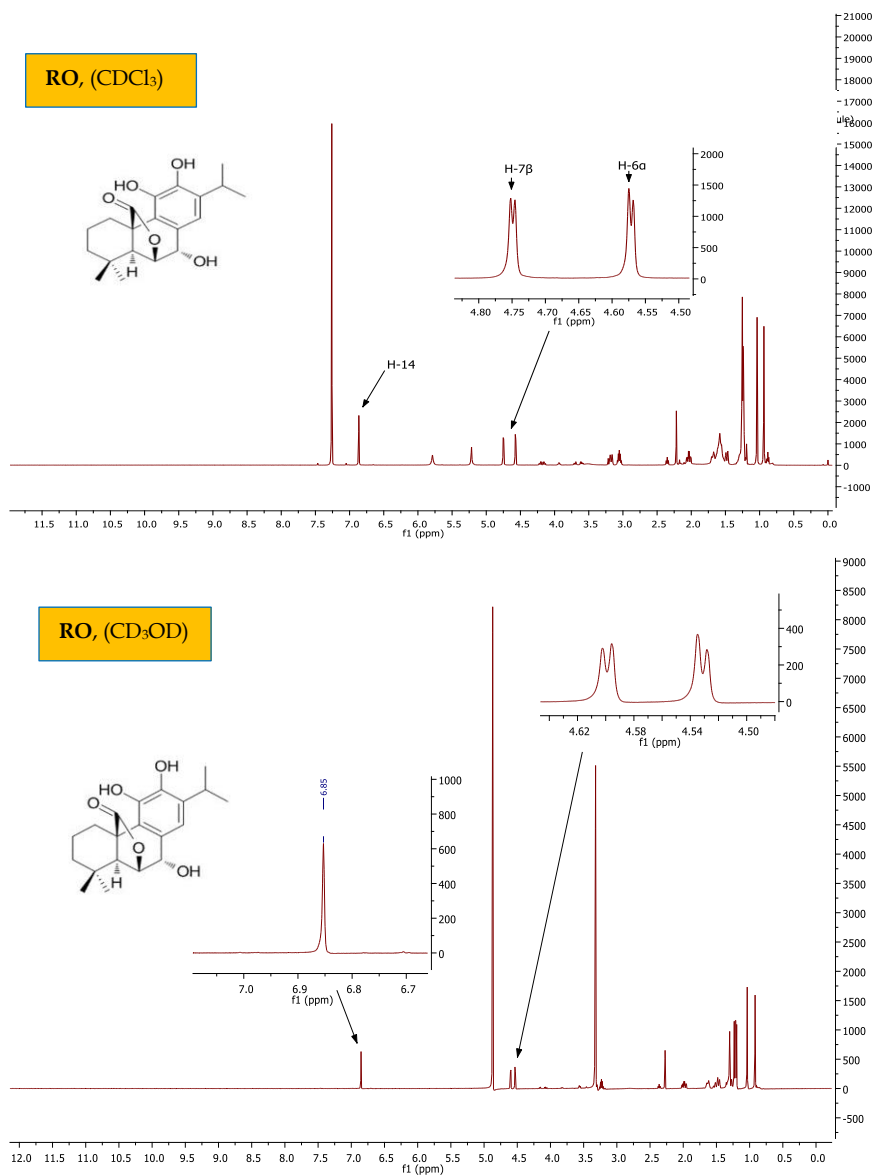
- μια ευρεία διπλή κορυφή ($J=13,00$ Hz) στα 1,43 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3α και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή κορυφή στα 1,18 ppm ($J=7,0$ Hz) αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 16 και ολοκληρώνει για 3H
- μια διπλή κορυφή στα 1,16 ppm ($J=7,0$ Hz) αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 17 και ολοκληρώνει για 3H
- μια απλή κορυφή (s) στα 0,90 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 18 και ολοκληρώνει για 3H
- μια απλή κορυφή (s) στα 1,00 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 19 και ολοκληρώνει για 3H

5.5 Φασματοσκοπική μελέτη της ροσμανόλης (RO, Rosmanol)



Η ροσμανόλη απομονώθηκε από τα εκχυλίσματα **[ROS-7d]** και **[SF-d]** (2.1.1 και 4 αντίστοιχα στο κεφάλαιο 1 του ειδικού πειραματικού μέρους). Η ταυτοποίηση του μορίου της RO έγινε με φασματοσκοπία 1D $^1\text{H-NMR}$ σε (CDCl_3 και CD_3OD) (Bruker DRX 500 MHz) και $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) (Bruker AC 200 MHz). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συγκρίθηκαν με τις βιβλιογραφικές αναφορές: Amaro-Luis (1997), Liu et al (2013), Marrero et al (2002), Takenaka et al (1997), Gonzalez et al (1989), Shun-Hua et al (1993).

Οι χημικές μετατοπίσεις των κορυφών άνθρακα και πρωτονίου, οι ολοκληρώσεις, οι πολλαπλότητες και οι σταθερές σύζευξης (J) της ροσμανόλης σε CDCl_3 και CD_3OD αναφέρονται στους πίνακες 39 και 40.



Εικόνα 37

Φάσμα 1D ¹H-NMR RO. Σε λεπτομέρεια η χαρακτηριστική απλή κορυφή, στα 6,86 και στα 6,85 ppm αντίστοιχα, του H-14. Επίσης οι δύο διπλές κορυφές των H-7β και H-6α στα 4,75 και 4,57 ppm σε CDCl₃ και στα 4,60 και 4,53 ppm σε CD₃OD.

Πίνακας 391D ¹H-NMR, ¹³C-NMR της RO σε CDCl₃.

Θέση	δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	δ _c (ppm)
1	α 2,03	1	td	13,8	28,5
	β 3,17	1	brd		
2	α 1,52	1	m		19,7
	β 1,45	1	m		
3	α 1,17	1	m		38,4
	β 1,43	1	m		
4	-	-	-	-	31,9
5	2,2	1	s		55,6
6	4,57	1	d	3,3	70,9
7	4,75	1	d	3,3	80,3
8	-	-	-	-	131,2
9	-	-	-	-	136,8
10	-	-	-	-	48,8
11	-	-	-	-	144,3
12	-	-	-	-	145,3
13	-	-	-	-	125,4
14	6,86	1	s		118,9
15	3,05	1	sept	7	27,7
16	1,23	3	d	4,5	22,2
17	1,25	3	d	4	22,9
18	1,04	3	s		31,6
19	0,94	3	s		23,3
20	-	-	-	-	178,9

Στο φάσμα ¹H-NMR, (CDCl₃) οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν ήταν:

- μια απλή κορυφή (s) στα 6,86 ppm που αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 14 και ολοκληρώνει για 1H
- μια ευρεία διπλή κορυφή (brd) (J=13,80 Hz) στα 3,17 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 1β και ολοκληρώνει για 1H
- μια επταπλή (sept) κορυφή στα 3,05 ppm (J=7,0 Hz) που αντιστοιχεί στο ισοπροπυλικό πρωτόνιο της θέσης 15 και ολοκληρώνει για 1H
- μια απλή κορυφή (s) στα 0,94 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 19 και ολοκληρώνει για 3H
- μια απλή κορυφή (s) στα 1,04 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 18 και ολοκληρώνει για 3H
- μια διπλή κορυφή στα 1,23 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο στη θέση 16 και ολοκληρώνει για 3H
- μια διπλή κορυφή στα 1,25 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο στη θέση 17 και ολοκληρώνει για 3H

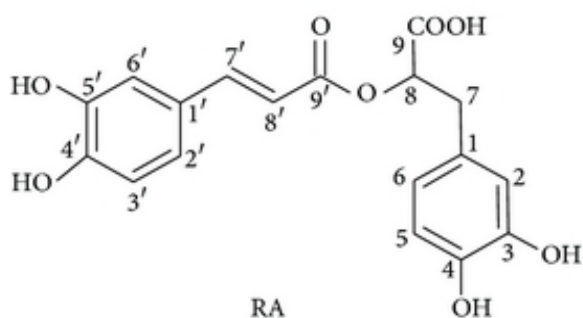
Πίνακας 401D ¹H-NMR, ¹³C-NMR της RO σε CD₃OD.

Θέση	¹ H-NMR δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	¹³ C-NMR
1	α 1,98	1	td	14,4/ 5,2	28,7
	β 1,48	1	m		
2	α 1,45	1	m		20,5
	β 1,61	1	m		
3	α 1,25	1	td	13,2/ 3	39,9
	β 3,32	1	m		
4	-	-	-	-	32,3
5	2,27	1	s		52,1
6	4,53	1	d	3,2	80,6
7	4,60	1	d	3,3	69,5
8	-	-	-	-	129,8
9	-	-	-	-	125,6
10	-	-	-	-	48,9
11	-	-	-	-	145,6
12	-	-	-	-	143,9
13	-	-	-	-	138,2
14	6,85	1	s		120,7
15	3,23	1	sept	6,9	27,9
16	1,22	3	d	6,9	22,8
17	1,20	3	d	6,9	23,3
18	1,03	3	s		32,1
19	0,92	3	s		22,6
20	-	-	-	-	181,2

Στο φάσμα ¹H-NMR, (CD₃OD) οι πιο χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν ήταν:

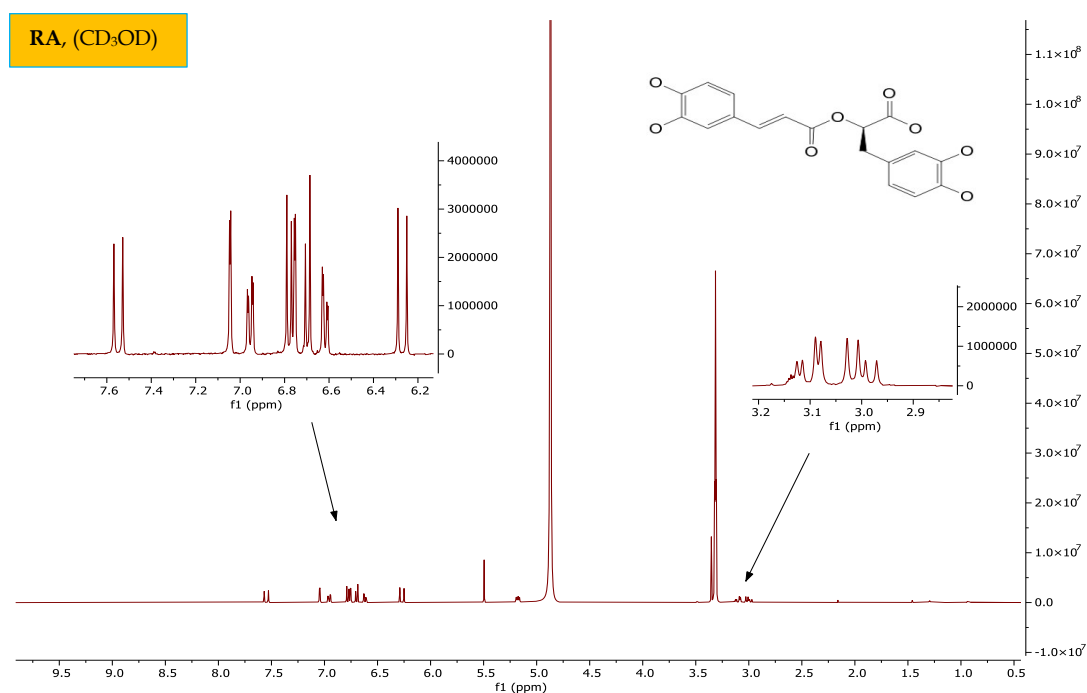
- μια απλή κορυφή (s) στα 6,85 ppm που αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 14 και ολοκληρώνει για 1H
- μια επιπλή (sept) κορυφή στα 3,23 ppm (J=6,90 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 15 και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή κορυφή στα 4,53 ppm (J=3,2 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6 και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή κορυφή στα 4,60 ppm (J=3,3 Hz) που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 7 και ολοκληρώνει για 3H
- μια διπλή κορυφή στα 1,22 ppm (J=6,9 Hz) που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 16 και ολοκληρώνει για 3H
- μια διπλή κορυφή στα 1,20 ppm (J=6,9 Hz) που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 17 και ολοκληρώνει για 3H
- μια απλή κορυφή (s) στα 1,03 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 18 και ολοκληρώνει για 3H
- μια απλή κορυφή (s) στα 0,92 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου της θέσης 19 και ολοκληρώνει για 3H

5.6 Φασματοσκοπική μελέτη του ροσμαρινικού οξέος (RA, Rosmarinic acid)



Το ροσμαρινικό οξύ απομονώθηκε από το εκχύλισμα **[ROS-7d]** (2.1.1, κεφάλαιο 1 ειδικού πειραματικού μέρους). Η ταυτοποίηση του μορίου του RA έγινε με φασματοσκοπία 1D $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ σε CD_3OD . Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συγκρίθηκαν με τις βιβλιογραφικές αναφορές: Chunhong et al. 2013, Paek et al. 2013, Lu et al. 1999, Akoury 2017.

Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά περιγράφονται στο πίνακα 41.



Εικόνα 38

Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ RA, (CD_3OD).

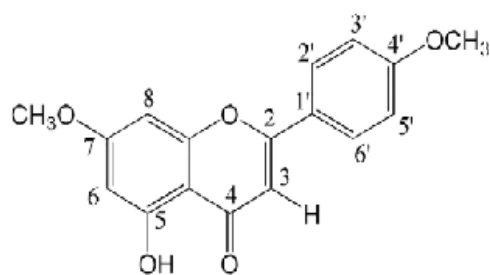
Πίνακας 411D ¹H-NMR, ¹³C-NMR του RA σε CD₃OD.

Θέση	δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	δ _c (ppm)
1'	-	-	-	-	125,9
2'	7,04	1	d	2	114,3
3'	-	-	-	-	143,1
4'	-	-	-	-	145,2
5'	6,78	1	d	8,4	113,9
6'	6,95	1	dd	8,4/ 2,2	121,4
7'	7,55	1	d	15,8	148,9
8'	6,27	1	d	15,8	112,8
9'	-	-	-	-	167,8
1	-	-	-	-	127,9
2	6,75	1	d	1,9	116,7
3	-	-	-	-	144,9
4	-	-	-	-	146,4
5	6,70	1	d	7,8	115,9
6	6,62	1	dd	8, 2	120,8
7	α 3,00	2	dd	14,4/ 8,4	35,2
8	5,18	1	dd	8,6/ 4,3	72,9
9	-	-	-	-	171,5

Στο φάσμα ¹H-NMR, (CD₃OD) οι χημικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν ήταν:

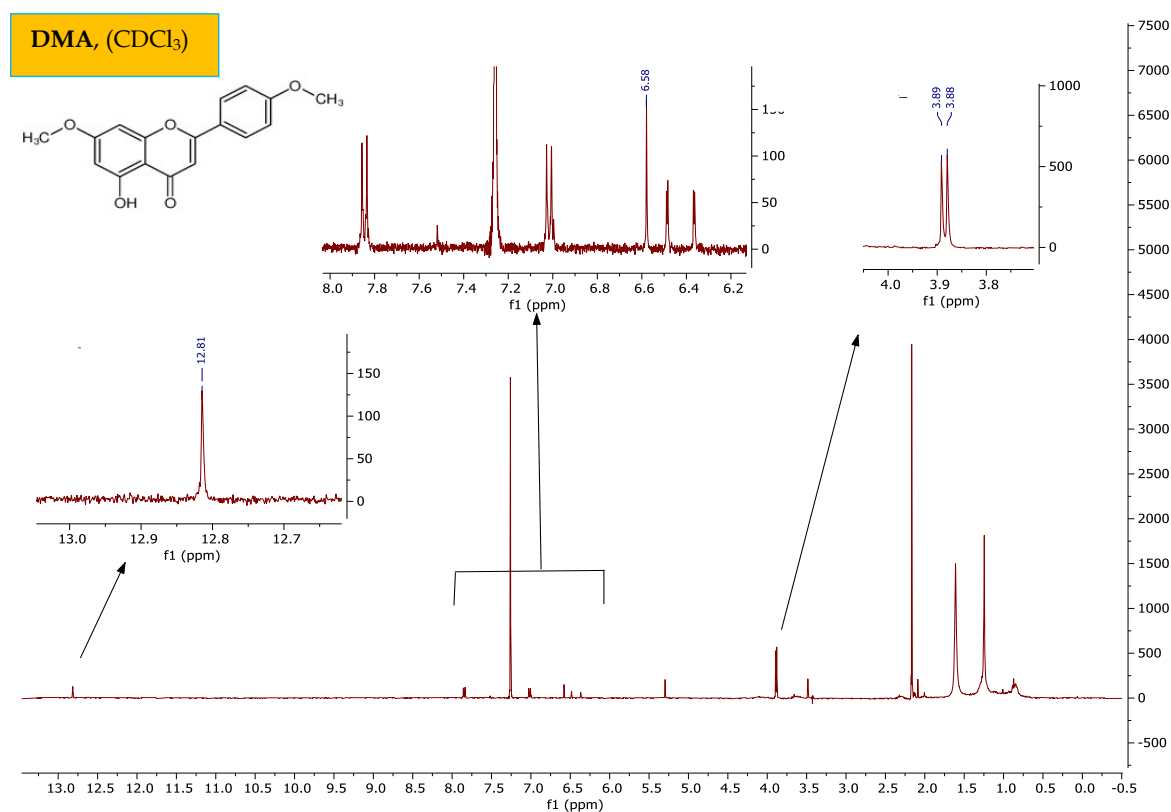
- μια διπλή κορυφή (d) στα 6,75 ppm (J= 1,9 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2' και ολοκληρώνει για 1 H
- μια διπλή κορυφή (d) στα 6,70 ppm (J= 7,8 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5' και ολοκληρώνει για 1 H
- μια διπλή κορυφή (d) στα 7,55 ppm (J= 15,8 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 7 και ολοκληρώνει για 1 H
- μια διπλή κορυφή (d) στα 6,78 ppm (J= 8,40 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5 και ολοκληρώνει για 1 H
- μια διπλή κορυφή (d) στα 7,04 ppm (J= 2,0 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2 και ολοκληρώνει για 1 H
- μια διπλή κορυφή (d) στα 6,27 ppm (J= 15,9 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 8 και ολοκληρώνει για 1 H
- μια διπλή-διπλή κορυφή (dd) στα 5,18 ppm (J₁= 4,3, J₂= 8,6 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 8' και ολοκληρώνει για 1 H
- μια διπλή-διπλή κορυφή (dd) στα 6,62 ppm (J₁=2,0, J₂= 8,0Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6' και ολοκληρώνει για 1 H
- μια διπλή-διπλή κορυφή (dd) στα 6,95 ppm (J₁=2,20, J₁= 8,40 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6 και ολοκληρώνει για 1 H
- μια διπλή-διπλή κορυφή (dd) στα 3,00 ppm (J₁= 8,4, J₂= 14,40 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 7'α και ολοκληρώνει για 1 H
- μια διπλή-διπλή κορυφή (dd) στα 3,10 ppm (J₁=4,2 J₁= 14,40 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 7'β και ολοκληρώνει για 1 H

5.7 Φασματοσκοπική μελέτη της 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνης (DMA, 4',7-O-dimethylarigenin)



Η 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνη απομονώθηκε από το εκχύλισμα [ROS-2m] (2.4.1, κεφάλαιο 1 ειδικού πειραματικού μέρους). Η ταυτοποίηση του μορίου 12MCA έγινε με φασματοσκοπία 1D $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συγκρίθηκαν με τις βιβλιογραφικές αναφορές: Gohari et al. 2011, Saraswathy et al. 2012.

Οι χημικές μετατοπίσεις των κορυφών άνθρακα και πρωτονίου, οι ολοκληρώσεις, οι πολλαπλότητες και οι σταθερές σύζευξης (J) αναφέρονται στο πίνακα 42 που ακολουθεί.



Εικόνα 39

Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνης σε CDCl_3 .

Πίνακας 421D ¹H-NMR, ¹³C-NMR της DMA σε CDCl₃.

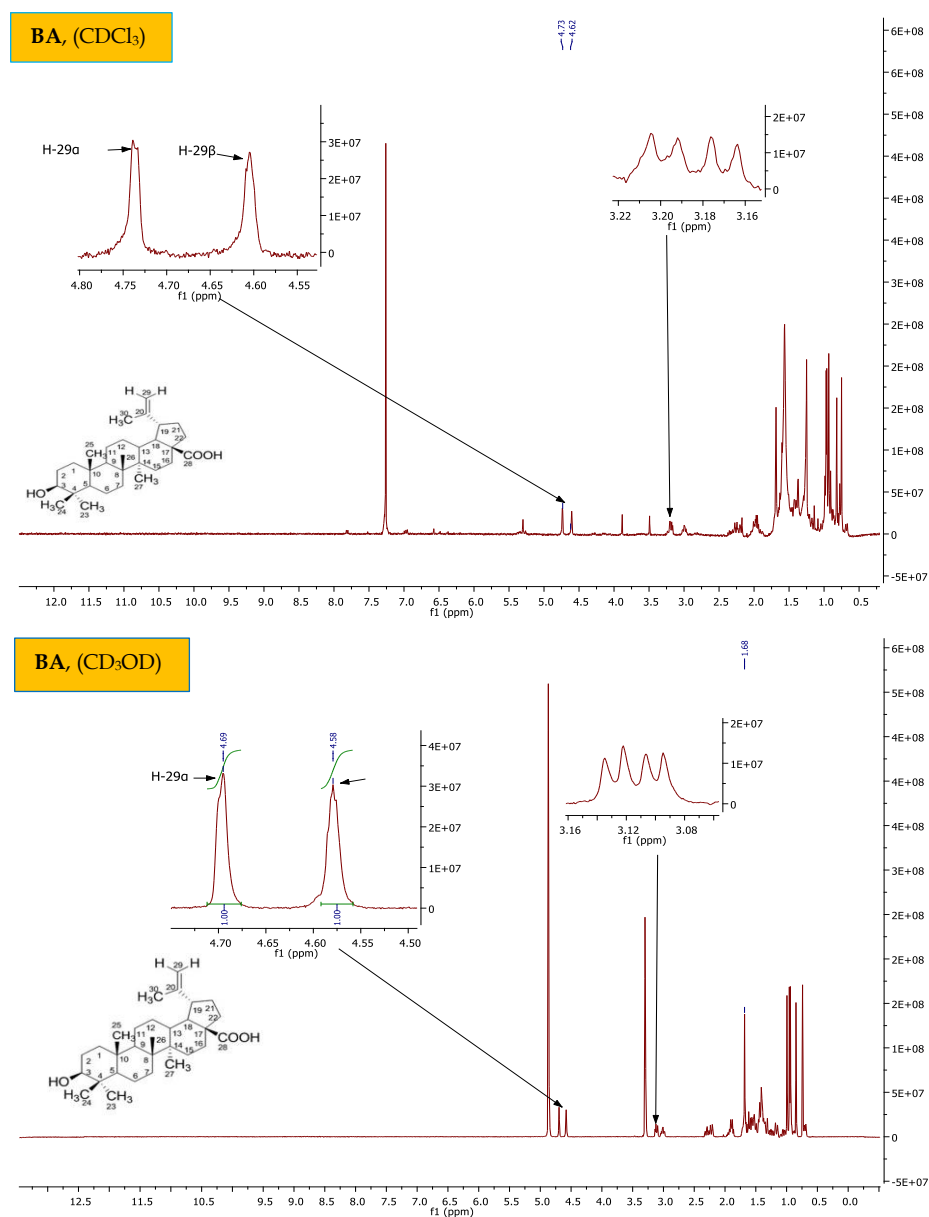
Θέση	δ _H (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	δ _C (ppm)
2	-	-	-	-	162,9
3	6,58	1	s	-	104,8
4	-	-	-	-	182,7
5, -OH	12,81	1	brs	-	158,1
6	6,49	1	d	2,5	98,4
7	-	-	-	-	165,8
8	6,37	1	d	2,5	93,1
9	-	-	-	-	162,5
10	-	-	-	-	105,8
7, -OCH ₃	3,89	3	s	-	56,2
1'	-	-	-	-	123,9
2'	7,85	1	d	9	128,2
3'	7,02	1	d	9	113,9
4'	-	-	-	-	164,1
5'	7,02	1	d	9	113,9
6'	7,85	1	d	9	128,2
4', -OCH ₃	3,88	3	s	-	55,53

Στο φάσμα 1D ¹H-NMR, οι χημικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν ήταν:

- μια απλή κορυφή (s) στα 6,58 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3 και ολοκληρώνει για 1 H
- μια ευρεία απλή κορυφή (s) στα 12,81 ppm, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της ομάδας -OH στη θέση 5 και ολοκληρώνει για 1 H
- μια απλή κορυφή (s) στα 3,89 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθοξυλίου (-OCH₃) της θέσης 7 και ολοκληρώνει για 3 H
- μια απλή κορυφή (s) στα 3,88 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθοξυλίου (-OCH₃) της θέσης 4' και ολοκληρώνει για 3 H
- μια διπλή κορυφή (d) στα 7,02 ppm (J= 9,0 Hz) που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 3' και 5' και ολοκληρώνει για 2 H
- μια διπλή κορυφή (d) στα 7,85 ppm (J= 9,0 Hz) που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της θέσης 6' και 2' και ολοκληρώνει για 2 H
- μια διπλή κορυφή (d) στα 6,58 ppm (J= 2,5 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3 και ολοκληρώνει για 1 H
- μια διπλή κορυφή (d) στα 6,49 ppm (J= 2,5 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6 και ολοκληρώνει για 1 H

5.8 Φασματοσκοπική μελέτη του μπετουλινικού οξέος (BA, Betulinic acid)

Το μπετουλινικό οξύ απομονώθηκε από τα εκχυλίσματα [ROS-7d] και [ROS-12h] (2.1.2 και 2.2.2 αντίστοιχα, κεφάλαιο 1 ειδικού πειραματικού μέρους). Η ταυτοποίηση του BA έγινε με φασματοσκοπία 1D $^1\text{H-NMR}$, και $^{13}\text{C-NMR}$ (σε CDCl_3 , CD_3OD). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συγκρίθηκαν με τις βιβλιογραφικές αναφορές: Sut et al. 2018, Yili et al. 2009, Eyoung et al. 2018, Haque et al. 2013, Ding et al. 2018, Fomogne-Fodjoa et al. 2017 και βρέθηκαν ταυτόσημα.



Εικόνα 40

Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ μπετουλινικού οξέος. Σε λεπτομέρεια η χαρακτηριστικές απλές κορυφές των H-29α και H-29β, στα 4,74 και 4,61 ppm σε CDCl_3 και στα 4,69 και 4,58 ppm σε CD_3OD .

Οι χημικές μετατοπίσεις στα φάσματα, οι ολοκληρώσεις, οι πολλαπλότητες και οι σταθερές σύζευξης (J) του ΒΑ αναφέρονται στους πίνακες 43, 44.

Πίνακας 43

¹D ¹H-NMR, ¹³C-NMR του ΒΑ (CDCl₃)

Θέση	δ _H (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	δ _C (ppm)
1	0,91	1	m		38,7
2					27,6
3	3,18	1	dd	5,2/ 12	78,8
4	-	-	-	-	38,7
5	0,68	1	brd		55,3
6	1,40	2	m		18,2
7					34,3
8	-	-	-	-	40,6
9	1,25	1	br s		50,4
10	-	-	-	-	37,2
11	1,25	2	br s		20,8
12	α 1,69 β	1	s		25,5
13	2,20	1	m		38,3
14	-	-	-	-	42,4
15					30,5
16					32,2
17	-	-	-	-	56,2
18					47,1
19	2,99	1	m		46,6
20	-	-	-	-	150,5
21	α 1,42 β 1,94	1 1	m m		29,7
22	1,97	2	m		37,1
23	0,96	3	s		27,9
24	0,75	3	s		15,3
25	0,82	3	s		15,9
26	0,93	3	s		16,1
27	0,97	3	s		14,6
28					179,4
29	α 4,74 β 4,61	1 1	br s br s		109,5
30	1,69	3	br s		19,3

Στο φάσμα ¹H-NMR, (CDCl₃) οι πιο χαρακτηριστικές μετατοπίσεις ήταν:

- μια ευρεία απλή κορυφή (br s) στα 4,74 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 29α του διπλού δεσμού και ολοκληρώνει για 1 H
- μια ευρεία απλή κορυφή (br s) στα 4,61 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 29β του διπλού δεσμού και ολοκληρώνει για 1 H
- μια ευρεία απλή κορυφή (br s) στα 1,69 ppm που αντιστοιχεί στα 3 πρωτόνια του μεθυλίου στη θέση 30 και ολοκληρώνει για 3 H
- μια διπλή διπλών κορυφή (dd) (J₁=5,20, J₂=12,00 Hz) στα 3,18 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3 και ολοκληρώνει για 1 H

Πίνακας 44

1D ¹H-NMR, ¹³C-NMR του BA (CD₃OD)

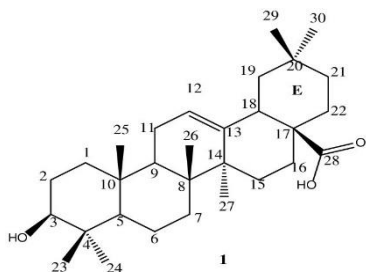
Θέση	δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	δ _c (ppm)
1	α 0,88	1	m		38,7
	β 1,55	1	m		
2	β 1,75	2	m		27,7
3	3,11	1	dd	12/ 5,2	77,9
4	-	-	-	-	39,2
5	0,70	1	br d	8,8	55,4
6					18,4
7					34,5
8	-	-	-	-	40,7
9	1,36	1	m		50,5
10	-	-	-	-	37,2
11					20,9
12	α 1,04	1	dd	13/ 4,7	25,6
	β 1,88	1	m		
13	2,29	1	td	12/ 4,0	38,2
14	-	-	-	-	42,5
15	α 1,25	1	m		30,6
16	α 1,55	1	m		32,2
	β 2,22	1	m		
17	-	-	-	-	55,9
18	1,61	1	t	11,3	49,1
19	3,01	1	m		47,1
20	-	-	-	-	150,8
21	α 1,41	1	m		29,7
	β 1,91				
22					36,8
23	0,96	3	s		28,3
24	0,74	3	s		15,9
25	0,85	3	s		16,3
26	0,99	3	s		16,4
27	0,94	3	s		14,9
28					177,8
29	α 4,69	1	s		110,1
	β 4,58	1	s		
30	1,68	3	s		19,4

Στο φάσμα ¹H-NMR, (400MHz, CD₃OD) οι χαρακτηριστικές μετατοπίσεις ήταν:

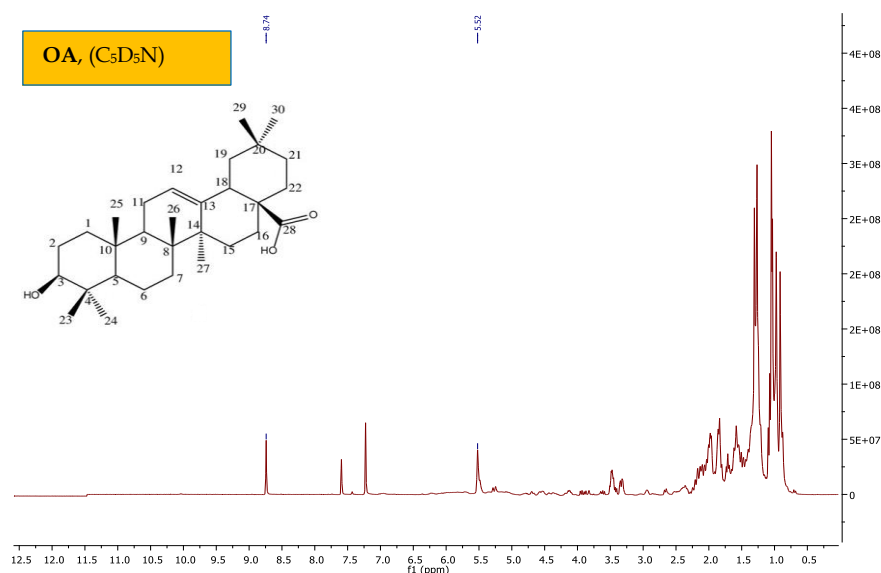
- μια ευρεία απλή κορυφή (br s) στα 4,69 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 29α του διπλού δεσμού και ολοκληρώνει για 1 H
- μια ευρεία απλή κορυφή (br s) στα 4,58 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 29β του διπλού δεσμού και ολοκληρώνει για 1 H
- μια ευρεία απλή κορυφή (br s) στα 1,68 ppm που αντιστοιχεί στα 3 πρωτόνια του μεθυλίου στη θέση 30 και ολοκληρώνει για 3 H

- μια διπλή διπλών κορυφή (dd) ($J_1=5,20$, $J_2=12,00$ Hz) στα 3,30 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3 και ολοκληρώνει για 1 H

5.9 Φασματοσκοπική μελέτη του ολεανολικού οξέος (OA, Oleonic acid)



Το ολεανολικό οξύ απομονώθηκε από το εκχύλισμα [ROS-7d] (παράγραφος 2.1.1, κεφάλαιο 1 ειδικού πειραματικού μέρους) Η ταυτοποίηση του OA έγινε με φασματοσκοπία 1D $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ (σε $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ και CDCl_3). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ήταν συμβατά με αυτά της βιβλιογραφίας: Hung et al. 2001, Martins et al. 2013, Seebacher et al. 2003.



Εικόνα 41

Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ του ολεανολικού οξέος σε $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Οι χημικές μετατοπίσεις των κορυφών, οι ολοκληρώσεις, πολλαπλότητες και σταθερές σύζευξης (J) του OA αναφέρονται στους πίνακες 45,46.

Πίνακας 45

1D ¹H-NMR, ¹³C-NMR του ΟΑ (CDCl₃).

Θέση	¹ H-NMR δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	¹³ C-NMR
1	1,92	1	dd	9/3,5	38,5
2	1,55	2	m		28,4
3	3,22	1	dd	11,3/ 4,9	79,1
4	-	-	-	-	38,8
5	0,74	1	m		55,4
6	1,54	1	m		18,8
7	1,49	1	m		32,7
8	-	-	-	-	39,3
9	1,54	1	m		47,7
10	-	-	-	-	37,1
11	0,94	1	m		23,8
12	5,26	1	t	3,5	122,9
13	-	-	-	-	143,5
14	-	-	-	-	41,6
15	1,60	1	m		27,7
16	0,94	1	m		23,8
17	-	-	-	-	46,7
18	2,82	1	dd	4,1	42,1
19	2,87	1	m		46,2
20	-	-	-	-	31,1
21	1,62	1	m		33,9
22	1,30	1	m		33,2
23	1,0	3	s		28,9
24	0,79	3	s		16,8
25	0,92	3	s		15,3
26	0,80	3	s		17,2
27	1,15	3	s		26,1
28	-	-	-	-	180,1
29	0,92	3	s		33,2
30	0,99	3	s		23,7

Στο φάσμα ¹H-NMR, (CDCl₃) οι χαρακτηριστικές μετατοπίσεις ήταν:

- 7 απλές κορυφές από τα 0,72 ppm έως τα 1,15 ppm, που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των 7 μεθυλιών του μορίου στις θέσεις 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, και ολοκληρώνουν για 3H
- μια τριπλή κορυφή (t) (J=3,5) στα 5,26 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του διπλού δεσμού στη θέση 12 και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή διπλών (dd) κορυφή στα 3,22 ppm (J₁=4,90, J₂=11,30 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3 και ολοκληρώνει για 1H

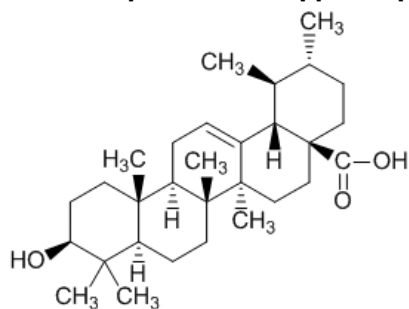
Πίνακας 461D ¹H-NMR, ¹³C-NMR του ΟΑ (C₅D₅N).

Θέση	¹ H-NMR δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	¹³ C-NMR
1					38,6
2					28,1
3	3,48	1	dd	15,3/ 9,6	79,1
4	-	-	-	-	38,9
5					55,4
6					18,8
7					32,7
8	-	-	-	-	39,3
9					47,7
10	-	-	-	-	37,1
11					23,8
12	5,52	1	s		122,8
13					143,6
14	-	-	-	-	41,5
15					27,7
16					23,8
17	-	-	-	-	46,7
18	3,33	1	dd	13,7/ 5,1	42,2
19					46,1
20	-	-	-	-	31,0
21					33,9
22					33,3
23	1,27	3	s		28,7
24	1,05	3	s		16,8
25	0,91	3	s		15,3
26	1,07	3	s		17,1
27	1,31	3	s		26,2
28	-	-	-	-	180,1
29	0,97	3	s		33,1
30	1,03	3	s		23,7

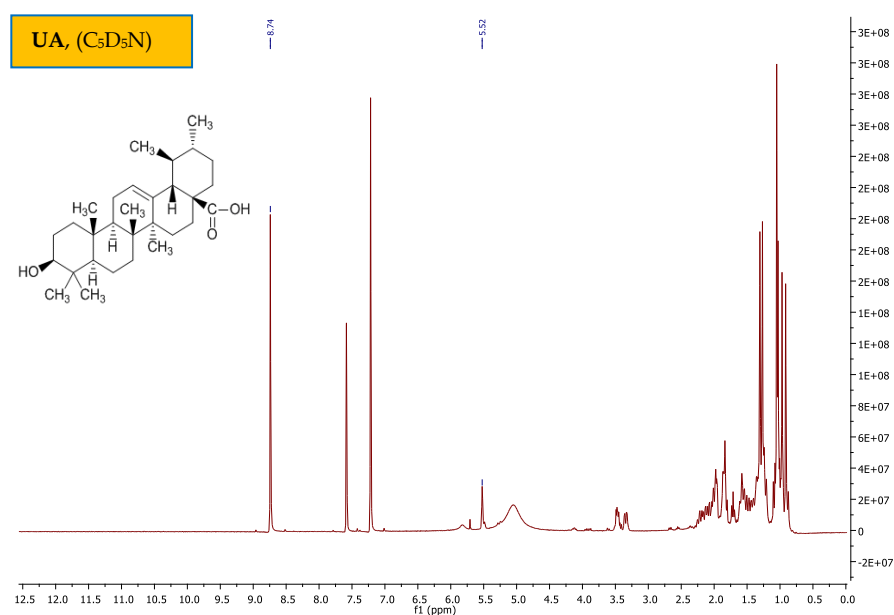
Στο φάσμα ¹H-NMR, (pyridine-d₅) οι χαρακτηριστικές μετατοπίσεις ήταν:

- 7 απλές κορυφές από τα 0,91 ppm έως τα 1,27 ppm, που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των 7 μεθυλιών του μορίου στις θέσεις 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, και ολοκληρώνουν, έκαστο, για 3H
- μια απλή κορυφή στα 5,521 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του διπλού δεσμού στη θέση 12 και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή διπλών (dd) κορυφή στα 3,48 ppm (J₁=9,60, J₂=15,30 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3 και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή διπλών (dd) κορυφή στα 3,33 ppm (J₁=5,10, J₂=13,70 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 18 και ολοκληρώνει για 1H

5.10 Φασματοσκοπική μελέτη του ουρσολικού οξέος (UA, Ursolic acid)



Το ουρσολικό οξύ απομονώθηκε από το εκχύλισμα [ROS-7d] (παράγραφος 2.1.2, κεφάλαιο 1 ειδικού πειραματικού μέρους). Η ταυτοποίηση του UA έγινε με φασματοσκοπία 1D ¹H-NMR και ¹³C-NMR (σε C₅D₅N και CDCl₃). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ήταν συμβατά με αυτά της βιβλιογραφίας: Hung et al (2001), Martins et al (2013), Seebacher et al (2003).



Εικόνα 42

Φάσμα 1D ¹H-NMR του ουρσολικού οξέος σε C₅D₅N.

Οι χημικές μετατοπίσεις κορυφών άνθρακα και πρωτονίου, οι ολοκληρώσεις, οι πολλαπλότητες και οι σταθερές σύζευξης (J) του UA σε CDCl₃ και CD₃OD αναφέρονται στους πίνακες 47,48.

Πίνακας 47

1D ¹H-NMR, ¹³C-NMR του UA (CDCl₃).

Θέση	¹ H-NMR δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	¹³ C-NMR
1	1,72	1	m		38,6
2	1,60	1	m		28,2
3	3,21	1	dd	10,8/ 4,9	78,7
4	-	-	-	-	38,5
5	1,34	1	m		55,2
6	18,3	1	m		18,3
7	1,72	1	m		32,9
8	-	-	-	-	39,5
9	1,60	1	m		47,3
10	-	-	-	-	37,0
11	1,91	1	m		23,7
12	5,27	1	t	3,6	125,9
13	-	-	-	-	137,9
14	-	-	-	-	42,0
15	1,60	1	m		28,1
16	1,34	1	m		25
17	-	-	-	-	48,1
18	2,2	1	m		53,8
19	1,0	1	m		38,5
20	-	-	-	-	38,5
21	1,27	1	m		30,3
22	1,72	1	m		37,4
23	0,99	3	s		28,9
24	0,78	3	s		15,6
25	0,93	3	s		15,4
26	0,80	3	s		17,1
27	1,09	3	s		23,5
28	-	-	-	-	179,6
29	0,86	3	d	6	17,0
30	0,95	3	d	6,5	21,4

Στο φάσμα ¹H-NMR, (CDCl₃) οι χαρακτηριστικές μετατοπίσεις ήταν

- 7 απλές κορυφές από τα 0,78 ppm έως τα 1,09 ppm, που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των 7 μεθυλιών του μορίου στις θέσεις 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, και ολοκληρώνουν για 3H
- μια τριπλή κορυφή (t) (J=3,5) στα 5,27 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του διπλού δεσμού στη θέση 12 και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή διπλών (dd) κορυφή στα 3,22 ppm (J₁=4,90, J₂=10,80 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3 και ολοκληρώνει για 1H

Πίνακας 481D ¹H-NMR, ¹³C-NMR του UA (C₅D₅N).

Θέση	¹ H-NMR δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	J (Hz)	¹³ C-NMR
1					39,2
2					28,1
3	3,47	1	dd	9,9/ 5,5	78,1
4	-	-	-	-	39,4
5					55,8
6					18,8
7					33,5
8	-	-	-	-	39,9
9					48,1
10	-	-	-	-	37,5
11					23,7
12	5,52	1	s		125,7
13	-	-	-	-	139,2
14	-	-	-	-	42,5
15					28,9
16					24,8
17	-	-	-	-	48,1
18	2,67	1	d	11	53,6
19					39,4
20					39,3
21					31,1
22					37,3
23	1,27	3	s		28,8
24	1,05	3	s		16,6
25	0,91	3	s		15,8
26	1,05	3	s		17,4
27	1,30	3	s		24,1
28	-	-	-	-	179,8
29	1,04	3	d	8,5	17,5
30	0,97	3	s		21,4

Στο φάσμα ¹H-NMR, (C₅D₅N) οι χαρακτηριστικές μετατοπίσεις ήταν:

- 7 μονές κορυφές από τα 0,97 ppm έως τα 1,27 ppm, που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των 7 μεθυλίων στις θέσεις 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, και ολοκληρώνουν για 3H
- μια απλή κορυφή στα 5,523 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του διπλού δεσμού στη θέση 12 και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή διπλών (dd) κορυφή στα 3,22 ppm (J₁=5,50, J₂=9,90 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3 και ολοκληρώνει για 1H
- μια διπλή (d) κορυφή στα 2,67 ppm (J=11,00 Hz) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 18 και ολοκληρώνει για 1H

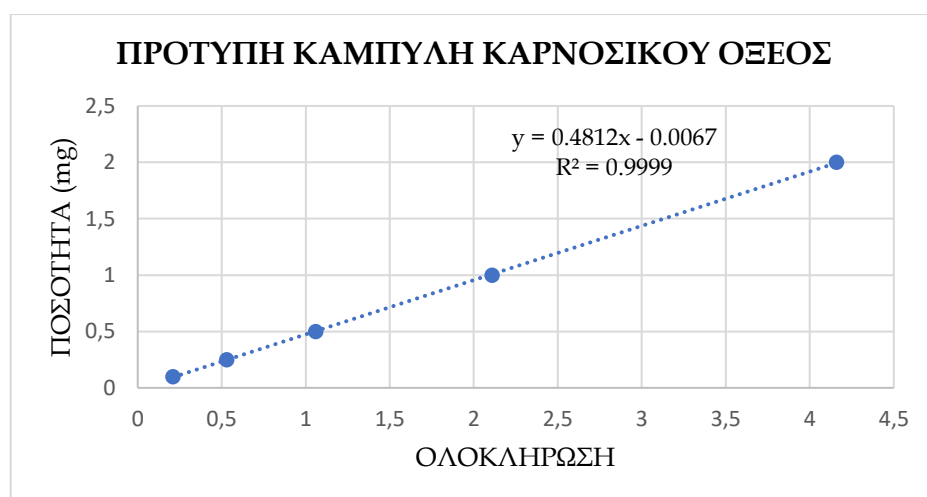
6. Πρότυπες καμπύλες αναφοράς

Πραγματοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς με πέντε σημεία που αντιστοιχούν στα 0,1 mg, 0,25 mg, 0,5 mg, 1,0 mg και 2,0 mg για την καρνοσόλη, το καρνοσικό οξύ, το 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ, την 7-O-μεθυλ-επι-ροσμανόλη, τη ροσμανόλη, το μπετουλινικό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ και για την 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνη.

Αναλυτικότερα:

- Για το καρνοσικό οξύ λήφθηκε υπόψη η απλή (s) κορυφή στα 6,56 ppm (CDCl₃), ή στα 6,41 ppm (CD₃OD), που αντιστοιχεί στο H-14 και ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο
 - Για την καρνοσόλη λήφθηκε υπόψη η απλή (s) κορυφή στα 6,64 ppm (CDCl₃), ή στα 6,67 ppm (CD₃OD), που αντιστοιχεί στο H-14 και ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο
 - Για το 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ λήφθηκε υπόψη η απλή (s) κορυφή στα 6,53 ppm (CDCl₃), ή στα 6,44 ppm (CD₃OD), που αντιστοιχεί στο H-14 και ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο
 - Για την 7-O-μεθύλ-*epi*-ροσμανόλη λήφθηκε υπόψη η απλή (s) κορυφή στα 6,79 ppm (CDCl₃), ή στα 6,73 ppm (CD₃OD), που αντιστοιχεί στο H-14 και ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο
 - Για την ροσμανόλη λήφθηκε υπόψη η απλή (s) κορυφή στα 6,86 ppm (CDCl₃), ή στα 6,85 ppm (CD₃OD), που αντιστοιχεί στο H-14 και ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο
 - Για τη 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνη λήφθηκε υπόψη η διπλή (d) κορυφή στα 7,84 ppm (CDCl₃) που αντιστοιχεί στα H-2' και H-6' και ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια
 - Για το μπετουλινικό οξύ λήφθηκε υπόψη η ευρεία απλή (brs) κορυφή στα 4,73 ppm (CDCl₃), ή στα 4,69 ppm (CD₃OD), που αντιστοιχεί στο H-29α και ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο
 - Για το ροσμαρινικό οξύ λήφθηκε υπόψη η διπλή (d) κορυφή στα 6,27 ppm (CD₃OD), που αντιστοιχεί στο H-8 και ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο
- Η διαδικασία ποσοτικής ανάλυσης έγινε με 1D ¹H-qNMR.

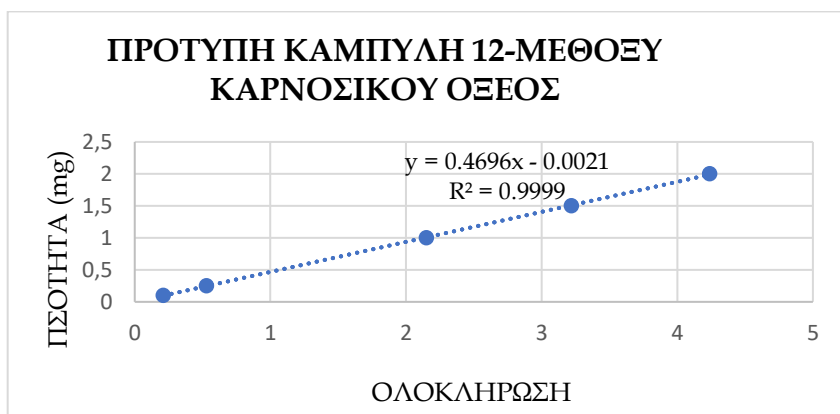
6.1 Πρότυπη καμπύλη καρνοσικού οξέος



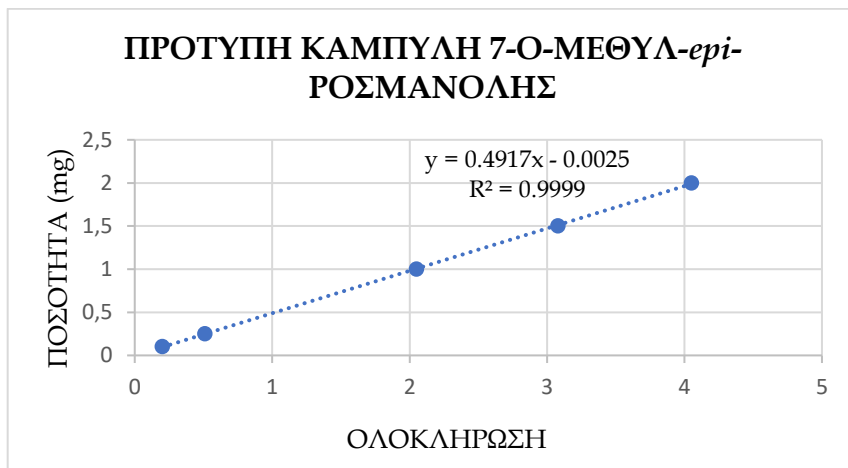
6.2 Πρότυπη καμπύλη καρνοσόλης



6.3 Πρότυπη καμπύλη 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικού οξέος



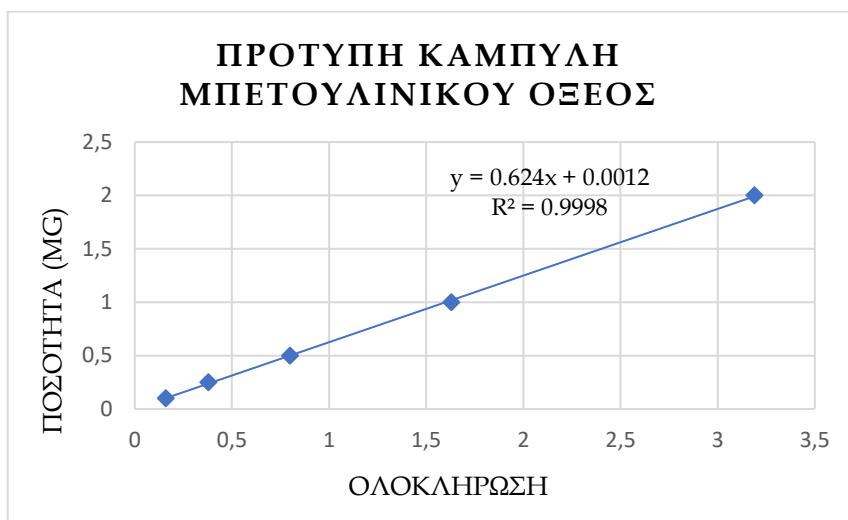
6.4 Πρότυπη καμπύλη της 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλης



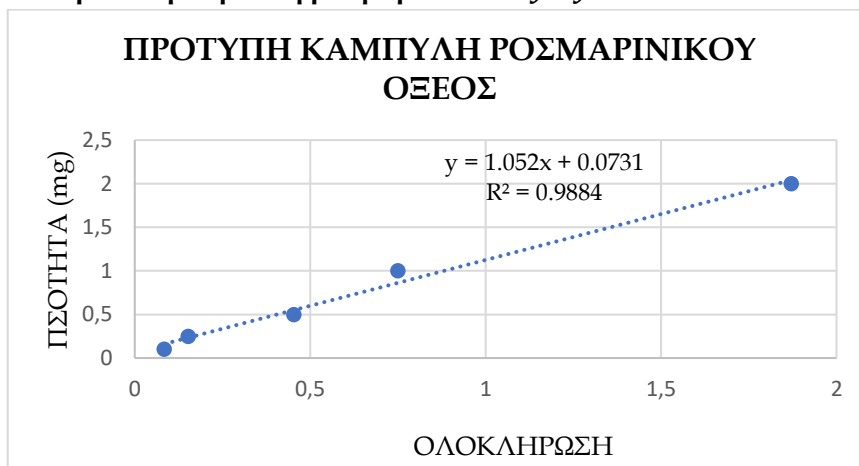
6.5 Πρότυπη καμπύλη ροσμανόλης



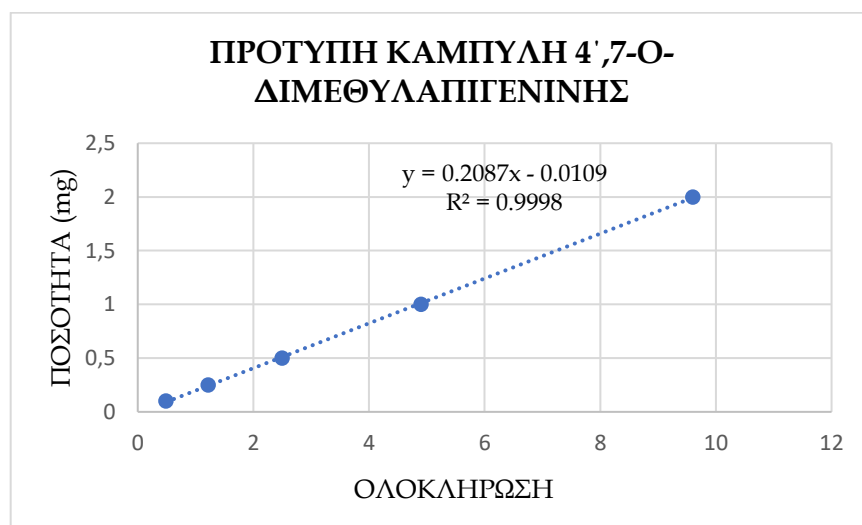
6.6 Πρότυπη καμπύλη μπετουλινικού οξέος



6.7 Πρότυπη καμπύλη ροσμαρινικού οξέος



6.8 Πρότυπη καμπύλη 4',7-Ο-διμεθυλαπιγενίνης



7. Όρια ανίχνευσης (LOD, Limit Of Detection) και όρια ποσοτικοποίησης (LOQ, Limit Of Quantification)

Ως όριο ανίχνευσης (LOD) ορίστηκε η τιμή (mg/mL) που αντιστοιχεί 3 φορές στην τιμή του θορύβου (LOD= 3 × σήμα θορύβου). Ως όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ορίστηκε η τιμή (mg/mL) που αντιστοιχεί 10 φορές στην τιμή του θορύβου (LOQ= 10 × σήμα θορύβου) (Sun et al. 2017).

Αναλυτικότερα:

- το LOD
 - 1) του CA είναι 0,04 mg/mL
 - 2) της CS είναι 0,04 mg/mL
 - 3) του 12MCA είναι 0,04 mg/mL
 - 4) της 7MER είναι 0,04 mg/mL
 - 5) της RO είναι 0,04 mg/mL
 - 6) της DMA είναι 0,05 mg/mL
 - 7) του RA είναι 0,01 mg/mL
 - 8) του BA είναι 0,04 mg/mL
- το LOQ
 - 1) του CA είναι 0,1 mg/mL
 - 2) της CS είναι 0,1 mg/mL
 - 3) του 12MCA είναι 0,1 mg/mL
 - 4) της 7MER είναι 0,1 mg/mL
 - 5) της RO είναι 0,1 mg/mL
 - 6) της DMA είναι 0,1 mg/mL
 - 7) του RA είναι 0,1 mg/mL
 - 8) του BA είναι 0,1 mg/mL

8. Συζήτηση-συμπεράσματα

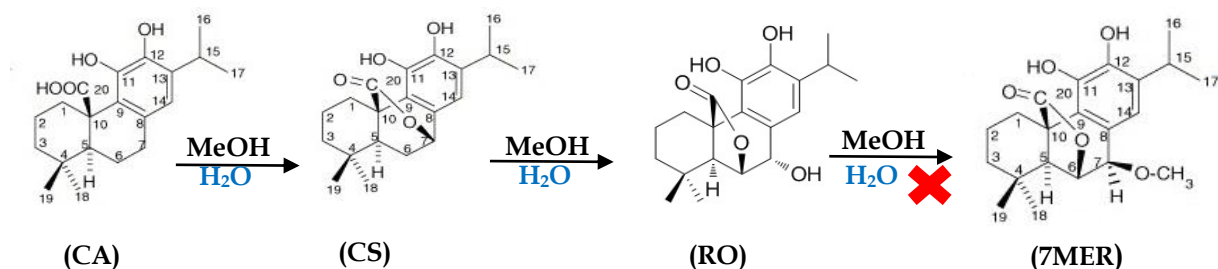
Στο παρόν κεφάλαιο του πειραματικού μέρους επιτεύχθηκε η απομόνωση:

- των **διτερπενίων αβιτανίου**: καρνοσικό οξύ (CA), καρνοσόλη (CS), 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη (7MER), ροσμανόλη (RO) και 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ (12MCA)
- των **τριτερπενίων**: μπετουλινικό οξύ (BA), ολεανολικό οξύ (OA) και ουρσολικό οξύ (UA),
- της **πολυφαινόλης** ροσμαρινικό οξύ (RA)
- και του **φλαβονοειδούς** 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνης (DMA).

Για την απομόνωση των διτερπενίων αβιτανίου χρησιμοποιήθηκαν τρία σημεια-κλειδιά:

- η αποδόμηση του καρνοσικού οξέος, της καρνοσόλης και της ροσμανόλης σε επαφή με τον πολικό διαλύτη μεθανόλη σε συνάρτηση με το χρόνο (εικόνα 43)
- η μετατροπή του καρνοσικού οξέος και της καρνοσόλης σε επαφή με το νερό σε συνάρτηση με το χρόνο και τη θερμοκρασία (εικόνα 43)
- η επιλογή της καταλληλότερης δρόγης ως πρώτης ύλης

Οι ενώσεις CA, CS, 7MER, 12MCA, RO, RA, BA, DMA, UA και OA απομονώθηκαν με καινοτόμες διαδικασίες, εύκολες στην διεξαγωγή τους, επαναλήψιμες και χαμηλού κόστους.



Εικόνα 43

Διαδρομή αποικοδόμησης του καρνοσικού οξέος στη μεθανόλη και στο ζεστό νερό: στη μεθανόλη το CA μετατρέπεται βαθμιαία σε CS, RO και 7MER, ενώ στο νερό τελικό προϊόν είναι η RO.

Βάσει έρευνας στο διαδίκτυο (www.sigmaaldrich.com) στην αγορά δεν υπάρχει η 7MER, ενώ οι υπόλοιπες ουσίες έχουν τα εξής κόστη:

- CA: 10 mg, 156 €
- CS: 5 mg, 406 €
- 12MCA: 1 mg, 279 €
- RO: 10 mg, 524 €
- RA: 10 mg, 47,20 €
- DMA: 10 mg, 297 €
- BA: 10 mg, 77,50 €
- UA: 5 mg, 102 €
- OA: 10 mg, 106 €

Για την απομόνωση μιας οποιαδήποτε ουσίας κυρίαρχο ρόλο κατέχει η πρώτη ύλη. Συνεπώς ήταν εύλογη η χρήση των αποξηραμένων φύλλων των φυτών *R. officinalis* L., *S. microphylla* Kunth και *S. fruticosa* Mill. για την απομόνωση των διτερπενίων αβιετανίου, δεδομένου ότι οι μεταβολίτες αυτοί βρίσκονται σε υψηλά ποσοστά στα προαναφερόμενα φυτά.

Μετά από συνεχή πειράματα που αφορούσαν την ανάλυση με φασματοσκοπία 1D ¹H-NMR των ξηρών μεθανολικών εκχυλισμάτων του *R. officinalis* L., που παράχθηκαν με διαφορετικούς χρόνους εμβροχής και σύμφωνα με τον τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1, εκτιμήθηκε η μεταβλητότητα του καρνοσικού οξέος και της καρνοσόλης στη μεθανόλη σε συνάρτηση με το χρόνο.

Πράγματι, παρατηρήθηκε ότι:

- το καρνοσικό οξύ υφίσταται μικρή μετατροπή και εξακολουθεί να είναι το κυρίαρχο διτερπένιο αβιετανίου, όταν τα αποξηραμένα φύλλα του *R. officinalis* L. έρχονται σε επαφή με τη μεθανόλη για 12 ακριβώς ώρες
- στις 48 ώρες επαφής δρόγη-διαλύτης το καρνοσικό οξύ μειώνεται αισθητά
- η μετατροπή του καρνοσικού οξέος γίνεται αρκετά μεγάλη όταν η διάρκεια επαφής δρόγη-διαλύτης είναι 7 ημέρες.
- δεν ανιχνεύεται καρνοσικό οξύ στο εκχύλισμα όταν ο χρόνος επαφής γίνεται 2 μήνες.
- η ποσότητα της καρνοσόλης συνεχώς αυξάνεται σε συνάρτηση με το χρόνο (από τις 12h, 48h έως τις 7 ημέρες), παράλληλα με την μείωση του καρνοσικού οξέος. Όταν η διάρκεια εμβροχής είναι 7 ημέρες, η καρνοσόλη καθίσταται η κυρίαρχη ουσία στο εκχύλισμα αναφορικά με τα διτερπένια αβιετανίου.
- πρακτικά η καρνοσόλη εξαφανίζεται όταν ο χρόνος εκχύλισης είναι 2 μήνες.

Στον πίνακα 49 αναφέρονται οι ποσότητες (mg± SD) των CA, CS, 12MCA, 7MER, RO, BA και DMA σε 1 g των ξηρών εκχυλισμάτων δεντρολίβανου που προκύπτουν μετά από εμβροχή της δρόγης για 12h, 48h, 7 ημέρες και 2 μήνες στη μεθανόλη (όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1). Ουσιαστικά στον πίνακα 49 και το γράφημα 1 περιγράφεται η σταθερότητα (ή ο ρυθμός μετατροπής) των μεταβολιτών του δεντρολίβανου που εξετάστηκαν σε συνάρτηση με το χρόνο επαφής με τη μεθανόλη. Στο πίνακα 50 και το γράφημα 2 υπάρχουν οι συνολικές ποσότητες των διτερπενίων αβιετανίου που εξετάστηκαν (CA, CS, 12MCA, 7MER και RO) στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου.

Πίνακας 49

mg± SD/g ξηρού μεθανολικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου και αφορούν τρεις μετρήσεις.

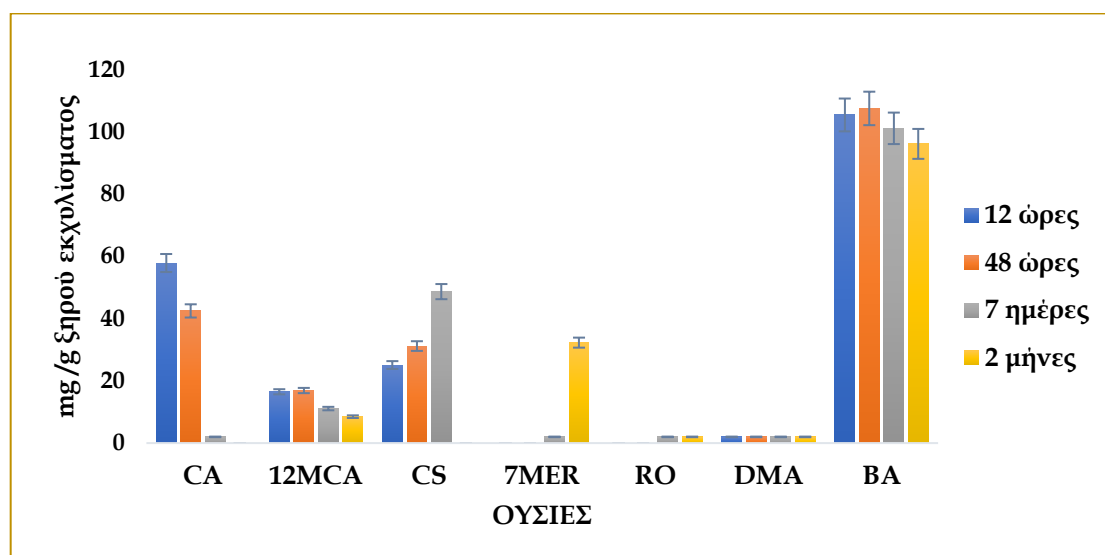
Ουσίες	12 ώρες	48 ώρες	7 μέρες	2 μήνες
CA	57,9±2,7	42,5± 3,4	tr	nd
CS	25,1±2,5	31,2±2,7	48,7±4,1	nd
12MCA	16,5±1,7	16,9±1,9	11,1±1,8	8,5±1,7
7MER	nd	nd	tr	32,3±2,9
RO	nd	nd	tr	tr
DMA	tr	tr	tr	tr
BA	105,5±23,7	107,6±18,4	101,3±13,4	96,2±8,3

tr: trace (ιχνη), (≥LOD, <LOQ)

nd: non detected (μη ανιχνεύσιμο), <LOD

Γράφημα 1

Οι ποσότητες σε mg των CA, CS, 12MCA, 7MER, RO, BA και DMA σε 1 g των ξηρών εκχυλισμάτων *Rosmarinus officinalis* L. που προκύπτουν μετά από εμβροχή της δρόγης για 12h, 48h, 7 ημέρες και 2 μήνες στη μεθανόλη.

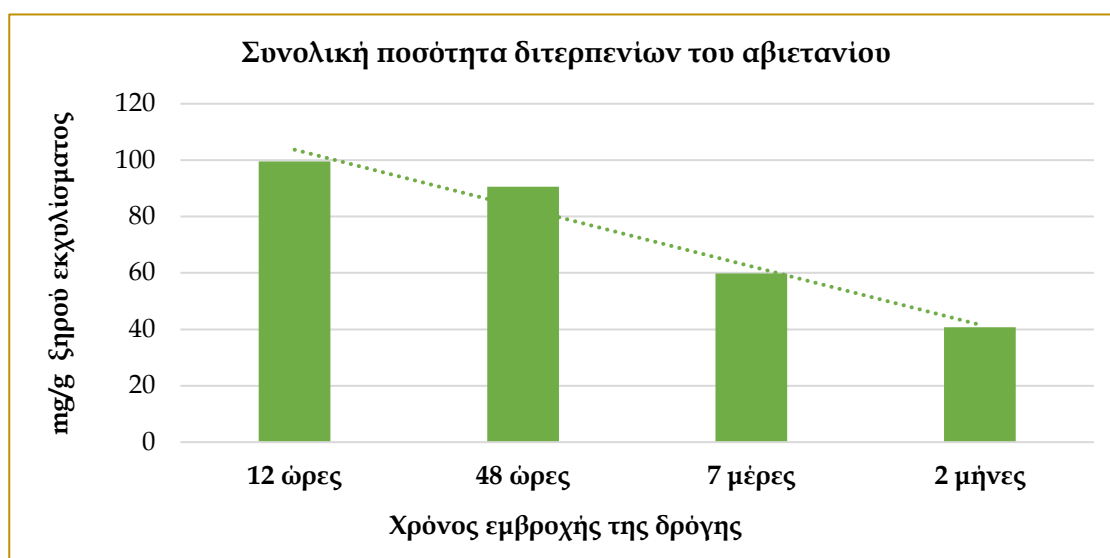
**Πίνακας 50**

Συνολική ποσότητα (mg/g) διτερπενίων αβιετανίου στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου (ως ΜΟ τριών μετρήσεων).

Χρόνος εμβροχής	12 ώρες	48 ώρες	7 μέρες	2 μήνες
Σύνολο	99,5	90,6	59,8	40,8

Γράφημα 2

Οι συνολικές ποσότητες των διτερπενίων αβιετανίου που εξετάστηκαν (CA, CS, 12MCA, 7MER και RO) στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου σε συνάρτηση με τον χρόνο εμβροχής στη μεθανόλη.



Η στρατηγική που ακολουθήθηκε στην επεξεργασία των ξηρών εκχυλισμάτων ήταν αρχικά μια απευθείας pTLC και ακολούθως μια χρωματογραφία στήλης. Στις περισσότερες περιπτώσεις με την απευθείας pTLC των ξηρών εκχυλισμάτων επιτεύχθηκε η απομόνωση του/των μεταβολιτών στόχος, με αποτέλεσμα αυτή η διαδικασία να αποτελεί έναν εύκολο και γρήγορο τρόπο για την απομόνωση των ουσιών αυτών.

Το καρνοσικό οξύ (CA), απομονώθηκε από το εκχύλισμα [ROS-12h], (παράγραφος 2.2.2). Στο [ROS-12h] το CA ήταν η κυρίαρχη ουσία από τα διτερπένια αβιετανίου που εξετάστηκαν. Ωστόσο, με την απευθείας pTLC κανονικής φάσεως (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 97: 3 v/v), δεν επιτεύχθηκε η απομόνωση του. Το CA ανευρέθηκε αλλά ως μίγμα με άλλα διτερπένια αβιετανίου. Το αποτέλεσμα αυτό αποδόθηκε κυρίως στη μετατροπή του CA στους μεταβολίτες του υπό την επίδραση της μεθανόλης ως διαλύτη έκλουσης. Η πρωτοτυπία στη μέθοδο απομόνωσης του CA έγκειται στη παρασκευή του εκχυλίσματος εργασίας, το [ROS-12h].

Οι Liu et al., (2013) μελέτησαν για 32 ώρες την σταθερότητα στη μεθανόλη του CA και της CS, σε καθαρή μορφή, και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι και οι δύο ουσίες μετατρέπονται γρήγορα σε αυτό το διαλύτη προς ροομανόλη, 7-O-μεθυλ-*epi*-ροομανόλη και 7-O-μεθυλ-ροομανόλη, που εμφανίζονται σταθερά στο διαλύτη αυτό. Πιο αναλυτικά, ξεκινώντας με καθαρό CA στη μεθανόλη παρατήρησαν ότι στις 4 ώρες εμφανίζεται η CS, στις 12 ώρες η RO, ενώ η 7MER στις 16 ώρες. Στις 20 ώρες επαφής με το διαλύτη η CS είχε τη μέγιστη τιμή της, που αντιστοιχούσε περίπου στο 60% της τιμής έναρξης του CA, ενώ το CA είχε υποστεί μείωση κατά ~95%. Τέλος, στις 32 ώρες το CA είχε καταστραφεί πλήρως, η CS εμφάνιζε μείωση 33,3% σε σχέση με την μέγιστη τιμή της, ενώ η RO και η 7MER εμφάνισαν το μέγιστο της ποσότητας τους. Η 7MER ήταν η κυρίαρχη ουσία με ποσότητα που αντιστοιχεί περίπου στο 70% της αρχικής ποσότητας του CA. Ξεκινώντας με καθαρή καρνοσόλη διαπίστωσαν ότι στις 4 ώρες εμφανίστηκαν

οι RO, 7MER και στις 12 ώρες η επιροομανόλη. Οι τελευταίες 3 ουσίες συνεχώς αυξάνονταν μέχρι τις 32 ώρες, όπου η CS υπήρχε στο 10% της αρχικής της ποσότητας. Η RO, η 7MER και η επιροομανόλη είχαν τις μέγιστες τιμές τους στις 32 ώρες, με την 7MER να είναι η κυρίαρχη ουσία με ποσότητα που αντιστοιχεί περίπου στο 60% της αρχικής ποσότητας της CS. Όπως φαίνεται από την εργασία αυτή η καρνοσόλη είναι λίγο περισσότερο σταθερή στη μεθανόλη σε σχέση με το CA.

Μέχρι στιγμής αρκετοί ερευνητές έχουν αναφέρει τον μηχανισμό αποικοδόμησης του CA στη μεθανόλη. Οι Brieskorn et al., (1969) παρατήρησαν ότι το CA μεταβάλλεται στην μεθανόλη προς CS και 7MER. Οι Schwarz et al., (1992) διαπίστωσαν ότι η ποσότητα του CA μειώνεται στη μεθανόλη γιατί μετατρέπεται σε CS, ενώ η CS με τη σειρά της μετατρέπεται περαιτέρω σε RO και 7MER. Την ίδια συμπεριφορά του CA στη μεθανόλη παρατήρησαν και οι Cuvelier et al., (1994). Οι Richheimer et al., (1996) διαπίστωσαν ότι το μεγαλύτερο μέρος του CA ή της CS εξαφανίστηκε, ενώ η 7MER σχηματίστηκε, όταν μια μικρή ποσότητα CA ή CS θερμάνθηκε με μεθανόλη στους 100 °C για 2 ώρες.

Το εκχύλισμα **[ROS-12h]** αποθηκεύτηκε σε αδιάφανο περιέκτη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 7 μήνες **[ROS-12h.7]**, με αποτέλεσμα να επέλθει μείωση της αρχικής ποσότητας του CA. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι και επί απουσίας διαλύτη το CA δεν είναι σταθερή ένωση.

Οι Zhang et al., (2012) μελέτησαν ποσοτικά την μετατροπή του CA και της CS στην αιθανόλη σε διάφορες συνθήκες φύλαξης για 12 ημέρες συνολικά. Η μελέτη αφορούσε το CA και την CS, είτε ως καθαρές ουσίες, είτε ευρισκόμενες σε εκχύλισμα δεντρολίβανου. Η πιο ευαίσθητη ουσία αποδείχθηκε ότι ήταν το CA. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι στις ίδιες συνθήκες φύλαξης οι ουσίες CA, CS, εμφάνιζαν μικρότερη αποδόμηση όταν βρίσκονταν στο αιθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου από το όταν ήταν ως διάλυμα καθαρών ουσιών στην αιθανόλη.

Η καρνοσόλη (CS) απομονώθηκε από α εκχυλίσματα **[ROS-7d]** και **[ROS-12h]** όπως περιγράφηκε (παραγράφους 2.1.2 και 2.2.2). Αρχικά πραγματοποιήθηκε απευθείας pTLC (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v), και στα δύο εκχυλίσματα, με αποτέλεσμα την άμεση απομόνωση της καρνοσόλης. Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.1.2 η καρνοσόλη απομονώθηκε από το **[ROS-7d]** και χρωματογραφία στήλης. Αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι η καρνοσόλη που προέκυψε από την απευθείας pTLC στο **[ROS-7d]** ήταν ίδιας ή και μεγαλύτερης καθαρότητας από αυτή που απομονώθηκε μετά από τη χρωματογραφία στήλης και περαιτέρω καθαρισμό (pTLC). Η διαφορά ήταν στο βάρος της κάθε ζώνης δηλαδή στην απόδοση της pTLC. Πράγματι, με την pTLC μετά από χρωματογραφία στήλης η ποσότητα της καρνοσόλης ήταν μεγαλύτερη, όπως μεγαλύτερο είναι το κόστος αλλά και ο χρόνος που απαιτείται.

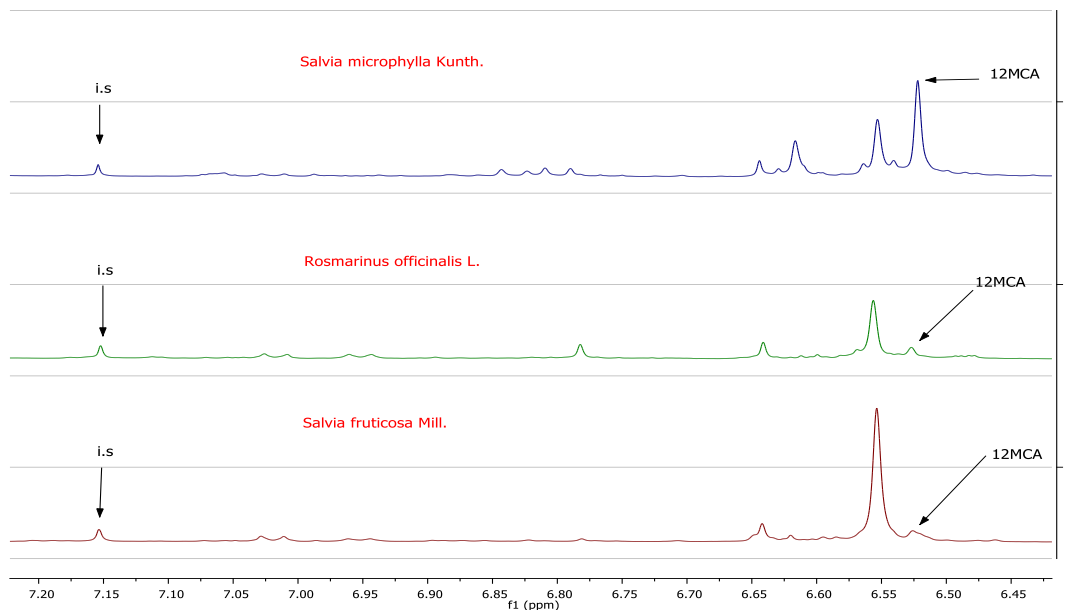
Η καρνοσόλη δεν είναι ιδιαίτερα σταθερή ουσία όταν διαλύεται στη μεθανόλη. Όπως διαπιστώθηκε από τα εκχυλίσματα **[ROS-12h]**, **[ROS-48h]**, **[ROS-7d]**, και **[ROS-2m]**, η καρνοσόλη στις 7 ημέρες εμβροχής φτάνει στην μέγιστη ποσότητα της, και μετά, όσο αυξάνεται ο χρόνος επαφής της δρόγης με μεθανόλης τόσο μειώνεται η ποσότητα της καρνοσόλης και αυξάνεται αυτή της ροομανόλης και της 7-O-μεθυλ-*epi*-ροομανόλης. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι στο ξηρό εκχύλισμα των φύλλων δεντρολίβανου **[ROS-7d]**, η καρνοσόλη εμφανίζει ιδιαίτερη σταθερότητα και μπορεί

να διατηρηθεί για αρκετά χρόνια, τουλάχιστον για πέντε, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε ερμητικά κλεισμένο περιέκτη που προστατεύει από το φως. Όπως έχει ήδη αναφερθεί (2.1.2), πείραμα σύγκρισης της καρνοσόλης στο ίδιο **[ROS-7d]** που μετρήθηκε 2 φορές με χρονική απόσταση μεταξύ των δύο μετρήσεων τα 6 χρόνια, έδειξε ότι η ποσοτική διαφορά τους ήταν αμελητέα. Συνεπάγεται λοιπόν ότι το εκχύλισμα **[ROS-7d]** αποτελεί ένα άριστο υλικό για την άμεση απομόνωση καρνοσόλης. Πρόκειται για μια μέθοδο απομόνωσης εύκολης εφαρμογής, μικρού κόστους, υψηλής απόδοσης και επαναληψιμότητας και απόλυτα πρωτότυπη, δεδομένου ότι δεν έχει αναφερθεί παρόμοια διαδικασία στη βιβλιογραφία για την CS.

Όσον αφορά ανάμεσα στα διτερπένια αβιετανίου, το 12MCA δεν ήταν ποτέ ο κυρίαρχος μεταβολίτης ποσοτικά στα εκχυλίσματα των αποξηραμένων φύλλων *R. officinalis* L. και *S. fruticosa* Mill. Έτσι, και ενώ το 12MCA είχε ήδη απομονωθεί μετά από χρωματογραφική επεξεργασία από τα εκχυλίσματα **[ROS-12h.7]** και **[ROS-12h]**, (2.2.2 και 2.3.1 αντίστοιχα), έγινε αλλαγή της πρώτης ύλης με τη χρήση των αποξηραμένων φύλλων της *S. microphylla* Kunth. Πράγματι, στο ξηρό εκχύλισμα της *S. microphylla* Kunth. **[SM]** έγινε φασματοσκοπική μελέτη 1D ¹H-NMR, (CDCl₃) που κατέληξε στην ανίχνευση των διτερπενίων αβιετανίου: καρνοσόλη, καρνοσικό οξύ, και 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ σε αναλογία 0,11: 0,57: 1,0 αντίστοιχα, ενώ η 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη και η ροσμανόλη δεν ταυτοποιήθηκαν. Σε αυτή την πρώτη ύλη, εμφανίστηκε ως κύριος μεταβολίτης το 12MCA, με αποτέλεσμα να επιτευχθεί η απομόνωση του με μεγαλύτερη απόδοση και με πιο εύκολο τρόπο, κάνοντας απευθείας μια pTLC ή χρωματογραφία ανοικτής στήλης στο εκχύλισμα **[SM]**, (παράγραφος 3). Ενδεικτικά, μέσω της υγρής χρωματογραφίας, από 1,23 g **[SM]**, που αντιστοιχούν σε 9,36 g αποξηραμένων φύλλων, παραλήφθηκαν 35,1 mg 12MCA (αναλογικά σε 15 g δρόγης αναλογούν περίπου 56,2 mg 12MCA).

Οι Djarmati Z et al (1993), απομόνωσαν 12MCA από τα φύλλα της *S. officinalis* L. Ξεκινώντας από 9,35 Kg υπέργειου τμήματος ανθισμένου φυτού, έλαβαν 2,179 g 12MCA. Κάνοντας την αναλογία, προς 15,0 g δρόγης προκύπτουν μόνον ~3,5 mg 12MCA. Οι Aydogmus et al. (2006), απομόνωσαν 12MCA από ρίζες και κλαδιά της *S. microphylla* Kunth.

Η καταλληλότητα της *S. microphylla* Kunth. ως αρχικό υλικό για την απομόνωση του 12MCA φαίνεται και από το παρακάτω πείραμα: 1,0 g τεμαχισμένων αποξηραμένων φύλλων από *S. fruticosa* Mill., *R. officinalis* L. και *S. microphylla* Kunth. εκχυλίστηκαν με τη διαδικασία της εμβροχής με 30 mL μεθανόλης, σε λουτρό υπερήχων (ultrasonic bath) για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως έγινε διήθηση με ηθμό χάρτου, συμπύκνωση μέχρι ξηρού και λήψη φασμάτων 1D ¹H-NMR (CDCl₃) για κάθε ένα φυτικό εκχύλισμα. (εικόνα 44). Η ανάλυση των φασμάτων έδειξε ότι η *S. microphylla* Kunth. είναι καταλληλότερη πρώτη ύλη για την απομόνωση του 12MCA συγκριτικά με τα *S. fruticosa* Mill. και *R. officinalis* L. Τα εξετασθέντα φυτά συλλέχθηκαν την ίδια μέρα και ώρα από το βοτανικό κήπο Διομήδους του ΕΚΠΑ.



Εικόνα 44

Φάσματα 1D $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) όπου διακρίνονται οι απλές κορυφές στα 6,53 ppm του 12MCA στο μεθανολικό εκχύλισμα της *S. fruticosa* Mill., *R. officinalis* L. και *S. microphylla* Kunth. (i.s=εσωτερικό πρότυπο).

Σε αντίθεση με την μεγάλη αστάθεια που παρουσιάζουν το καρνοσικό οξύ και η καρνοσόλη σε πολικούς διαλύτες, το 12MCA έδειξε ότι είναι αρκετά σταθερό σε σχέση με τις προαναφερόμενες ουσίες. Στο εκχύλισμα *R. officinalis* L. που προέκυψε με εμβροχή της δρόγης για 2 μήνες στη μεθανόλη [ROS-2m], δεν υπήρχε καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη ενώ η ποσότητα του 12MCA, αν και μειωμένη, ήταν σε κοντινά επίπεδα με αυτά που υπήρχαν στο [ROS-7d]. Η μεγαλύτερη σταθερότητα του 12MCA στη μεθανόλη αποδείχθηκε και με την παρουσία του στο εκχύλισμα [ROS-1y], όπου τα αποξηραμένα φύλλα δεντρολίβανου έμειναν στο διαλύτη 12 μήνες.

Πραγματοποιήθηκε και το εξής πείραμα: 2 g αποξηραμένων φύλλων *R. officinalis* L. εκχυλίστηκαν με οξικό αιθυλεστέρα με αναλογία δρόγη: διαλύτης= 1: 10 w/v, για 1 h σε υδατόλουτρο υπερήχων. Άλλη ποσότητα 2 g αποξηραμένων φύλλων της ίδιας παρτίδας εκχυλίστηκαν για 1 h με MeOH. Τα συμπυκνωμένα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με φασματοσκοπία 1D $^1\text{H-NMR}$. Το πηλίκιο των εμβαδών E_{CA}/E_{CS} που ορίζουν οι κορυφές στα 6,56 ppm (H-14, CA) και 6,64 ppm (H-14, CS) ήταν μεγαλύτερο (1,00/0,07) στο εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα σε σχέση με αυτή (1,00/0,14) στο μεθανολικό εκχύλισμα. Είναι εμφανές ότι η μετατροπή του CA σε CS εκδηλώνεται περισσότερο στη μεθανόλη από ότι στον οξικό αιθυλεστέρα. Το πείραμα έγινε εις διπλούν για το κάθε εκχύλισμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο πείραμα αυτό η ποσότητα του 12MCA ήταν η ίδια και στα δύο εκχυλίσματα, συνηγορώντας στο γεγονός ότι αφενός το CA δεν μετατρέπεται υπό την επίδραση των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν σε 12MCA, αφετέρου φαίνεται ότι η σταθερότητα και η απόδοση της εκχύλισης για το 12MCA είναι ίδια στις 2 h είτε με τη μεθανόλη είτε με τον οξικό αιθυλεστέρα.

Το 12MCA φαίνεται πως είναι αρκετά σταθερό κατά την αποθήκευση των ξηρών εκχυλισμάτων του δεντρολίβανου αφού η παραμονή του εκχυλίσματος [ROS-12h] για 7 μήνες, σε συνθήκες ηρεμίας και προστασίας από το φως, οδήγησε στο εκχύλισμα [ROS-12h.7], όπου η ποσότητα του καρνοσικού οξέος είχε μειωθεί αλλά του 12MCA είχε παραμείνει πρακτικά αμετάβλητη.

Η 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη απομονώθηκε από τα εκχυλίσματα [ROS-7d] και [ROS-2m] (παράγραφοι 2.1.1 και 2.4.1). Το πρόβλημα με την απομόνωση της 7MER ήταν η χαμηλή περιεκτικότητα της στο ξηρό εκχύλισμα *R. officinalis* L. [ROS-7d] και η απουσία της στα [ROS-12h] και [ROS-48h]. Η λύση του προβλήματος, και σε αυτή την περίπτωση, ήταν ο χρόνος εκχύλισης με τη μεθανόλη. Πράγματι, όπως φάνηκε από την ανάλυση των φασμάτων 1D ¹H-NMR (CDCl₃) των [ROS-12h], [ROS-48h], [ROS-7d] και [ROS-2m], ως προς τα διτερπένια αβιετανίου που εξετάστηκαν, διαπιστώθηκε ότι στα εκχυλίσματα [ROS-12h] και [ROS-48h] δεν υπήρχε πρακτικά 7MER, η οποία εμφανίστηκε σε μικρές ποσότητες στο εκχύλισμα [ROS-7d] και έγινε ποσοτικά η κυρίαρχη ουσία στο [ROS-2m]. Λογικό και επόμενο να χρησιμοποιηθεί το [ROS-2m] ως βασική πρώτη ύλη για την απομόνωση της 7MER, που πραγματοποιήθηκε με άμεση pTLC στο εκχύλισμα, αλλά και με χρωματογραφία στήλης μετά από περαιτέρω παρασκευαστική χρωματογραφία. Είναι πολύ εύχρηστη η ύπαρξη ενός εκχυλίσματος, στην περίπτωσή μας [ROS-2m], που μπορεί ανά πάσα στιγμή να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση της 7MER. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο [ROS-2m] η 7MER είναι πολύ σταθερή όταν το ξηρό εκχύλισμα αποθηκευτεί προστατευόμενο από το φως, ακόμα και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το ίδιο με τα προαναφερόμενα μπορεί να λεχθεί για το εκχύλισμα [EAB7] (παράγραφος 2.1.1). Η διαφορά είναι ότι για το [EAB7] είναι απαραίτητη η αποθήκευση του σε χαμηλή θερμοκρασία (0° <) και ότι δεν είναι τόσο πλούσια πηγή της 7MER όσο είναι το [ROS-2m], που αποτελεί το εκχύλισμα επιλογής για αυτό το σκοπό. Στη περίπτωση του [EAB7] χρησιμοποιήθηκε pTLC αντίστροφης φάσης, όπου μέσω της ίδιας διαδικασίας επιτεύχθηκε και η απομόνωση του ροσμαρινικού οξέος και της ροσμανόλης ενώ σε πείραμα με pTLC κανονικής φάσης, (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v) δεν επιτεύχθηκε η απομόνωση 7MER από το [EAB7]. Πρόκειται για μια μέθοδο απομόνωσης εύκολης εφαρμογής, μικρού κόστους, με υψηλή απόδοση και επαναληψιμότητα. Δεν έχει αναφερθεί ξανά παρόμοια διαδικασία απομόνωσης στη βιβλιογραφία, με καμία από τις 2 διαφορετικές που ακολουθήθηκαν και περιγράφηκαν στην παρούσα διατριβή για την 7MER.

Μια άλλη πολύ σημαντική παράμετρος, που καθιστά ακόμα πιο ενδιαφέρουσα ουσία την 7MER, είναι η σταθερότητα της στη πολική μεθανόλη. Πράγματι, όπως αναφέρθηκε και στη περίπτωση του 12MCA, στο εκχύλισμα [ROS-1y] η 7MER εξακολουθούσε να υπάρχει, και μάλιστα ως κυρίαρχο ποσοτικά διτερπένιο αβιετανίου (ποσοτική αναλογία 7MER: 12MCA: RO= 1,0: 0,38: 0,04). Η σταθερότητα της 7MER στην μεθανόλη ήταν επίσης σημαντική για την απομόνωση της από το [ROS-2m] με απευθείας pTLC κανονικής φάσης (CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v. Για την καλύτερη κατανόηση αυτού, αρκεί να αναφερθεί η ευκολία με την οποία το καρνοσικό οξύ μετατρέπεται όταν έρχεται σε επαφή με τη μεθανόλη, ακόμα και κατά τη διάρκεια μιας pTLC όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.2.2.

Ένα άλλο συμπέρασμα που προκύπτει από τα δεδομένα του πίνακα 49 είναι ότι η 7MER δεν φαίνεται να υπάρχει αρχικά στη δρόγη, τουναντίον, παράγεται από το CA υπό την επίδραση της μεθανόλης με ενδιάμεσα προϊόντα την CS και την RO.

Η σταθερότητα μια ουσίας με φαρμακολογική δράση αποτελεί ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό για την εν δυνάμει χρήση της ως παράγοντα περαιτέρω αξιοποίησης και δυνητικά φαρμακευτικών εφαρμογών.

Η ροομανόλη απομονώθηκε από τα εκχυλίσματα [ROS-7d] και [SF-d] (παράγραφοι 2.1.1 και 4 αντίστοιχα). Τα βασικά προβλήματα με την απομόνωση της ροομανόλης ήταν:

- η χαμηλή περιεκτικότητα της στα ξηρά εκχυλίσματα του *R. officinalis* L. που χρησιμοποιήθηκαν,
- η μετατροπή της σε 7MER παρουσία μεθανόλης.

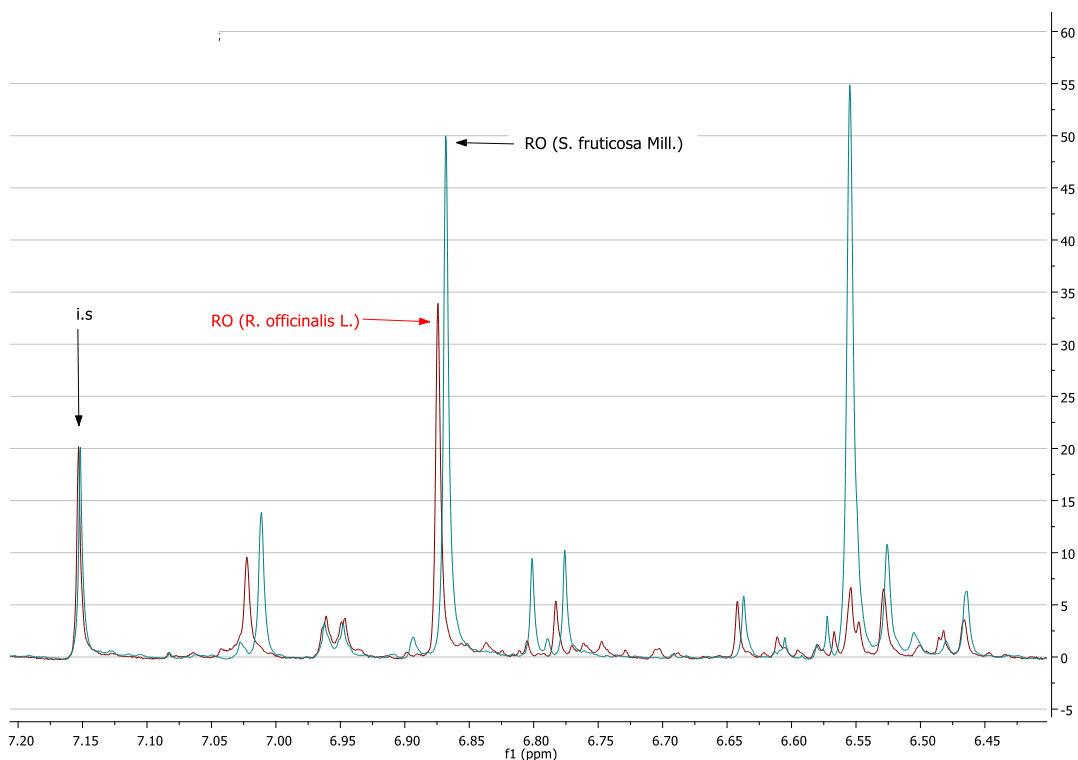
Τα προβλήματα αυτά ξεπεράστηκαν με τη παρασκευή ξηρού εκχυλίσματος της *S. fruticosa* [SF-d], μέσω αρχικής αφέψησης σε αναλογία αποξηραμένα φύλλα *S. fruticosa*: Νερό= 1,5: 150 w/v για 10 min (παράγραφος 4). Να τονισθεί ότι η RO παρουσία μεθανόλης μπορεί να μετατραπεί σε 7MER, ενώ παρουσία ύδατος η μετατροπή της σε 7MER φαίνεται πως δεν υφίσταται. Πράγματι η φασματοσκοπική ανάλυση 1D ¹H-NMR [SF-d] έδειξε ότι αναλογία των διτερπενίων αβιετανίου ήταν 12MCA: CA: CS: RO = 0,16: 1,0: 0,06: 0,77, δηλαδή η RO είχε γίνει η δεύτερη σημαντική ποσοτικά ουσία μετά το CA, ενώ η 7MER απουσίαζε. Συνεπώς το [SF-d] ήταν όντως το καταλληλότερο ξηρό εκχύλισμα για την απομόνωση ροομανόλης.

Η μέθοδος απομόνωσης της RO ήταν εύκολης εφαρμογής, μικρού κόστους, με υψηλή απόδοση και επαναληψιμότητα. Δεν έχει αναφερθεί ξανά παρόμοια μέθοδος απομόνωσης στη βιβλιογραφία, με καμία από τις 2 διαφορετικές που εφαρμόστηκαν και περιγράφηκαν στην παρούσα διατριβή για την RO.

Για την επιλογή του καταλληλότερου φυτού που θα μπορούσε χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση RO, έγινε πείραμα και με αποξηραμένα φύλλα *R. officinalis* L.:

- 2 g φύλλων μετά από τεμαχισμό σε πολύ μικρά κομμάτια, εκχυλίστηκαν μέσω αφέψησης με 150 mL ύδατος για 10min. Ακολούθησε διήθηση του αφεψήματος (ηθμός χάρτου) και ακολούθησε εκχύλιση με CH₂Cl₂. Παραλήφθηκε και συμποκνώθηκε η οργανική φάση. Στο στερεό υπόλειμμα λήφθηκε φάσμα 1D ¹H-NMR (CDCl₃). Η ανάλυση του φάσματος έδειξε ότι η RO ήταν η κυρίαρχη ουσία από τα διτερπένια αβιετανίου που μελετώνται. Ωστόσο η ποσοτική σύγκριση αυτού του αποτελέσματος με τις τιμές της RO στο [SF-d] (με αναλογία δρόγης: ύδατος= 1,5: 150 g/mL) έδειξε ότι η ποσότητα της RO στο [SF-d] ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτές που προκύπτουν ξεκινώντας με αποξηραμένα φύλλα *R. officinalis* L. (εικόνα 45).

Συνεπώς, για την απομόνωση της RO προτιμήθηκαν τα φύλλα της *S. fruticosa* Mill.



Εικόνα 45

Σύγκριση φασμάτων 1D $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) αφεψημάτων *R. officinalis* L. (κόκκινο χρώμα) και *S. fruticosa* Mill. (πράσινο χρώμα). Με σήμανση η κορυφή στα 6,87 ppm που αντιστοιχεί στη RO. Είναι εμφανώς μεγαλύτερη η ποσότητα της RO στο αφέψημα της *S. fruticosa* Mill. Να σημειωθεί ότι το αφέψημα *R. officinalis* L. έχει προκύψει από 2 g δρόγης, ενώ της *S. fruticosa* Mill. από 1,5 g δρόγης.

Από τις αναλογίες της RO στα εκχυλίσματα **[ROS-48h]**, **[ROS-12h]**, **[ROS-7d]**, **[ROS-2m]**, **[ROS-1y]**, και **[SF-d]**, φαίνεται ότι η ροσμανόλη προκύπτει από τον μετατροπή της CS παρουσία πολικού διαλύτη, όπως της μεθανόλης και του νερού. Γίνεται κατανοητό ότι για την απομόνωση της RO το σημείο κλειδί ήταν η χρήση του ύδατος ως διαλύτη εκχύλισης, η υψηλή θερμοκρασία και η διάρκεια εκχύλισης-αφέψησης.

Η ροσμανόλη έδειξε ότι παρουσία μεθανόλης, είναι πιο σταθερή ουσία από το CA και την CS γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη παρουσία της στα εκχυλίσματα **[ROS-2m]** και **[ROS-1y]**. Ωστόσο βάσει των ίδιων πειραμάτων δεν είναι τόσο σταθερή όσο το 12MCA και η 7MER.

Το μπετουλινικό οξύ απομονώθηκε από τα εκχυλίσματα **[ROS-7d]** και **[ROS-12h]** (παράγραφοι 2.1.2 και 2.2.2 αντίστοιχα), με δύο διαφορετικούς τρόπους. Ο 1^{ος} αφορούσε απευθείας pTLC στο **[ROS-7d]**, ενώ ο 2^{ος} χρωματογραφία στήλης στα **[ROS-7d]** και **[ROS-12h]** με χρήση διαφόρων αναλογιών Chex και EtOAc. Η πρωτοτυπία έγκειται στην άφεση των αρχικών κλασμάτων, χρωματογραφίας στήλης, για 48 ώρες, διότι με αυτό τον τρόπο επιτεύχθηκε δημιουργία και καθίζηση των κρυστάλλων του μπετουλινικού οξέος σε συγκεκριμένη αναλογία Chex και EtOAc. Πρόκειται για μια μέθοδος απομόνωσης εύκολης εφαρμογής, μικρού κόστους, με υψηλή απόδοση και επαναληψιμότητα και χωρίς την ανάγκη περαιτέρω χρωματογραφικών διαδικασιών.

Παρόλη την ευρεία βιβλιογραφία που υπάρχει για το μπετουλινικό οξύ, δεν έχει αναφερθεί ξανά παρόμοια μέθοδος απομόνωσης.

Το ροσμαρινικό οξύ απομονώθηκε από το εκχυλίσμα [ROS-7d], (παράγραφο 2.1.1), μέσω απευθείας pTLC αντίστροφης φάσης (CH₃OH: H₂O= 75: 25 v/v) στο διήθημα [ΞΔΒ7]. Η απόδοση της μεθόδου ήταν υψηλή. Το [ΞΔΒ7] αποθηκεύτηκε σε χαμηλή θερμοκρασία ως πηγή για την άμεση και εύκολη απομόνωση του RA.

Όλα τα μεθανολικά ξηρά εκχυλίσματα του *R. officinalis* L. είχαν κοινή μέθοδο παρασκευής, με τη μόνη διαφορά το χρόνο εμβροχής της δρόγης στη μεθανόλη. Η διαδικασία ήταν εξαιρετικά απλή:

- εμβροχή για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα,
- διήθηση και προσθήκη στο διήθημα συγκεκριμένης ποσότητας ύδατος που έχει ως αποτέλεσμα την καταβύθιση των δυσδιάλυτων ουσιών σε αυτή την αναλογία μεθανόλης/ύδατος
- διήθηση και εξάτμιση του διαλύτη.

Κατόπιν, σε όλα τα εκχυλίσματα **ROS-12h**, **ROS-48h**, **ROS-7d**, **ROS-2m** και **ROS-1y**, λήφθηκαν φάσματα 1D ¹H-NMR τόσο για την ποσοτική όσο και για την ποιοτική τους ανάλυση. Έγιναν διάφορα πειράματα με παραλλαγές αυτής της μεθόδου. Ωστόσο κανένα από τα ξηρά εκχυλίσματα που προέκυψαν δεν υπερίσχυαν ποιοτικά ή ποσοτικά με τα προαναφερόμενα ROS εκχυλίσματα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ_ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

Διερεύνηση του *Rosmarinus officinalis* L. και επιλεγμένων μεταβολιτών του ως προς την συμπεριφορά τους έναντι του υποδοχέα αρυλοϋδρογονανθράκων AhR (Aryl hydrocarbon Receptor)

“Μια πολυπαραγοντική νόσος, θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί καλύτερα με ένα πολυπαραγοντικό φάρμακο παρά με ένα φάρμακο που έχει μεγάλη εξειδίκευση για έναν μόνο μοριακό στόχο. Ένα φυσικό προϊόν μπορεί να δράσει με πλειοτροπικό τρόπο, αντιπροσωπεύοντας μια καλή πολυπαραγοντική θεραπεία. Επιπλέον, ένα φυσικό προϊόν θα μπορούσε να «σεβαστεί» καλύτερα την ομοιόσταση του οργανισμού και να είναι λιγότερο τοξικό ή εντελώς μη τοξικό.”

1. Εισαγωγή

Τα τελευταία 15 χρόνια έχουν αυξηθεί κατακόρυφα οι έρευνες που αφορούν τον υποδοχέα αρυλοϋδρογονανθράκων (AhR, Aryl hydrocarbon Receptor) ή υποδοχέα διοξινών (Dioxin Receptor). Πράγματι, στο παρελθόν ο υποδοχέας αυτός συναντιόταν μόνο σε βιβλία τοξικολογίας, δεδομένου ότι δεν υπήρχε φαρμακολογικό-θεραπευτικό ενδιαφέρον, παρά μόνο η μελέτη του μηχανισμού με τον οποίο τοξικοί υδρογονάνθρακες προκαλούσαν βλάβη στο κύτταρο και κατ' επέκταση στον οργανισμό. Ωστόσο, με το πέρασ των ετών, αποκαλύφθηκε ο ρόλος του AhR και σε άλλες περιπτώσεις. Ανακαλύφθηκε ότι ο AhR είναι αφενός απαραίτητος για την διεκπεραίωση διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών του οργανισμού, αφετέρου δε εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία ενός ευρέως φάσματος νοσηρών καταστάσεων του ανθρώπου. Η έρευνα όμως δεν σταμάτησε εκεί αλλά συνεχίστηκε για την ανακάλυψη μορίων, φαρμακευτικών παραγόντων, που θα μπορούσαν να επηρεάσουν, να ρυθμίσουν, μέσω αναστολής ή ενεργοποίησης τον AhR. Οι μελέτες απέδωσαν και πρόσφατα έχουν κυκλοφορήσει στο εμπόριο, και συνεπώς στη διάθεση κάθε ιατρού και θεραπευόμενου, ιδιοσκευάσματα με μόρια που οφείλουν την δράση τους στη ικανότητα τους να επιδρούν με τον AhR. Ωστόσο η έρευνα συνεχίζεται, όχι μόνο για να ανακαλυφθούν νέοι παράγοντες δραστικοί έναντι του AhR με άλλα χαρακτηριστικά και για άλλες παθήσεις, αλλά και για την αποσαφήνιση του ρόλου του AhR σε συγκεκριμένες νόσους. Για παράδειγμα υπάρχουν ακόμη και σήμερα αρκετές διχογνωμίες μεταξύ των επιστημόνων που αφορούν τον ρόλο του AhR στη φλεγμονή.

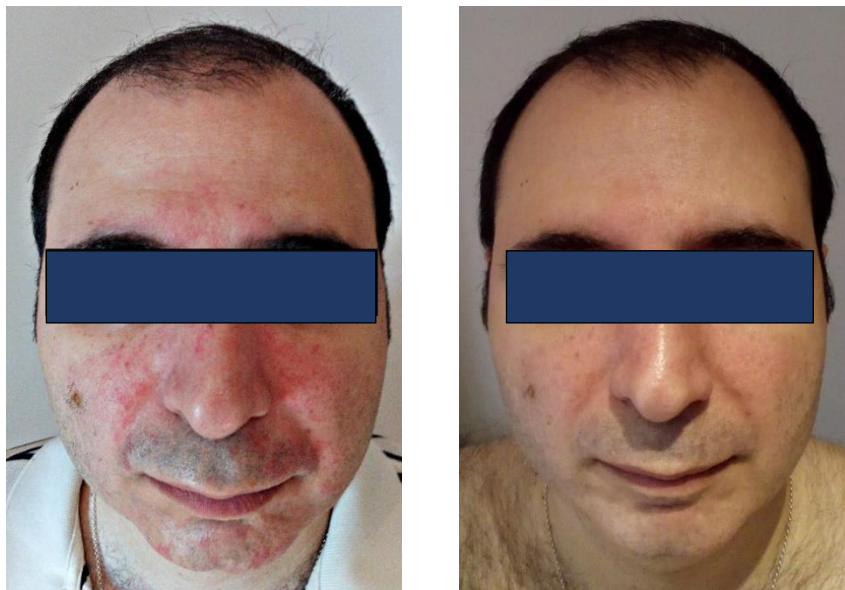
Η ανακάλυψη νέων μορίων, που θα είναι σε θέση να ρυθμίσουν την δράση του AhR, θα προσφέρει πολλά τόσο στη θεραπευτική αντιμετώπιση και την πρόληψη διαφόρων ασθενειών όσο και στη αποκρυπτογράφηση των λεπτομερειών που διέπουν την λειτουργία του AhR. Είναι γνωστό ότι πολλές φορές μέσω της ανακάλυψης ενός μορίου-πρόσδεμα σε συγκεκριμένο υποδοχέα, ανακαλύπτονται πληροφορίες για τον υποδοχέα αυτό, ακόμα και η ύπαρξη του. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της μορφίνης και των υποδοχέων μ των ενδορφινών.

Οι Gaitanis et al., (2008) και οι Magiatis et al., (2013) μελετώντας ασθενείς με σμηγματορροϊκή δερματίτιδα (SD), μια χρόνια φλεγμονώδη δερματοπάθεια όπου η *Malassezia spp.* παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση της, διαπίστωσαν ότι:

- στους ασθενείς με SD, η FICZ (6-φορμύλινδόλο[3,2b]καρβαζόλη), η ιντιρουμπίνη (IND) και η πιτυριαζεπίνη (PZ) παράγονται από τη *Malassezia furfur* (προηγούμενα *Pityrosporum ovale*) σε υψηλότερες ποσότητες στις πάσχουσες δερματικές περιοχές από ό,τι στο υγιές δέρμα
- η FICZ, η IND και η PZ συμπεριφέρονται ως ισχυροί αγωνιστές του AhR.

Αποτελέσματα σε ασθενείς έδειξαν ότι το εκχύλισμα των αποξηραμένων φύλλων του *Rosmarinus officinalis* L. μπορεί να προκαλέσει ύφεση διαφόρων φλεγμονωδών ασθενειών του δέρματος (πχ. σμηγματορροϊκής δερματίτιδας). Πράγματι, η τοπική εφαρμογή κατάλληλης φαρμακευτικής μορφής που περιέχει εκχύλισμα φύλλων *Rosmarinus officinalis* L., σε ασθενείς με σμηγματορροϊκή δερματίτιδα στο πρόσωπο και/ή στο τριχωτό της κεφαλής, έδειξε ότι επιφέρει την κλινική ίαση αυτής της

δερματίτιδας, σε σύντομο χρονικό διάστημα και χωρίς παρενέργειες (Kallimanis 2017).



Εικόνα 46

Ασθενής με SD προσώπου. Αριστερά η κλινική εικόνα πριν την θεραπεία (χρόνος: 0) και δεξιά μετά την πλήρη ίαση (χρόνος: 7 ημέρες).

Αφενός μεν ο ρόλος του μύκητα *Malassezia* και των ουσιών που παράγει στην σμηγματορροϊκή δερματίτιδα, αφετέρου δε η θεραπευτική δράση του εκχυλίσματος *Rosmarinus officinalis* L. έναντι αυτής της δερματοπάθειας, οδήγησαν στο να διερευνηθεί:

- εάν υπάρχει συσχέτιση, και τι είδους, μεταξύ του εκχυλίσματος *Rosmarinus officinalis* L. και των κύριων συστατικών του με τον AhR
- εάν το εκχύλισμα φύλλων *Rosmarinus officinalis* L. ανταγωνίζεται τη δράση:
 - i. της TCDD, την πρότυπη ουσία περιβαλλοντικών ρύπων, την πιο κοινή διοξίνη και ισχυρό παράγοντα βλάβης ιστών (Linden et al. 2010)
 - ii. της FICZ που παράγεται από τον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και από τον μύκητα του γένους *Malassezia*
 - iii. της ιντιρουμπίνης και της πιτυριαζεπίνης που παράγονται από μύκητα του γένους *Malassezia*

Για το σκοπό αυτό στην παρούσα διατριβή:

- A) ερευνήθηκε *in vitro* αν τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα *R. officinalis* L. μπορούν να επιδράσουν στην οδό σηματοδότησης του AhR, δηλαδή αν έχουν την ικανότητα να επάγουν ή να αναστέλλουν την γονιδιακή έκφραση που εξαρτάται από τον AhR. Το πείραμα έγινε σε ανασυνδυασμένα κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος (HG2L7.5c1) με τη μέθοδο AhR-Responsive Luciferase Reporter Gene Analysis, απουσίας και παρουσίας της TCDD.
- B) μελετήθηκε *in vitro* αν τα εκχυλίσματα *R. officinalis* L. μπορούν να αναστείλουν τον εξαρτώμενο από τη TCDD μετασχηματισμό του AhR και την ακόλουθη

σύνδεση του στο DNA. Για το σκοπό αυτό ηπατικά κυττοσώλια ινδικού χοιριδίου επώαστηκαν με τη TCDD, απουσία ή παρουσία δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων εκάστου εκχυλίσματος δεντρολίβανου (10 και 100 ppm) και εξετάστηκε η επίδρασή τους στην επαγόμενη από τη TCDD σύνδεση του AhR στο DNA με την μέθοδο GRA (Gel Retardation Assay).

- Γ) διερευνήθηκε *in vitro* σε ηπατικά κυττοσώλια ινδικού χοιριδίου η δράση πέντε διαφορετικών εκχυλισμάτων φύλλων *Rosmarinus officinalis* L. έναντι του AhR, με ταυτόχρονη παρουσία της [³H] TCDD με τη μέθοδο Hydroxyapatite AhR Ligand Binding Assay.
- Δ) μελετήθηκαν σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (sik28) με τη χρήση RT-PCR τα επίπεδα του mRNA CYP1A1, υπό την επίδραση της TCDD, της FICZ, της PZ και της ιντιρουμπίνης είτε απουσίας είτε παρουσίας του μεθανολικού εκχυλίσματος *Rosmarinus officinalis* L.
- Ε) επιλεγμένοι μεταβολίτες μεθανολικού εκχυλίσματος *Rosmarinus officinalis* L., ήτοι: καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη, μπετουλινικό οξύ και 4',7'-διμεθυλ-απιγενίνη, διερευνήθηκαν για την δράση τους στον AhR, απουσίας ή παρουσίας της TCDD με τη μέθοδο GRA (Gel Retardation Assay).

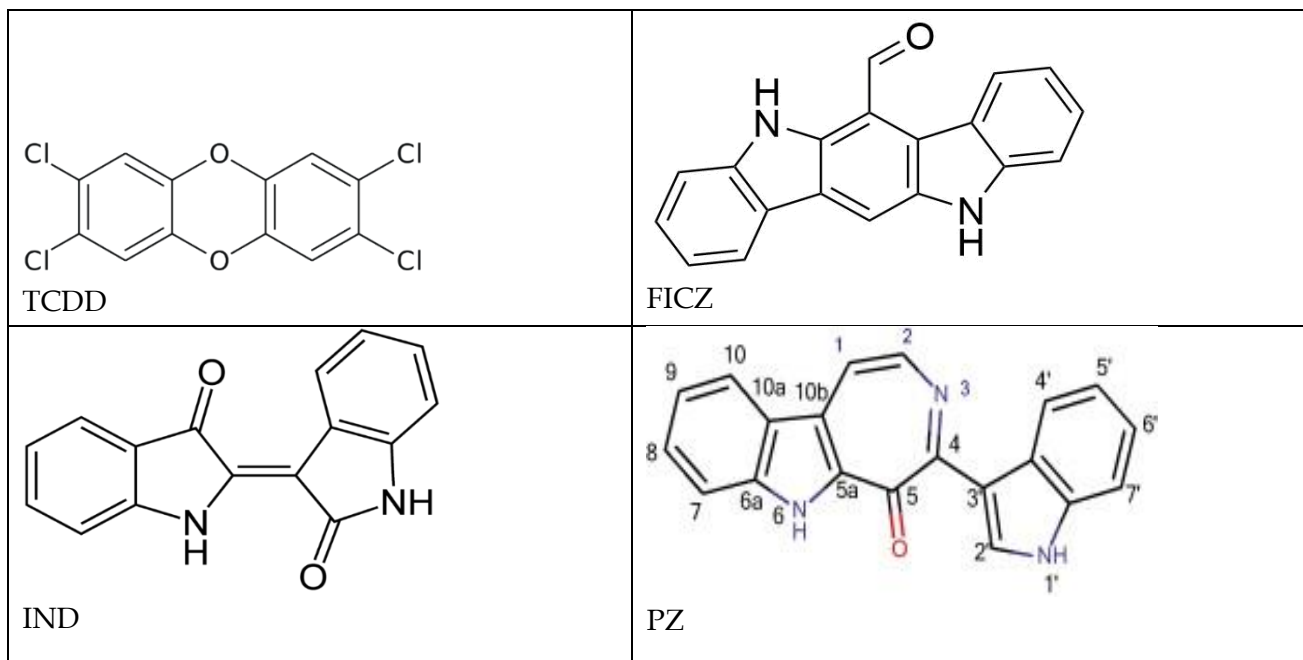
Όλες οι βιολογικές μελέτες έγιναν στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου DAVIS της Καλιφόρνιας των Η.Π.Α.

2. Εργαστηριακό μέρος

2.1 Χημικά

Η TCDD ελήφθη από τον Dr. Stephen Safe (Texas A & M University), η [³H]TCDD (13 Ci / mmol) ελήφθη από τα ChemSyn Laboratories (Lenexa, KS, USA), το 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζοφουράνιο (TCDF) ήταν από την Accustandard (New Haven, CT, USA), το [³²P]-ATP (~ 6000 Ci / mmol) ήταν από την Perkin Elmer Life & Analytical Sciences. Το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) προήλθε από την Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), η FICZ, η ιντιρουμπίνη και η πιτυριαζεπίνη προμηθεύτηκαν από τον Αναπλ. Καθηγητή κ. Π. Μαγάτη του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων ΕΚΠΑ.

Τα φύλλα του *Rosmarinus officinalis* L. συλλέχθηκαν από τον βοτανικό κήπο του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών "Ιουλίας και Αλέξανδρου Διομήδους". Τα φύλλα ξηράθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 14 ημέρες.



Εικόνα 47

TCDD=2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-*p*-διοξίνη

FICZ=6-φορμυλινδόλο[3,2*b*]καρβαζόλη

IND= ιντιρουμπίνη

PZ=πιτοριαζεπίνη

2.2 Δείγματα προς εξέταση

2.2.1 Εκχυλίσματα *Rosmarinus officinalis* L.

Παρασκευάστηκαν 5 διαφορετικά ξηρά εκχυλίσματα αποξηραμένων φύλλων *Rosmarinus officinalis* L., που διέφεραν μεταξύ τους ως προς το διαλύτη ή/και τη διάρκεια εκχύλισης. Η εκχύλιση της δρόγης έλαβε χώρα με τη μέθοδο της εμβροχής με αναλογία δρόγης-διαλύτη 1:10 w/v.

Η μέθοδος παρασκευής των ξηρών εκχυλισμάτων ήταν η ακόλουθη: 100 g αποξηραμένων φύλλων δεντρολίβανου τεμαχίσθηκαν και τοποθετήθηκαν σε γυάλινο περιέκτη με 1000 mL διαλύτη (όχι ακραίες θερμοκρασίες, προστατευμένο από το φως) για χρονικό διάστημα που έχει οριστεί, ανακινώντας σε τακτά χρονικά διαστήματα. Με τη συμπλήρωση του χρόνου εμβροχής, ακολούθησε διήθηση από χάρτινο ηθμό ενώ στο διήθημα έγινε προσθήκη διαλύτη μέχρι την επαναφορά του όγκου στο 1 L. Ακολούθως προστέθηκε διπλάσιος όγκος αποσταγμένου ύδατος (2 L). Άμεσα εμφανίστηκε ίζημα και ακολούθησε νέα διήθηση. Έγινε παραλαβή και ξήρανση του ιζήματος και κονιοποίηση του σε γουδι πορσελάνης και ιγδίο.

Για την παρασκευή των 5 εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικοί πολικοί διαλύτες: αιθυλική αλκοόλη 96°, ισοπροπυλική αλκοόλη και μεθανόλη. Ο χρόνος εμβροχής κομάνθηκε από 48 ώρες έως 14 ημέρες.

Τα εκχυλίσματα δεντρολίβανου αναλύθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά με 1D ¹H-NMR (CDCl₃). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω πίνακα 51.

Πίνακας 51

Οι ποσότητες των DMA, 7MER, CS, CA και BA στα εκχυλίσματα R1, R2, R3, R4, R5 του *Rosmarinus officinalis* L.

Εκχυλίσματα	Διαλυτής	Χρόνος εμβροχής	ΟΥΣΙΕΣ (mg±SD/g εκχυλίσματος)				
			DMA	7MER	CS	CA	BA
R1	Αιθανόλη 96°	48 ώρες	-	-	23,5±3,1	46,8±5,3	124,6±13,4
R2	Αιθανόλη 96°	14 μέρες	-	-	38,0±4,0	31,9±3,1	157,7±17,1
R3	Μεθανόλη	48 ώρες	tr	-	44,4±5,2	69,4±7,2	111,8±13,5
R4	Μεθανόλη	7 μέρες	tr	tr	50,5±4,3	42,1±6,1	106,3±10,4
R5	Ισοπροπανόλη	14 μέρες	-	-	12,7±2,5	20,9±3,1	69,5±5,1

2.2.2 Απομονωμένοι μεταβολίτες από τα φύλλα του *Rosmarinus officinalis* L.

Οι ουσίες καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη, μπετουλινικό οξύ και 4',7-Ο-διμεθυλαπιγενίνη απομονώθηκαν από τα εκχυλίσματα του *Rosmarinus officinalis* L. με τις μεθόδους που αναπτύχθηκαν λεπτομερώς στο κεφάλαιο 1 του ειδικού πειραματικού μέρους.

2.3 Πειραματόζωα-παρασκευή κυτοσολίου

Τα αρσενικά ινδικά χοιρίδια Hartley (250-300 g), που παρελήφθησαν από τα Charles River Breeding Laboratories (Wilmington, DE), εκτέθηκαν καθημερινά για 12 ώρες σε φως και για 12 ώρες στο σκοτάδι με ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Το ηπατικό κυτοσόλιο παρασκευάστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα HEDG [25 mM Hepes (pH 7,5), 1 mM αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, 1 mM διθειοτρεϊτόλη και 10% (v/v) γλυκερόλη]. Οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο dye binding (χρωστική που δεσμεύεται στις πρωτεΐνες) χρησιμοποιώντας αλβουμίνη βόειου ορού ως πρότυπο. Το κυτοσόλιο αποθηκεύτηκε στους -80 °C μέχρι τη χρήση του.

2.4 Hydroxyapatite AhR Ligand Binding Assay

Τα κλάσματα του ηπατικού κυτοσολίου ινδικού χοιριδίου (2 mg/mL) επώαστηκαν με 2nM [³H] TCDD παρουσία DMSO (1%), TCDF (200nM) ή της υποδεικνυόμενης ουσίας ή του εκχυλίσματος του *Rosmarinus officinalis* L. για 2 ώρες στους 20°C σε υδατόλουτρο. Η δέσμευση της [³H] TCDD στα κλάσματα της επώασης (200 ul) προσδιορίστηκε με HAP binding. Η συνολική ποσότητα της ειδικής σύνδεσης της [³H] TCDD ελήφθη αφαιρώντας τη μη ειδική σύνδεση ([³H] TCDD και TCDF) από την ολική σύνδεση ([³H] TCDD). Η ικανότητα ενός δείγματος να συνδέεται με το AhR υποδηλώνεται από την ικανότητά του να μειώνει ανταγωνιστικά την ειδική σύνδεση της [³H] TCDD. Ο βαθμός της ειδικής σύνδεσης της [³H] TCDD που απομένει παρουσία ανταγωνιστού εκφράστηκε ως ποσοστό της συνολικής ειδικής σύνδεσης του (Denison

et al. 2002).

2.5 Gel retardation assay, GRA

Ο προσδιορισμός επιβράδυνσης πηκτής (GRA, Gel retardation assay), που επίσης αναφέρεται ως ο προσδιορισμός μετατόπισης ηλεκτροκινητικότητας (EMSA), χρησιμοποιείται συνήθως ως τεχνική για την εξέταση της σύνδεσης στο DNA των παραγόντων μεταγραφής, συμπεριλαμβανομένων ενεργοποιημένων πυρηνικών υποδοχέων στις συγκεκριμένες θέσεις αναγνώρισης του DNA. Ο GRA του AhR βασίζεται στην *in vitro* ικανότητα του συμπλέγματος AhR να μετατρέπεται στη μορφή σύνδεσης του στο DNA μετά την αλληλεπίδραση και την ενεργοποίηση του από έναν αγωνιστή. Επιπλέον, η εξέταση της ικανότητας μιας χημικής ουσίας να αποκλείει την εξαρτώμενη από τον αγωνιστή δέσμευση στο DNA του AhR παρέχει έναν δρόμο για την ταυτοποίηση των ανταγωνιστών AhR. Κατά συνέπεια, αυτός ο προσδιορισμός επιτρέπει με σχετικά γρήγορο τρόπο την αναγνώριση αμφοτέρων των αγωνιστών και ανταγωνιστών του AhR. Με αυτή τη μέθοδο εξαλείφεται ουσιαστικά το αποτέλεσμα του κυτταρικού μεταβολισμού των υπό εξέταση ενώσεων, σε αντίθεση με τις κυτταρικές *in vivo* δοκιμασίες. Το GRA μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί με πυρηνικά εκχυλίσματα που λαμβάνονται από κατεργασμένα κύτταρα για την περαιτέρω ταυτοποίηση και/ή χαρακτηρισμό ενώσεων ικανών να διεγείρουν την πυρηνική μετατόπιση και σύνδεση στο DNA του AhR σε άθικτα κύτταρα. Οι μέθοδοι που περιγράφονται εδώ μπορούν να εφαρμοστούν σε κυττοσόλια, σε πυρηνικά και σε ολόκληρα κυτταρικά εκχυλίσματα από διάφορα είδη και ιστούς.

Για το σκοπό αυτό συμπληρωματικά συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν τη θέση σύνδεσης DRE3 AhR στο DNA (δηλαδή, το στοιχείο 3 απόκρισης στη διοξίνη από την περιοχή του γονιδίου CYP1A1 ποντικού (XX)) (5'-GATCTGGCTCTTCTCACGCAACTCCG-3'5'-AACTCCGGATCCGGAGTTGCGTGAGGAG) επισημάνθηκαν στο τέλος με [³²P] ATP. Το ηπατικό κυττοσόλιο του ινδικού χοιριδίου (8 mg / mL σε HEDG) επώαστηκε για 2 ώρες σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία δωματίου με DMSO (τελική συγκέντρωση 2%), TCDD (20 nM τελική συγκέντρωση σε DMSO) ή 20 nM TCDD παρουσία της υποδεικνυόμενης συγκέντρωσης του δείγματος. Μετά την επώαση, ένα κλάσμα της αντίδρασης αναμειχθηκε με poly[dI•dC] και [³²P]-DRE (100,000 cpm). Τα σύμπλοκα AhR: DRE αναλύθηκαν με GRA και οπτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα FLA9000 Fujifilm Imager (Walnut Creek, CA, USA) ενώ τα σύμπλοκα πρωτεΐνης-DNA ποσοτικοποιήθηκαν με το λογισμικό Fujifilm MultiGauge (Soshilov et al. 2014)

2.6 AhR-Responsive Luciferase Reporter Gene Analysis

Η λουσιφεράση της πυγολαμπίδας (*Photinus pyralis*) είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την οξείδωση της λουσιφερίνης χρησιμοποιώντας ATP και Mg²⁺. Κατά την αντίδραση παράγεται φως του οποίου η ένταση μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια ενός φωτόμετρου. Η ιδιότητα αυτή της λουσιφεράσης οδήγησε στην ευρεία χρήση του γονιδίου της.

Το παραπάνω σύστημα χρησιμοποιείται για την μέτρηση της μεταγραφικής δραστηριότητας των γονιδίων ενδιαφέροντος. Χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένα

κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος (HG2L7.5c1) που περιέχουν ένα πλασμίδιο το οποίο αποτελείται από δύο μέρη: από το γονίδιο που κωδικοποιεί για την λουσιφεράση και το γονίδιο που αντιστοιχεί στο AhR (pGudLuc7.5) μαζί με 20 στοιχεία που ανταποκρίνονται στη διοξίνη (DREs, dioxin responsive elements). Τα κύτταρα αυτά επιστρώθηκαν (75,000 κύτταρα/φρεάτιο) σε λευκό, στείρο πυθμένα 96 φρεατίων στις πλάκες καλλιέργειας ιστού σε 100 μ L α -MEM που περιέχουν 10% FBS και αφέθηκαν να προσκολληθούν για 24 ώρες στους 37° C. Τα κύτταρα επώαστηκαν με φορέα τον διαλύτη DMSO (τελική συγκέντρωση 1%), 10 nM TCDD (σε DMSO), 100 ppm εκχύλισμα δεντρολίβανου, ή TCDD και 100 ppm εκχύλισμα δεντρολίβανου (για ανάλυση ανταγωνισμού) για 24 ώρες στους 37° C. Μετά την επώαση, τα κύτταρα επιθεωρήθηκαν οπτικά για τοξικότητα και ακολούθως τα κύτταρα πλύθηκαν με αλατόνερο ρυθμισμένο με φωσφορικά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 50 μ l παθητικού διαλύματος λύσης (Promega) στα κύτταρα και αφέθηκαν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση. Η δραστηριότητα της λουσιφεράσης (εκφραζόμενη ως σχετικές μονάδες φωτός (RLUs)) σε κάθε φρεάτιο μετρήθηκε (ενσωμάτωση φωταύγειας πάνω από 10 δευτερόλεπτα με καθυστέρηση 10 δευτερολέπτων) σε ένα φωτόμετρο μικροπλακών Orion (Berthold Detection Systems, BadWildbad, Germany) μετά από αυτόματη ένεση αντιδραστήριου Promega σταθεροποιημένης λουσιφεράσης.

2.7 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction).

Ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (SIK 28) που αναπτύχθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων, επώαστηκαν με DMSO (1% (v/v) ή την ενδεικνυόμενη συγκέντρωση TCDD, PZ, FICZ και IND απουσία ή παρουσία του μεθανολικού εκχυλίσματος R4 (10 μ g/mL) για 2 ώρες. Μετά την επώαση, τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS, και το ολικό RNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο TRIzol (ThermoFisher Scientific) ενώ τα cDNA συντέθηκαν χρησιμοποιώντας το κιτ Αντίστροφης Μεταγραφής Υψηλής Χωρητικότητας cDNA (Applied Biosystems) με έναν θερμικό κύκλωμα Bio-Rad T100. Τα cDNA ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας προσδιορισμούς έκφρασης γονιδίου Applied Biosystems Taqman για το ανθρώπινο CYP1A1 (ID: Hs00153120_m1) και το γονίδιο β -γλυκουρονιδάσης (GUSB; ID: Hs99999908_m1) με ένα Applied Biosystems 7500 Fast Sequence Detection System (ThermoFisher). Τα επίπεδα mRNA του CYP1A1 βαθμονομήθηκαν με εκείνα του GUSB και οι τιμές εκφράστηκαν σε σχέση με τα επίπεδα του GUSB σε κύτταρα που υπέστησαν αγωγή με DMSO (ορίστηκε η τιμή 1,0) σύμφωνα με τη μέθοδο του δ - δ Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Rea et al. 2006, Zhao et al. 2013, He et al. 2014, Wong et al. 2005).

3 Αποτελέσματα

3.1 Τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα *Rosmarinus officinalis* L. αναστέλλουν την έκφραση του γονιδίου που επάγεται από την αγωνιστική δράση της TCDD στον AhR.

Για να εξεταστεί αν τα εκχυλίσματα *R. officinalis* L. μπορούν να επιδράσουν στην οδό σηματοδότησης του AhR, διερευνήθηκε αρχικά η ικανότητά τους να επάγουν την γονιδιακή έκφραση που εξαρτάται από τον AhR. Το πείραμα έγινε σε

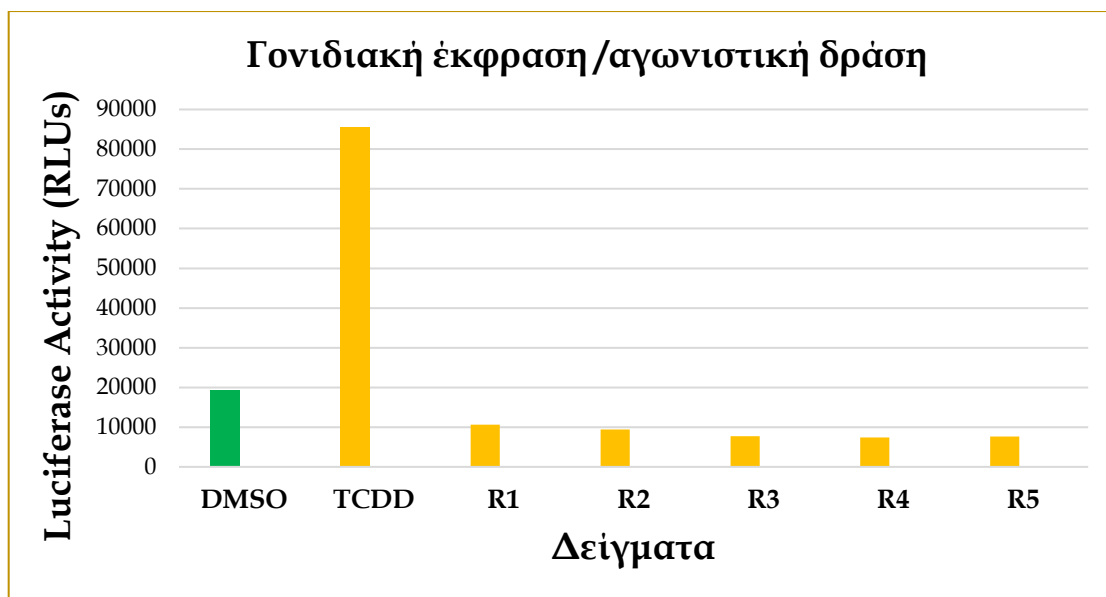
ανασυνδουασμένα κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος (HG2L7.5c1) με τη μέθοδο AhR-Responsive Luciferase Reporter Gene Analysis.

Όταν η TCDD δοκιμάστηκε μόνη της υπήρξε δραστικότητα της λουσιφεράσης στα ανασυνδουασμένα κύτταρα HG2L7.5c1. Όταν τα ίδια κύτταρα επώαστηκαν με 100 ppm των εκχυλισμάτων *R. officinalis* L. (R1-R5) (εικόνα 48) δεν παρατηρήθηκε δράση της λουσιφεράσης αλλά, αντιθέτως, υπήρξε μείωση της δράσης της λουσιφεράσης, με την τελική τιμή να είναι κάτω από εκείνη του μάρτυρα (DMSO). Δεδομένης της έλλειψης οποιασδήποτε οπτικά παρατηρούμενης τοξικότητας στα κύτταρα που έχουν υποστεί αγωγή με τα εκχυλίσματα *R. officinalis* και ότι έχουν αναφερθεί χαμηλά επίπεδα δραστικότητας της λουσιφεράσης που εξαρτάται από τον AhR, τα εκχυλίσματα *R. officinalis* θα μπορούσαν να δρουν ως ανταγωνιστές του AhR ή/και ότι καταστέλλουν την γονιδιακή έκφραση με διαφορετικό μηχανισμό, όπως αναστολή της μεταγραφής των γονιδίων ή της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Για να προσδιοριστεί εάν τα εκχυλίσματα *R. officinalis* L. θα μπορούσαν να ανταγωνίζονται την γονιδιακή έκφραση που εξαρτάται από τον AhR, τα κύτταρα HG2L7.5c1 επώαστηκαν με TCDD απουσία και παρουσία 100 ppm κάθε εκχυλίσματος (εικόνα 49). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το καθένα από τα εκχυλίσματα *R. officinalis* που ελέγχθηκαν θα μπορούσε να αναστέλλει την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης που οφείλεται στη TCDD και πραγματοποιείται μέσω του AhR. Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα δεν μας επιτρέπουν να συμπεράνουμε αν η δράση αυτή των εκχυλισμάτων δεντρολίβανου οφείλεται στο ότι δρουν ως ανταγωνιστές του AhR ή καταστέλλουν την επαγωγή της δράσης της λουσιφεράσης με έναν μηχανισμό ανεξάρτητο από τον AhR. Η ανασταλτική ισχύς των εκχυλισμάτων δεντρολίβανου κατά φθίνουσα σειρά ήταν: R4>R5>R3>R2>R1,

Πίνακας 52

Τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις τους και τα αποτελέσματα του πειράματος της λουσιφεράσης (AhR-Responsive Luciferase Reporter Gene Analysis) ως μέσος όρος τριών μετρήσεων και τυπική απόκλιση (SD).

Δείγματα	Μέσος όρος	SD
DMSO	19296	3102
TCDD	85414	6461
R1 100ppm	10627	1063
R2 100ppm	9398	476
R3 100ppm	7731	861
R4 100ppm	7397	579
R5 100ppm	7625	883



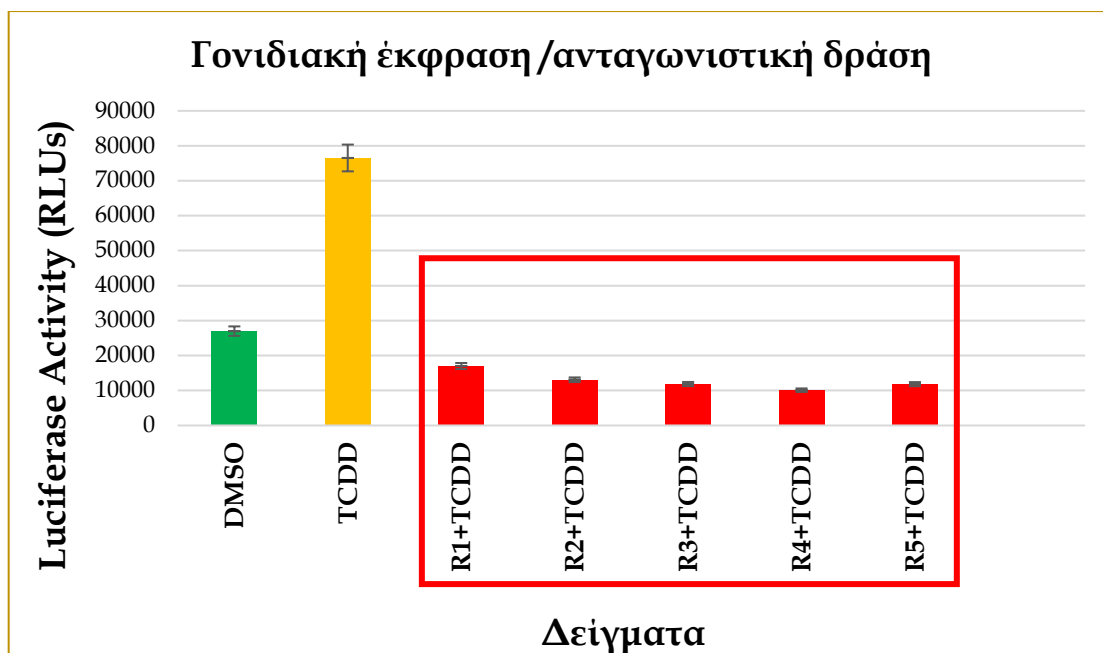
Εικόνα 48

Η *in vitro* δράση λουσιφεράσης σε ανασυνδυασμένα κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος (HG2L7.5c1), που επωάστηκαν με μόνο TCDD (1 nM) και με μόνο του το κάθε εκχύλισμα *R. officinalis* (R1-R5) (100ppm έκαστο) για την διερεύνηση τυχόν ύπαρξης αγωνιστικής δράσης των φυτικών δειγμάτων στον AhR. Όπως φαίνεται από το γράφημα τα R1-R5 στερούνται αγωνιστικής δράσης στον εν λόγω υποδοχέα δεδομένου ότι η δράση της λουσιφεράσης μειώθηκε σε επίπεδα κάτω του μάρτυρα (DMSO).

Πίνακας 53

Τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις τους και τα αποτελέσματα του πειράματος της λουσιφεράσης (AhR-Responsive Luciferase Reporter Gene Analysis), ως μέσος όρος τριών μετρήσεων και τυπική απόκλιση (SD).

Δείγματα	Μέσος όρος	SD
DMSO	26991	584
TCDD	76519	3673
R1 100ppm + TCDD	17018	2870
R2 100ppm + TCDD	13086	1663
R3 100ppm + TCDD	11852	855
R4 100ppm + TCDD	10092	777
R5 100ppm + TCDD	11817	790



Εικόνα 49

Η *in vitro* δράση λουσιφεράσης σε ανασυνδυασμένα κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος (HG2L7.5c1) που επώαστηκαν με μόνο TCDD (1 nM) και με τον συνδυασμό της TCDD με κάθε ένα από τα εκχυλίσματα δεντρολίβανου R1-R5 (R 100ppm + TCDD) που εξετάστηκαν.

3.2 Τα εκχυλίσματα *R. officinalis* L. αναστέλλουν τον επαγόμενο από τη TCDD μετασχηματισμό του AhR και την ακόλουθη σύνδεση του στο DNA

Ένας τρόπος για να ελεγχθεί εάν τα εκχυλίσματα *R. officinalis* είναι ανταγωνιστές του AhR είναι να αποδειχθεί *in vitro* ότι αυτά τα εκχυλίσματα μπορούν να αναστέλλουν τον εξαρτώμενο από τη TCDD μετασχηματισμό του AhR και την ακόλουθη σύνδεση του στο DNA. Για το σκοπό αυτό ηπατικά κυττοσώλια ινδικού χοιριδίου επώαστηκαν με τη TCDD, απουσία ή παρουσία δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων εκάστου εκχυλίσματος δεντρολίβανου (10 και 100 ppm) και εξετάστηκε η επίδρασή τους στην επαγόμενη από τη TCDD σύνδεση του AhR στο DNA με την μέθοδο GRA (εικόνα 50). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα δεντρολίβανου (R1-R5) μπορούν να μειώσουν σημαντικά την ποσότητα του συμπλέγματος AhR-DNA που επάγεται από τη TCDD. Η μείωση που επιτεύχθηκε από τα εκχυλίσματα δεντρολίβανου ήταν εξαρτώμενη από την συγκέντρωση. Πράγματι, στα 10 ppm τα εκχυλίσματα δεντρολίβανου μείωσαν την ποσότητα του επαγόμενου συμπλέγματος AhR-DNA από 22 έως 33%, ενώ στα 100 ppm η μείωση ήταν από 85 έως 92%. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν την ικανότητα και των (5) πέντε εκχυλισμάτων δεντρολίβανου που δοκιμάστηκαν να ανταγωνίζονται-αναστέλλουν τον εξαρτώμενο από τον αγωνιστή TCDD μετασχηματισμό του AhR και τη δέσμευση του στο DNA. Με άλλα λόγια τα εκχυλίσματα αυτά αναστέλλουν την έκφραση του AhR-εξαρτώμενου γονιδίου που επάγεται από την σύνδεση της TCDD στον AhR και την ακόλουθη μεταφορά του συμπλέγματος TCDD-AhR στον πυρήνα για την αλληλεπίδραση του με το συγκεκριμένο γονίδιο. Όλα τα αποτελέσματα ήταν στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,01$). Η ανασταλτική ισχύς των εκχυλισμάτων

δεντρολιβανου κατά φθίνουσα σειρά ήταν: R3>R1>R4>R2>R5 στα 10 ppm και R4>R3>R5>R1>R2 στα 100 ppm.

Πιο συγκεκριμένα στα:

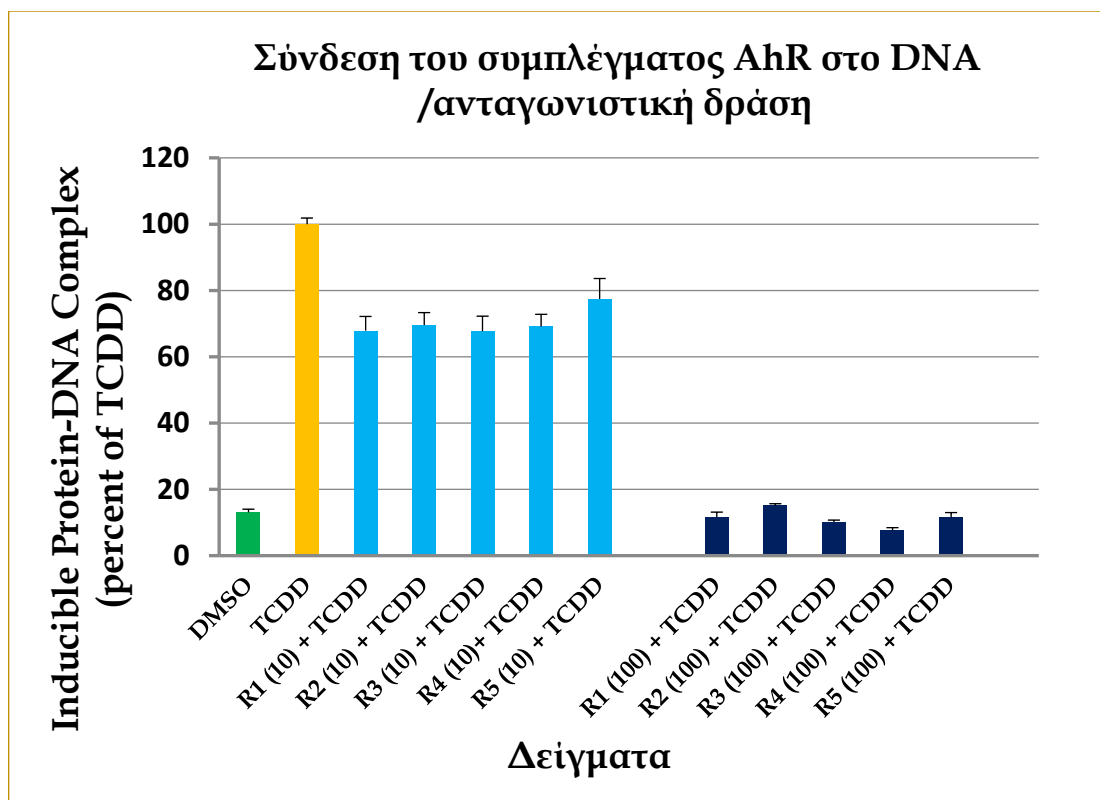
- 10 ppm:
 - α) το R1 μείωσε την δράση της TCDD κατά 32,13%
 - β) το R2 μείωσε την δράση της TCDD κατά 30,44%
 - γ) το R3 μείωσε την δράση της TCDD κατά 32,30%
 - δ) το R4 μείωσε την δράση της TCDD κατά 30,87%
 - ε) το R5 μείωσε την δράση της TCDD κατά 22,57%
- 100 ppm:
 - α) το R1 μείωσε την δράση της TCDD κατά 88,34%
 - β) το R2 μείωσε την δράση της TCDD κατά 84,88%
 - γ) το R3 μείωσε την δράση της TCDD κατά 89,84%
 - δ) το R4 μείωσε την δράση της TCDD κατά 92,38%
 - ε) το R5 μείωσε την δράση της TCDD κατά 88,43%

Πίνακας 54

Τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις τους και τα αποτελέσματα του πειράματος υπολογισμού του σχηματισμού του συμπλέγματος AhR-DNA με τη μέθοδο GRA, ως μέσος όρος τριών μετρήσεων και τοπική απόκλιση (SD).

Δείγματα	Μέσος όρος	SD
DMSO	13,09	0,94
TCDD	100	1,85
R1 (10) + TCDD	67,87	4,29
R2 (10) + TCDD	69,56	3,76
R3 (10) + TCDD	67,7	4,55
R4 (10) + TCDD	69,13	3,67
R5 (10) + TCDD	77,44	6,16

Δείγματα	Μέσος όρος	SD
R1 (100) + TCDD	11,66	1,48
R2 (100) + TCDD	15,12	0,55
R3 (100) + TCDD	10,16	0,58
R4 (100) + TCDD	7,62	0,82
R5 (100) + TCDD	11,57	1,43



Εικόνα 50

Ποσοστό του συμπλέγματος AhR-DNA που σχηματίζεται όταν κάθε εκχυλίσμα δεντρολίβανου [R1-R5, σε συγκεντρώσεις 10 ppm (γαλάζιες ράβδοι) και 100 ppm (μπλε ράβδοι)] επωάζεται στα ηπατικά κυττοσόλια μαζί με TCDD (1 nM). Η τιμή 100% αντιστοιχεί στη TCDD όταν υπάρχει μόνη της στο σύστημα. Όλα τα εκχυλίσματα δεντρολίβανου μείωσαν τον σχηματισμό AhR-DNA. Όλα τα αποτελέσματα στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,01$). (Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος GRA).

3.3 Τα εκχυλίσματα *R. officinalis* ανταγωνίζονται τη [³H]TCDD για την ειδική δέσμευση στο AhR

Ο ανταγωνισμός της σηματοδότησης του AhR από τα εκχυλίσματα δεντρολίβανου πιθανότατα οφείλεται στην ικανότητα μιας ή πολλών χημικών ουσιών, που υπάρχουν στο κάθε εκχύλισμα, να δρα ως κλασικός ανταγωνιστής, με το να δεσμεύεται στη θέση σύνδεσης του αγωνιστή αναστέλλοντας με αυτό τον τρόπο τη λειτουργικότητα-ενεργοποίηση του AhR. Ωστόσο, οι χημικές αυτές ουσίες στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου θα μπορούσαν να ανταγωνίζονται τη σηματοδότηση του AhR με διαφορετικούς μηχανισμούς, όπως με την σύνδεση του χημικού μορίου σε μια θέση του AhR διαφορετική από αυτή που συνδέεται με τη TCDD, ή μέσω της δράσης τους επι πρωτεϊνών-υποδοχέων που σχετίζονται με AhR και που επηρεάζουν αρνητικά τον μετασχηματισμό του AhR και/ή τη δέσμευση του στο DNA (π.χ., μέσω δράσης επι των δεσμευμένων με τον AhR πρωτεϊνών (δηλ. Hsp90, XAP2, p23), ή επηρεάζοντας τον διμερισμό του AhR με τον ARNT ή με άλλο μηχανισμό). Για να προσδιοριστεί εάν οι χημικές ουσίες στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου είναι άμεσοι ανταγωνιστές που συνδέονται με τη θέση σύνδεσης του αγωνιστή στον AhR, εξετάστηκε σε ηπατικά κυττοσόλια ινδικού χοιριδίου με τη μέθοδο Hydroxyapatite AhR Ligand Binding

Assay, η ικανότητά τους να αναστέλλουν ανταγωνιστικά την ειδική δέσμευση της [³H]TCDD στον AhR. Τα αποτελέσματα στην εικόνα 51, δείχνουν ότι και τα (5) πέντε εκχυλίσματα δεντρολίβανου περιείχαν μια χημική ουσία που θα μπορούσε να ανταγωνιστεί άμεσα την ειδική δέσμευση της [³H]TCDD στον AhR. Επιπλέον αποδείχτηκε ότι η ανταγωνιστική δράση των ουσιών αυτών ήταν εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση. Πράγματι, τα εκχυλίσματα δεντρολίβανου μειώνουν την ποσότητα της ειδικής δέσμευσης της [³H]TCDD μεταξύ 28 και 40% και από 85 έως 100% όταν χρησιμοποιήθηκαν στα 10 ppm και στα 100 ppm αντίστοιχα. Εν κατακλείδι, και τα πέντε εκχυλίσματα δεντρολίβανου περιέχουν ουσία/ουσίες που συνδέονται άμεσα στον AhR και ανταγωνίζονται την ενεργοποίηση του από την TCDD. Η ανασταλτική ισχύς των εκχυλισμάτων δεντρολίβανου κατά φθίνουσα σειρά ήταν: R4>R2>R3>R1>R5 στα 10 ppm και R3>R1>R4>R2>R5 στα 100 ppm.

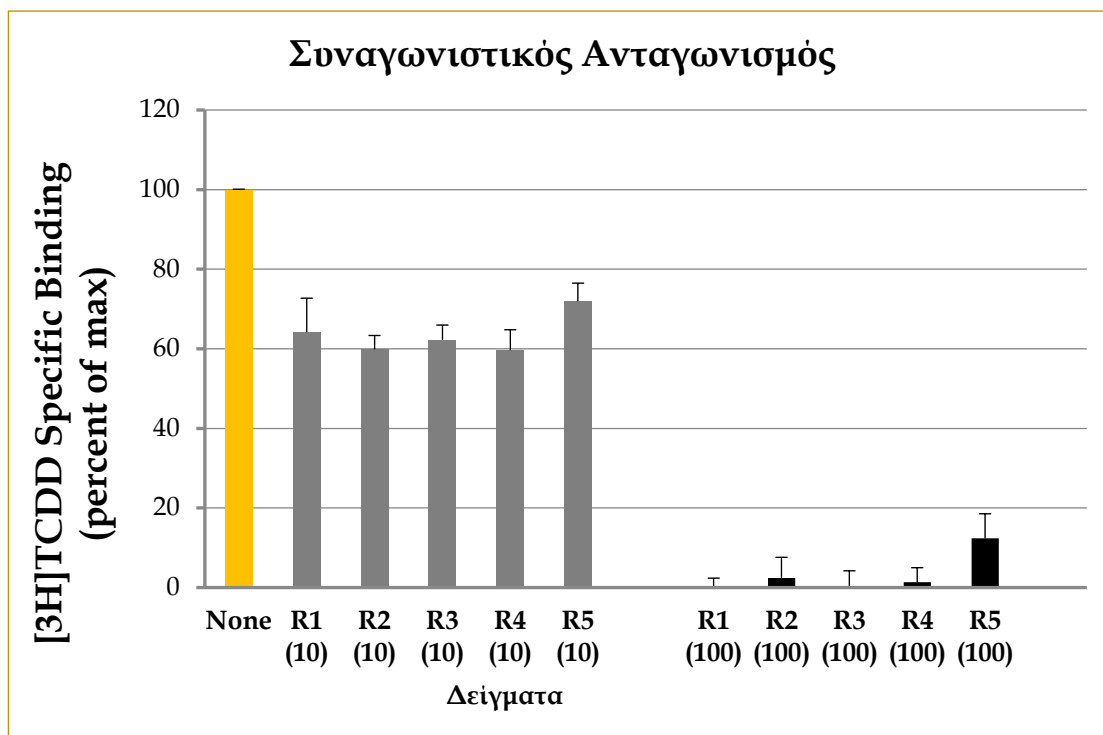
Πιο συγκεκριμένα στα:

- 10 ppm:
 - α) το R1 μείωσε τη σύνδεση της TCDD στον AhR κατά 35,80%
 - β) το R2 μείωσε την δράση της TCDD κατά 40,13%
 - γ) το R3 μείωσε την δράση της TCDD κατά 37,76%
 - δ) το R4 μείωσε την δράση της TCDD κατά 40,38%
 - ε) το R5 μείωσε την δράση της TCDD κατά 28,02%
- 100 ppm:
 - α) το R1 μείωσε την δράση της TCDD κατά 99,98%
 - β) το R2 μείωσε την δράση της TCDD κατά 97,60%
 - γ) το R3 μείωσε την δράση της TCDD κατά 100,10%
 - δ) το R4 μείωσε την δράση της TCDD κατά 98,68%
 - ε) το R5 μείωσε την δράση της TCDD κατά 87,66%

Πίνακας 55

Τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις τους και τα αποτελέσματα του πειράματος Hydroxyapatite AhR Ligand Binding Assay ως μέσος όρος τριών μετρήσεων και τοπική απόκλιση (SD).

Δείγματα	Μέσος όρος	SD
Κανένα	100	0,11
R1 (10)	64,2	8,52
R2 (10)	59,87	3,47
R3 (10)	62,24	3,73
R4 (10)	59,62	5,17
R5 (10)	71,98	4,52
R1 (100)	0,02	2,35
R2 (100)	2,4	5,2
R3 (100)	-0,1	4,31
R4 (100)	1,32	3,67
R5 (100)	12,36	6,18



Εικόνα 51

Γραφική παράσταση αποτελεσμάτων πειράματος Hydroxyapatite AhR Ligand Binding Assay σε ηπατικά κυττοσόλια, που δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα R1-R5 δρουν ως ανταγωνιστές της TCDD (2 nM) έναντι του AhR με συναγωνιστικό τρόπο, δηλαδή κάποια ή κάποιες από τις ενώσεις των εκχυλισμάτων ενώνονται με τον AhR στην ίδια περιοχή που συνδέεται η TCDD. Τα R1-R5 ελέγχθηκαν σε δύο συγκεντρώσεις: στα 10 ppm (γκρί ράβδοι) και στα 100 ppm (μαύρες ράβδοι).

3.4 Το εκχύλισμα *Rosmarinus officinalis* L. R4 ανταγωνίζεται την επαγωγή του CYP1A1 από τη TCDD, την PZ, την FICZ και την IND

Προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση των ανταγωνιστών AhR που υπάρχουν στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου, τα τελευταία αναλύθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά με φάσματα 1D ¹H-NMR (CDCl₃).

Το εκχύλισμα R4 επιλέχθηκε για περαιτέρω βιοχημικές αναλύσεις καθώς ήταν αυτό που είχε τα καλύτερα αποτελέσματα στα πειράματα που προηγήθηκαν.

Πριν από την εξέταση των ουσιών του R4, ερευνήθηκε αν το εκχύλισμα R4:

- μπορεί να ανταγωνιστεί την επαγωγή του CYP1A1, τις ενδογενούς γονιδίου που ρυθμίζεται από τον AhR.
- αν ο ανταγωνισμός της επαγωγής του CYP1A1 είναι επιλεκτικός για τη TCDD, ή μπορεί να ανταγωνιστεί και άλλους αγωνιστές του AhR.

Αυτό το τελευταίο ζήτημα είναι σημαντικό δεδομένου ότι προηγούμενες μελέτες έχουν οδηγήσει στον εντοπισμό ενός ανταγωνιστή του AhR, το μόριο με κωδικό CH223191, που θα μπορούσε να ανταγωνιστεί επιλεκτικά τη TCDD και σχετικούς αλογονωμένους αρωματικούς υδρογονάνθρακες, αλλά όχι τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) και τους αγωνιστές του AhR που μοιάζουν με PAHs, όπως την β-ναφθοφλαβόνη (Zhao et al., 2013).

Η ικανότητα του εκχυλίσματος δεντρολίβανου R4 να ανταγωνίζεται την επαγόμενη από τη TCDD γονιδιακή έκφραση του CYP1A1 σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (Sik 28) επιβεβαιώθηκε με την μείωση των επιπέδων του mRNA χρησιμοποιώντας RT-PCR. Η επώαση των κυττάρων Sik 28 με τη TCDD για 2 ώρες οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων του mRNA του CYP1A1, Η επαγωγή αυτή παρεμποδίστηκε με την σύγχρονη επώαση των κυττάρων με TCDD και εκχύλισμα R4 (εικόνα 52).

Το R4 από μόνο του δεν είχε επίδραση στα βασικά επίπεδα mRNA του CYP1A1 φανερώνοντας την έλλειψη αγωνιστικής δράσης.

Το εκχύλισμα δεντρολίβανου R4 ήταν ικανό να ανταγωνίζεται την επαγωγή των επιπέδων mRNA του CYP1A1 και από τους αγωνιστές PZ, FICZ και IND του AhR (εικόνα 53).

Πιο συγκεκριμένα το R4 σε συγκέντρωση 10 µg/mL μείωσε την δράση:

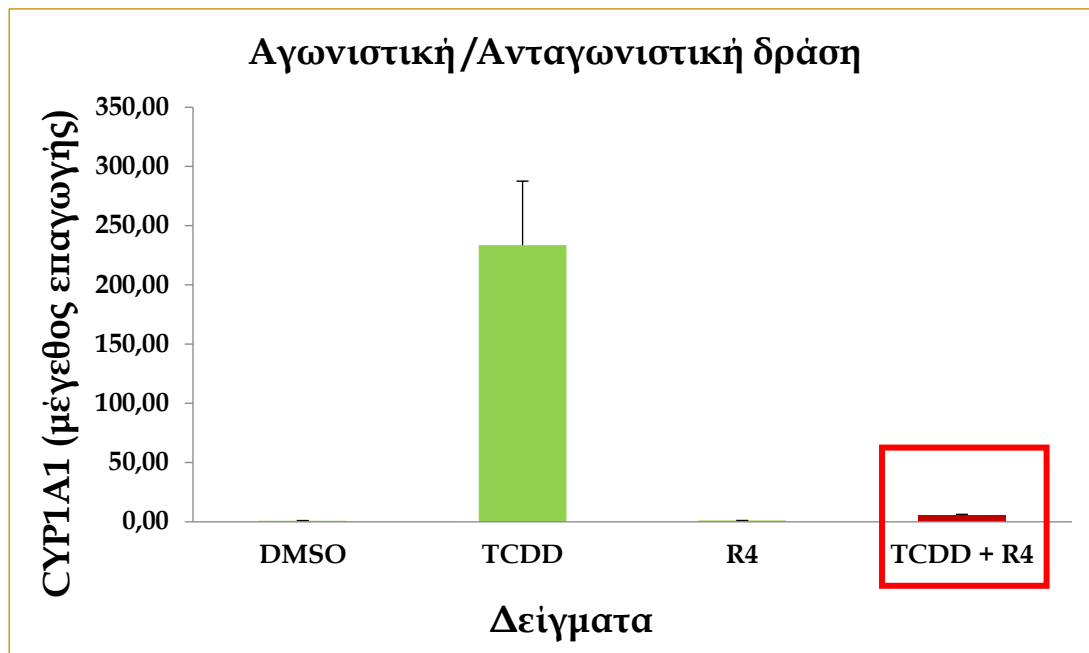
- της TCDD κατά 97,65%
- της PZ κατά 82,09%
- της FICZ κατά 44,96%
- της IND κατά 90,09%

Αποδείχτηκε λοιπόν ότι οι ανταγωνιστές που υπάρχουν στο εκχύλισμα δεντρολίβανου R4 δεν είναι εκλεκτικοί για την TCDD αλλά δείχνουν ότι μπορούν να αναστείλουν ένα ευρύ φάσμα αγωνιστών του AhR, με ποικίλους χημικούς τύπους όπως τις ενώσεις TCDD, PZ, FICZ και IND.

Πίνακας 56

Τα δείγματα και τα αποτελέσματα του πειράματος RT-PCR (Sik 28 cells) ως μέσος όρος τριών μετρήσεων και τυπική απόκλιση (SD).

Δείγματα	Μέσος όρος	SD
DMSO	1,00	0,11
TCDD	233,63	54,02
R4	1,06	0,11
TCDD + R4	5,48	0,86



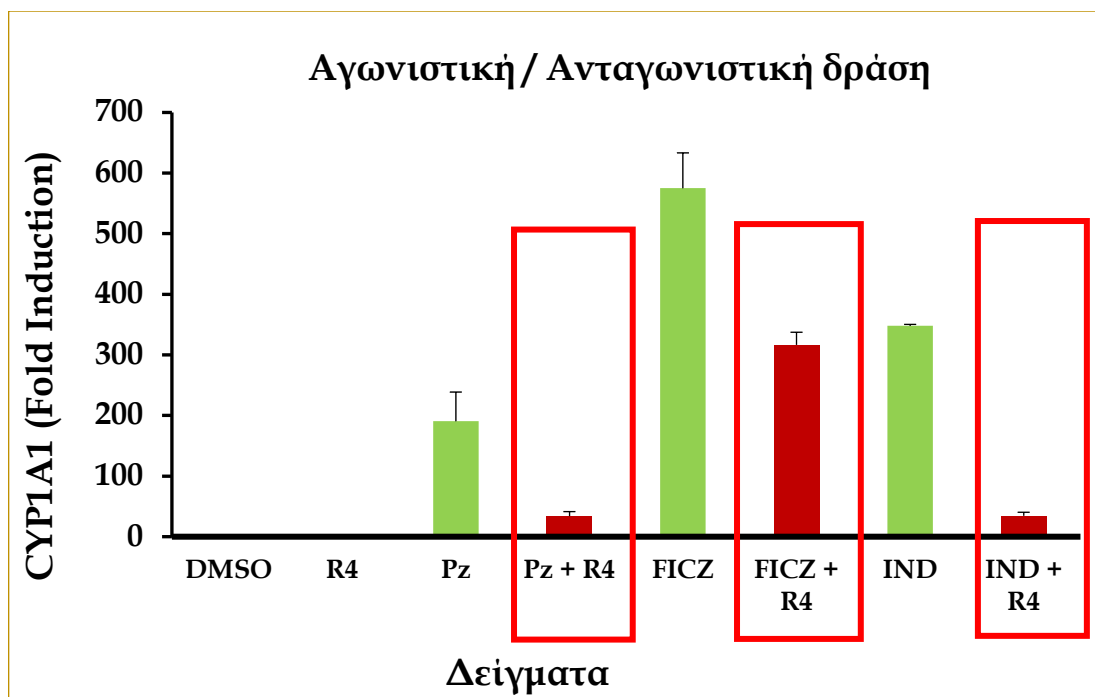
Εικόνα 52

Ο κάθετος άξονας δείχνει την επαγωγή του mRNA CYP1A1 στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (Sik 28) από παράγοντα με αγωνιστική δράση στον AhR και μετράται με την RT-PCR. Ο χρόνος επώασης είναι 2 h. Ο διαλύτης είναι το DMSO. Στο γράφημα υπάρχει η δράση της TCDD και του R4 όταν επωάζονται μόνο τους (πράσινες ράβδοι) και με κόκκινο πλαίσιο (μπορντό ράβδος) φαίνεται η δράση του εκχυλίσματος R4, στα 10 µg/mL, μετά την επώαση μαζί με τη TCDD.

Πίνακας 57

Τα δείγματα και τα αποτελέσματα του πειράματος RT-PCR (Sik 28 cells) ως μέσος όρος τριών μετρήσεων και τυπική απόκλιση (SD).

Δείγματα	Μέσος όρος	SD
DMSO	1,0	0,2
R4	0,81	0,26
Pz	190,46	48,23
Pz + R4	34,11	7,26
FICZ	574,95	58,3
FICZ + R4	316,45	20,9
IND	347,82	2,49
IND + R4	34,47	5,83



Εικόνα 53

Ο κάθετος άξονας δείχνει την επαγωγή mRNA CYP1A1 σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (SIK 28) από παράγοντα με αγωνιστική δράση στον AhR και μετράται με την RT-PCR. Ο χρόνος επώασης είναι 2 h, διαλύτης DMSO. Στο γράφημα υπάρχει η δράση των R4, PZ, FICZ και IND όταν επωάζεται κάθε δείγμα μόνο του (πράσινες ράβδοι). Με κόκκινο πλαίσιο (μπορντό ράβδοι) φαίνεται η δράση του R4, στα 10 µg/mL, μετά την επώαση μαζί με κάθε μια από τις PZ, FICZ και IND ξεχωριστά.

3.5 Διερεύνηση της δράσης των CA, CS, 7MER, BA και DMA έναντι του AhR

Στο επόμενο βήμα ελέγχθηκαν οι μεταβολίτες του εκχυλίσματος R4: καρνοσικό οξύ (CA), καρνοσόλη (CS), 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη (7MER), 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνη (DMA) και μπετουλινικό οξύ (BA) ως προς την συμπεριφορά τους έναντι του AhR.

Για το λόγο αυτό εκτιμήθηκε η ικανότητα αυτών των ενώσεων να διεγείρουν ή να αναστείλουν τον μετασχηματισμό του AhR και τη σύνδεση του στο DNA χρησιμοποιώντας τη μέθοδο GRA.

Για τη διερεύνηση τυχόν αγωνιστικής δράσης τα ηπατικά κυττοσόλια ινδικού χοιριδίου επώαστηκαν με DMSO και TCDD (σε συγκέντρωση 1 nM) ή με καθεμία από τις απομονωμένες χημικές ουσίες (σε συγκέντρωση 10 nM και 100 nM). Το αποτέλεσμα του πειράματος (πίνακας 58, 59) (εικόνα 54, 55) έδειξε ότι οι μεταβολίτες CA, CS και BA καθώς και το εκχύλισμα R4 δεν παρουσίασαν αγωνιστική δράση. Ωστόσο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ότι τα DMA, 7MER εμφάνισαν χαμηλά επίπεδα αγωνιστικής δράσης έναντι του AhR, διεγείροντας συνεπώς τον μετασχηματισμό του AhR και την ακόλουθη δέσμευση του στο DNA. Η αγωνιστική δράση της 7MER παρουσίασε μικρή αύξηση από τα 10 nM (15,00% της δράσης της TCDD) στα 100 nM (17,68% της δράσης της TCDD). Αντιθέτως, η αγωνιστική δράση της DMA μειώθηκε

με την αύξηση της συγκέντρωσης (από 38,82% σε 31,54% της δράσης της TCDD στα 10 nM και 100 nM αντίστοιχα).

Για την εκτίμηση της ανταγωνιστικής τους δράσης η κάθε ουσία επωάστηκε (σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις) μαζί με τη TCDD. Δείγμα του ολικού R4 εκχύλισματος συμπεριλήφθηκε ως μάρτυρας αναφοράς.

Τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι κάθε μία από τις ενώσεις που εξετάστηκαν θα μπορούσε να ανταγωνιστεί τον επαγόμενο από την TCDD μετασχηματισμό του AhR και τη σύνδεση του στο DNA, με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση, όπως συμβαίνει και με το εκχύλισμα R4,

Πράγματι, όταν οι ουσίες CA, CS, 7MER, DMA και BA χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση των 10 nM η αναστολή ήταν μεταξύ 20-63%, ενώ στα 100 nM ήταν μεταξύ 67-83%.

Πιο συγκεκριμένα στα 10 nM:

- το CA μείωσε τη δράση της TCDD κατά 20,26%
- η CS μείωσε τη δράση της TCDD κατά 32,67%
- το BA μείωσε τη δράση της TCDD κατά 26,33%
- η DMA μείωσε τη δράση της TCDD κατά 62,16%
- η 7MER μείωσε τη δράση της TCDD κατά 24,45%
- το R4 μείωσε τη δράση της TCDD κατά 52,19%

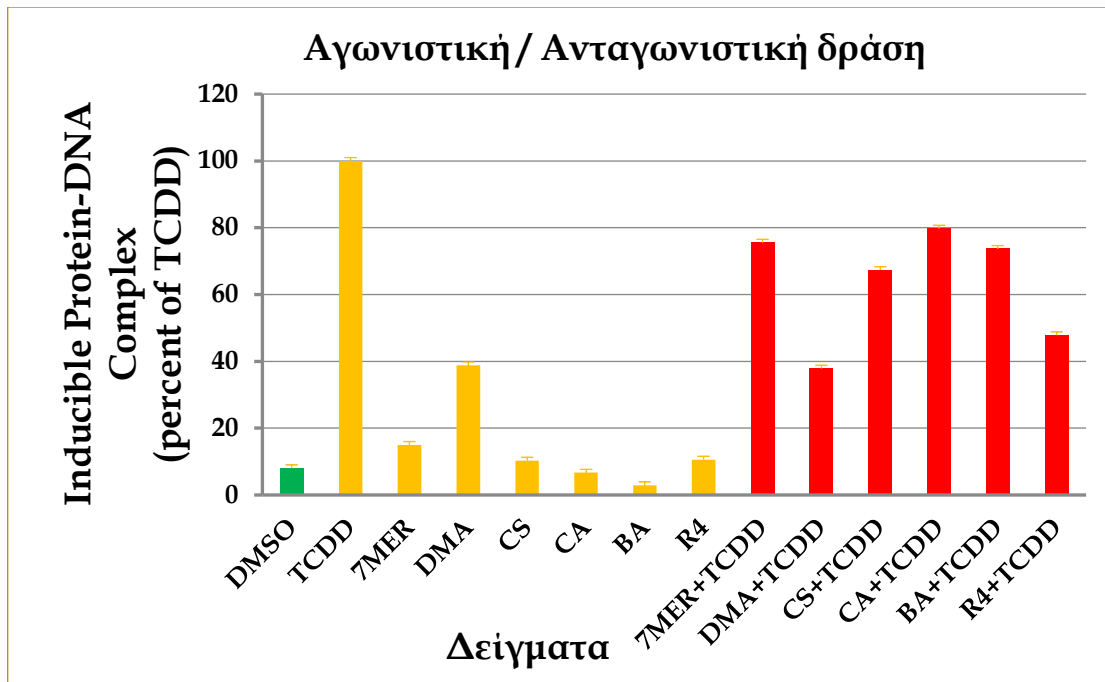
Συνεπώς, κατά φθίνουσα σειρά η ανταγωνιστική δράση στα 10 nM είναι:

DMA> R4> CS> BA> 7MER> CA (εικόνα 54)

Πίνακας 58

Τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις τους και τα αποτελέσματα του πειράματος GRA σε ηπατικά κυττοσόλια ινδικού χοιριδίου ως μέσος όρος τριών μετρήσεων και τυπική απόκλιση (SD).

Δείγματα	Μέσος όρος	SD	Συγκέντρωση
DMSO	8	1,01	
TCDD	100	4,48	1nM
7MER	15	1,17	10nM
DMA	38,82	2,72	10nM
CS	10,3	2,03	10nM
CA	6,68	2,17	10nM
BA	2,91	0,93	10nM
R4	10,6	1,68	10nM
7MER+TCDD	75,55	12,1	10nM+1nM
DMA+TCDD	37,84	2,7	10nM+1nM
CS+TCDD	67,33	10,67	10nM+1nM
CA+TCDD	79,74	11,92	10nM+1nM
BA+TCDD	73,67	10,58	10nM+1nM
R4+TCDD	47,81	5,52	10nM+1nM



Εικόνα 54

Πείραμα GRA για αξιολόγηση συμπεριφοράς (αγωνιστικής ή ανταγωνιστικής) των CS, CA, 7MER, DMA και BA στον AhR σε συγκέντρωση 10 nM, απουσίας (πορτοκαλί ράβδοι) και παρουσίας (κόκκινες ράβδοι) 1 nM της TCDD. Χρόνος επώασης 1,5 h.

Στα 100 nM:

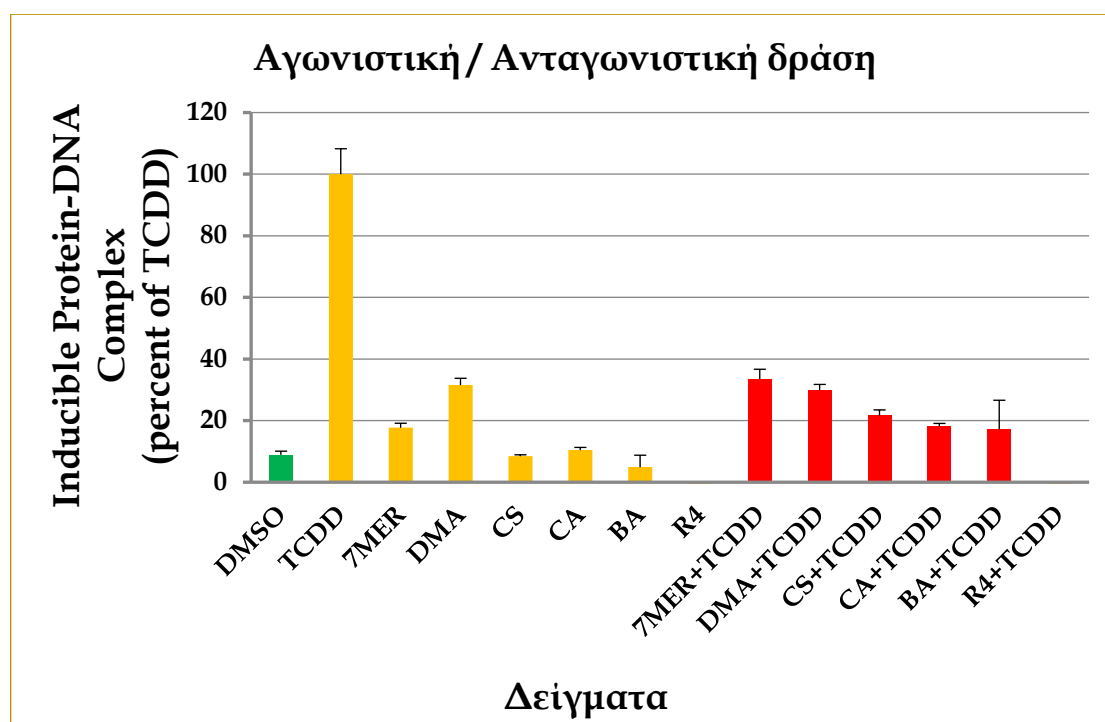
- το CA μείωσε τη δράση της TCDD κατά 81,93%
- η CS μείωσε τη δράση της TCDD κατά 78,41%
- το BA μείωσε τη δράση της TCDD κατά 82,96%
- η DMA μείωσε τη δράση της TCDD κατά 70,18%
- η 7MER μείωσε τη δράση της TCDD κατά 66,59%
- το R4 μείωσε τη δράση της TCDD κατά 101,07%

Συνεπώς, κατά φθίνουσα σειρά η ανταγωνιστική δράση στα 100 nM είναι: R4> BA> CA> CS> DMA> 7MER (εικόνα 55).

Πίνακας 59

Τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις τους και τα αποτελέσματα του πειράματος GRA (μέσος όρος τριών μετρήσεων και τυπική απόκλιση SD)

Δείγματα	Μέσος όρος	SD	Συγκέντρωση
DMSO	8,88	1,2	
TCDD	100	8,25	1nM
7MER	17,68	1,46	100nM
DMA	31,54	2,2	100nM
CS	8,48	0,41	100nM
CA	10,44	0,86	100nM
BA	4,89	3,88	100nM
R4	-1,41	0,44	100nM
7MER+TCDD	33,41	3,26	100nM+1nM
DMA+TCDD	29,82	1,92	100nM+1nM
CS+TCDD	21,59	1,87	100nM+1nM
CA+TCDD	18,07	1,01	100nM+1nM
BA+TCDD	17,04	9,57	100nM+1nM
R4+TCDD	-1,07	0,3	100nM+1nM



Εικόνα 55

Πείραμα GRA για αξιολόγηση συμπεριφοράς (αγωνιστικής ή ανταγωνιστικής) των CS, CA, 7MER, DMA, BA στον AhR σε συγκέντρωση 100 nM απουσίας (πορτοκαλί ράβδοι) και παρουσίας (κόκκινοι ράβδοι) 1 nM της TCDD. Χρόνος επώασης 1,5 h.

Συνεπώς, λαμβάνοντας υπόψη τα προηγούμενα αποτελέσματα προκύπτει ότι:

- το CA, η CS και το BA είναι πλήρεις ανταγωνιστές του AhR.

- η 7MER και η DMA εμφάνισαν ανταγωνιστική και αγωνιστική δράση και συνεπώς συμπεριφέρονται ως μερικοί αγωνιστές του AhR. Επιπλέον η DMA είναι πιο ισχυρός μερικός αγωνιστής από την 7MER.

4. Συζήτηση-συμπεράσματα

4.1 *Rosmarinus officinalis* L., AhR και φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος

Το εκχύλισμα των αποξηραμένων φύλλων του *R. officinalis* L. εμφανίστηκε αποτελεσματικό ως τοπική θεραπεία σε ασθενείς με SD (Kallimanis 2017). Στην παρούσα μελέτη καταδείχθηκε ότι το εκχύλισμα R4 ενεργεί ως ανταγωνιστής της PZ, της IND και της FICZ σε σχέση με τον AhR στα κύτταρα του δέρματος *in vitro*. Συνδυάζοντας το αποτέλεσμα αυτό με τα προαναφερόμενα δεδομένα ενισχύεται η υπόθεση των Gaitanis et al., (2008) και Magiatis et al., (2013).

Μέχρι αυτό το σημείο αποδείχθηκε ότι συγκεκριμένο εκχύλισμα *R. officinalis* L. ανταγωνίζεται τις εξεταζόμενες ινδολικές ενώσεις, που παράγονται από το γένος *Malassezia*, επί του AhR σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα. Ωστόσο, δεν μπορεί να υποστηριχθεί με σιγουριά το πόσο συμβάλει αυτό στη θεραπεία της σημηματοροϊκής δερματίτιδας. Το συγκεκριμένο ερώτημα θα μπορούσε να διαλευκανθεί εφαρμόζοντας το εκχύλισμα *R. officinalis* L. σε AhR +/+ και AhR -/- γενετικά τροποποιημένα πειραματόζωα στα οποία έχει αναπτυχθεί SD.

Πρέπει να τονισθεί ότι οι διαφορετικές φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος δεν έχουν τον ίδιο μηχανισμό παθογένεσης. Συνεπώς, συμπεράσματα που προκύπτουν από μια συγκεκριμένη δερματική νόσο δεν σημαίνει ότι κατ' ανάγκη θα ισχύουν και σε άλλες ή όλες τις δερματοπάθειες.

Σύμφωνα με δεδομένα από μελέτες αρκετών ερευνητών η ενεργοποίηση του AhR στο επίπεδο του δέρματος προκαλεί λύση της φλεγμονώδους εξεργασίας και κατ' επέκταση η χρήση ενώσεων που συμπεριφέρονται ως αγωνιστές του AhR αποτελούν μια θεραπευτική οδό για τις δερματοπάθειες που εμπεριέχουν την φλεγμονή αλλά και την μεσολάβηση του ανοσοποιητικού συστήματος (Adachi et al. 2001, Lin et al. 2007, Lin et al 2008, Lin et al 2012, Van den Bogaard et al. 2013, Di Meglio et al. 2014, Smith et al. 2017, Lin et al. 2018). Στο σημείο αυτό γεννιούνται τα εξής ερωτήματα:

- η *Malassezia* παράγει αυτές τις ενώσεις για να ανακουφίσει τη φλεγμονή και να καταστείλει συνεπώς την απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της ενεργοποίησης του AhR για δικό της όφελος; Οι Vlachos et al., (2012) έδειξαν ότι οι ινδολικές ενώσεις που παράγονται από την *Malassezia*, μέσω τις ικανότητας τους να ασκήσουν αγωνιστική δράση στον AhR, μπορούν να μειώσουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων στο δέρμα που εξαρτάται από τον TLR (Toll-like receptor).
- οι ινδολικές αυτές ενώσεις παράγονται σε επαρκείς ποσότητες για να κάνουν κάτι τέτοιο;
- αν η ανταγωνιστική δράση συγκεκριμένου εκχυλίσματος *R. officinalis* L. έναντι των παραγόμενων από το γένος *Malassezia* ινδολικών ενώσεων στα πλαίσια του AhR, είναι μέρος του θεραπευτικού μηχανισμού στην περίπτωση της SD, τότε η **συνεχής** παραγωγή και έκκριση αυτών των ινδολικών ενώσεων έχει ως

αποτέλεσμα την **παρατεταμένη** ενεργοποίηση του AhR που ευθύνεται για την εμφάνιση-επιδείνωση της δερματοπάθειας;

Ωστόσο, η κατάσταση σε μία πάθηση είναι πολύπλοκη με τη συμμετοχή πολλών κυττάρων και υποδοχέων. Επίσης, δεν είναι γνωστή η άμεση μυκητοκτόνος ή μυκητοστατική δράση που μπορεί να έχει το εκχύλισμα *R. officinalis* L. και οι επιλεγμένες ουσίες του έναντι της *Malassezia* όπως και η πιθανή επίδρασή τους επί αρκετών άλλων υποδοχέων που μπορεί να εμπλέκονται στην δράση του.

Το εκχύλισμα R4, που όπως προαναφέρθηκε συμπεριφέρεται ως ανταγωνιστής στον AhR, ήταν αποτελεσματικό στην περίπτωση της ψωρίασης, της σημηματοροϊκής δερματίτιδας και της αποϊκής δερματίτιδας, σε άνδρες και γυναίκες χωρίς δυσμενείς επιπτώσεις στο υγιές δέρμα (Kallimanis 2017).

Συγκεντρώνοντας όλα τα παραπάνω, είναι κατανοητό ότι η κατάσταση σχετικά με τον AhR και τις φλεγμονώδεις δερματικές παθήσεις είναι πολύ περίπλοκη. Είναι ενδιαφέρον ότι οι αγωνιστές του AhR όπως το Torinarof, η FICZ και η IND, είναι αποτελεσματικοί κατά της ψωρίασης (Adachi et al. 2001, Lin et al. 2007, Lin et al. 2008, Lin et al. 2012, Van den Bogaard et al. 2013, Di Meglio et al. 2014, Smith et al. 2017, Lin et al. 2018) και ταυτόχρονα το εκχύλισμα R4, ένας δοσο-εξαρτώμενος ανταγωνιστής του FICZ και της IND σε σχέση με τον AhR, έδειξε ότι είναι επίσης αποτελεσματικό σε αυτήν την δερματική νόσο (Kallimanis 2017).

Επίσης, η FICZ και η IND, αμφότεροι αγωνιστές του AhR, φαίνεται να εμπλέκονται αρνητικά σε ότι έχει να κάνει με τον καρκίνο του δέρματος (Gaitanis et al. 2011) και τη SD (Gaitanis et al. 2008, Magiatis et al. 2013), ενώ ταυτόχρονα είναι σε θέση να προκαλούν ύφεση της ψωρίασης κατά πλάκας (Di Meglio 2014, Lin et al. 2007, 2008, 2012, 2018).

Ωστόσο ασθένειες όπως η SD και η ψωρίαση είναι **πολυπαραγοντικές** με εμπλοκή διαφορετικών τύπων κυττάρων, υποδοχέων, κυτοκινών, γονιδίων και επομένως δεν είναι θέμα ενός μόνο υποδοχέα.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή **αποδεικνύεται για πρώτη φορά** ότι συγκεκριμένο εκχύλισμα *R. officinalis* L. συμπεριφέρεται ως ανταγωνιστής των TCDD, FICZ, PZ και της IND στον AhR, με αποτέλεσμα να μπορεί να μετριάσει ή και να εξαλείψει τις δράσεις των τελευταίων που έπονται της ενεργοποίησης του συγκεκριμένου υποδοχέα. Κατ' επέκταση, αυτό το εκχύλισμα θα μπορούσε να αποτελέσει δυνητικά νέα θεραπευτική προσέγγιση σε ασθένειες όπου η ενεργοποίηση του AhR από τους προαναφερόμενους αγωνιστές κατέχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια τους. Επιπλέον, οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν από τα φύλλα *R. officinalis* L. όπως: καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, 4',7-Ο-διμεθυλαπιγενίνη, 7-Ο-μεθύλ-επιπροσανόλη και μπετουλινικό οξύ, μπόρεσαν να μειώσουν την ενεργοποίηση του AhR από τη TCDD και ως εκ τούτου θα μπορούσαν να βρουν εφαρμογή ως δυνητικοί παράγοντες πρόληψης και θεραπείας σε καταστάσεις που πυροδοτούνται από την TCDD.

Σύμφωνα με τους Denison et al., (2017), η ενεργοποίηση του AhR μπορεί να οδηγήσει σε ένα εξαιρετικά διαφορετικό φάσμα βιολογικών και τοξικών επιδράσεων σε συνάρτηση με το πρόσδεμα, τον ιστό και το είδος.

Καταδείχθηκε ότι το εκχύλισμα φύλλων δεντρολίβανου συμπεριφέρεται ως συναγωνιστικός ανταγωνιστής της TCDD στον AhR, δεδομένου ότι συνδέεται στην ειδική θέση σύνδεσης της TCDD στον AhR. Ωστόσο, ένα ενδεχόμενο που δεν μπορεί να αποκλεισθεί, είναι ότι το σύμπλεγμα που σχηματίζεται μεταξύ του εκχυλίσματος *R. officinalis* L. (ή μεταβολιτών του) και του AhR μπορεί να ακολουθήσει ένα άλλο βιοχημικό μονοπάτι και να αλληλεπιδράσει με άλλα γονίδια από το συνηθισμένο, με τρόπο που εξαρτάται από το πρόσδεμα. Το *R.officinalis* L. και οι ουσίες του CA, CS και BA είναι ανταγωνιστές της TCDD, εμποδίζοντας τη σύνδεση της στον AhR και την ενεργοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων στο επανομαζόμενο κανονικό μονοπάτι (**canonical pathway**). Ωστόσο, το *R.officinalis* L. και οι CA, CS και BA θα μπορούσαν να δράσουν με άλλο τρόπο στο μη-κανονικό μονοπάτι (**non-canonical pathway**); Στην παρούσα διατριβή δεν έγινε τέτοιου είδους διερεύνηση και συνεπώς δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα παρά μόνο να τεθεί ως ιδέα για σκέψη και περαιτέρω έρευνα.

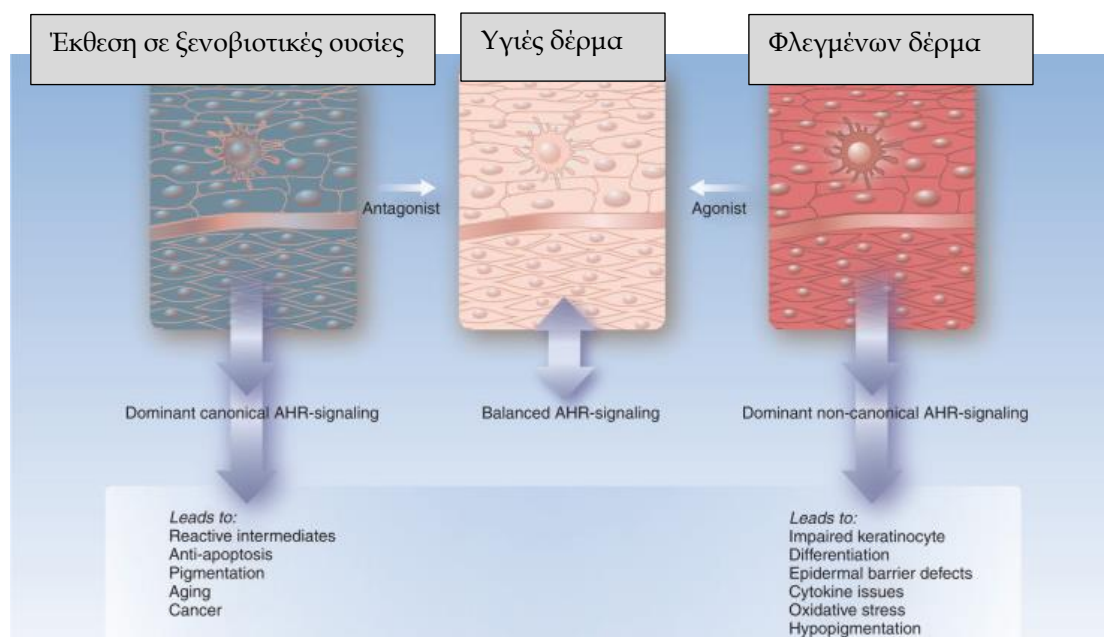
Η DMA και η 7MER έδειξαν ότι συμπεριφέρονται ως μερικοί αγωνιστές στο **canonical pathway**. θα μπορούσαν να δράσουν με τον ίδιο τρόπο και στο **non-canonical pathway**;

Η απιγενίνη θεωρείται ανταγωνιστής του AhR όσον αφορά την έκφραση του CYP1A1, αλλά ταυτόχρονα χαρακτηρίζεται ως αγωνιστής του ίδιου υποδοχέα σε σχέση με την έκφραση του UGT1A1 από πείραμα που έγινε σε καρκινικά κύτταρα Caco2 του παχέος εντέρου. Πράγματι, ενώ η απιγενίνη μειώνει τα επίπεδα του CYP1A1 συνάμα αυξάνει την ποσότητα του UGT1A1 μέσω της δράσης της στον AhR. Δηλαδή, στην περίπτωση αυτή, το αν η απιγενίνη θα συμπεριφερθεί ως αγωνιστής ή ανταγωνιστής του ίδιου υποδοχέα κρίνεται από το ποιο γονίδιο θα ενεργοποιηθεί ή αδρανοποιηθεί αντίστοιχα, με βάση το βιοχημικό μονοπάτι που ενεργοποιείται (Jin et al. 2018). Στην παρούσα διατριβή δεν διερευνήθηκε η έκφραση κάποιου άλλου γονιδίου πέραν αυτού που σχετίζεται με το CYP1A1 και συνεπώς δεν είναι γνωστό αν το συγκεκριμένο εκχύλισμα *R.officinalis* L. ή κάποια από τις εξεταζόμενες ουσίες θα μπορούσαν να έχουν μια συμπεριφορά αντίστοιχη της απιγενίνης.

Στην παρακάτω εικόνα 56 γίνεται ο διαχωρισμός των αποτελεσμάτων της ενεργοποίησης ή της απενεργοποίηση του AhR σε συνάρτηση με τον βιοχημικό καταρράχτη που κυριαρχεί: το **canonical** και το **non canonical pathway**. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη εικόνα στην περίπτωση των φλεγμονωδών παθήσεων επικρατεί η non canonical ενώ στην περίπτωση του καρκίνου υπερισχύει η canonical pathway. Στην συγκεκριμένη διατριβή διερευνήθηκε η δράση του *R. officinalis* και επιλεγμένων μεταβολιτών του στα πλαίσια του AhR έναντι ξеноβιοτικών ουσιών (TCDD, PZ, FICZ, IND) που αφορούν την **canonical pathway**. Δεν πρέπει να διαφεύγει της προσοχής ότι ο AhR είναι ένας υποδοχέας εξαρτώμενος από το πρόσδεμα, το είδος και την κατάσταση του κυττάρου-ιστού (Haarman et al. 2015).

Σύμφωνα με την εικόνα 56 στις καταστάσεις όπου το δέρμα φλεγμαίνει, η κυρίαρχη οδός του AhR είναι η **non canonical pathway**. Δεδομένου ότι, όπως επανειλημμένα αναφέρθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μελετήθηκε και καταδείχθηκε ο ανταγωνισμός του εκχυλίσματος δεντρολίβανου και των μεταβολιτών του (CA, CS και BA) στην **canonical pathway** του AhR, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι

αυτή η δράση δεν επηρεάζει θετικά ή αρνητικά το φλεγμένον δέρμα, αλλά ότι πρόκειται για μια ουδέτερη δράση ως προς την συγκεκριμένη κατάσταση του δέρματος;



Εικόνα 56

Σύνδεση μεταξύ καρκινικής και φλεγμονώδους κατάστασης με canonical pathway και non-canonical pathway του AhR (Haarman et al. 2015)

4.2 *Rosmarinus officinalis* L., AhR και καρκίνος του δέρματος

4.2.1 Ο ρόλος του AhR στην καρκινογένεση και τη διατήρηση νεοπλασίας του δέρματος από περιβαλλοντικούς παράγοντες

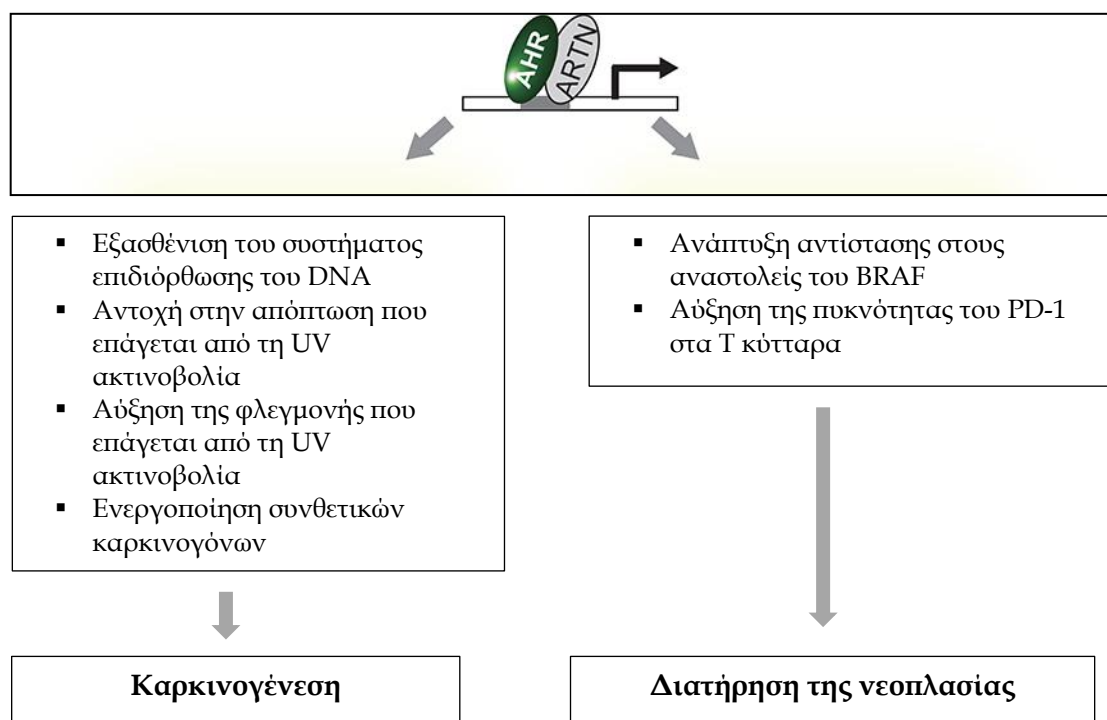
Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που θεωρείται ότι μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο του δέρματος μέσω της ενεργοποίησης του AhR περιλαμβάνουν:

- την **ακτινοβολία UV** (το 90% των καρκίνων του δέρματος μη μελανωματικού τύπου σχετίζονται με την έκθεση στην UVR) που προκαλεί την παραγωγή της FICZ (Fritsche et al. 2007, Gaitanis et al. 2011, Pollet et al. 2018)
- καρκινογόνες χημικές ουσίες στους **ατμοσφαιρικούς ρύπους**, όπως η TCDD και οι PAH
- **μεταβολίτες της *Malassezia*** όπως η IND, η ICZ, η FICZ και η μαλασεζίνη (Gaitanis et al. 2011)

Η ενεργοποίηση του AhR φαίνεται πως ευνοεί την **διατήρηση της νεοπλασίας** με διάφορους τρόπους λόγω της συμμετοχής του AhR:

- στην ανάπτυξη **αντίστασης στους αναστολείς του BRAF** διευκολύνοντας την υποτροπή της νεοπλασίας
- στην **αύξηση της πυκνότητας του PD-1** στα T κύτταρα με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να ξεφεύγουν της ανοσολογικής απάντησης (Hidaka et al. 2019).

Η ανάπτυξη θεραπευτικών παραγόντων που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του AhR είναι μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την πρόληψη και την αντιμετώπιση-θεραπεία των καρκίνων του δέρματος (εικόνα 57).



Εικόνα 57

Ενέργειες που προκύπτουν στα φυσιολογικά και στα καρκινικά κύτταρα μετά την ενεργοποίηση του AhR (Hidaka et al. 2019).

4.2.2 Αναστολή της δράσης AhR από *Rosmarinus officinalis* L.: δυνητικά οφέλη στον καρκίνο του δέρματος

Η αυξανόμενη παρουσία δυνητικά τοξικών περιβαλλοντικών ρύπων, μεγαλώνει την πιθανότητα για σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία του δέρματος. Συνεπώς είναι απαιτούμενη η ανάπτυξη μέσων που θα ελαττώνουν τις επιπτώσεις αυτές.

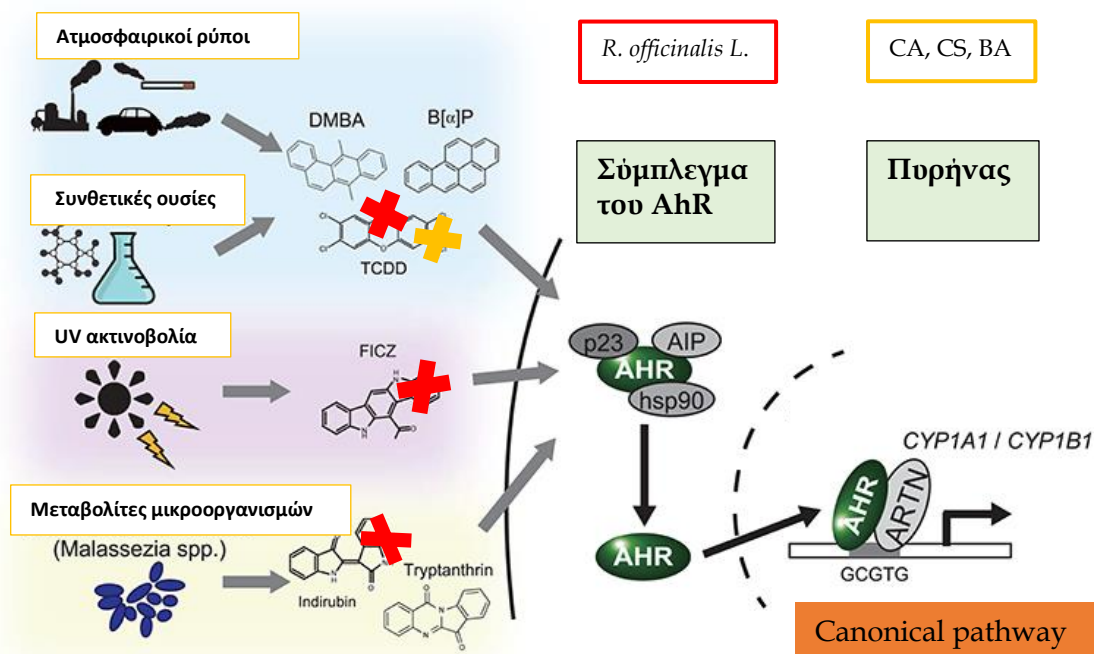
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το εκχύλισμα δεντρολίβανου θα μπορούσε να προστατεύσει δυνητικά από καρκινογένεση του δέρματος απότοκης ορισμένων περιβαλλοντικών παραγόντων όπως:

- από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία,
- από συγκεκριμένους μεταβολίτες του γένους *Malassezia*
- από περιβαλλοντικούς ρύπους όπως η TCDD

μέσω της ανταγωνιστικής επίδρασης του εκχυλίσματος στον AhR σε σχέση με τις FICZ, IND και TCDD (εικόνα 58).

Επιπρόσθετα, επειδή οι μεταβολίτες: καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη και μπετουλινικό οξύ έδειξαν ισχυρή δόσοεξαρτώμενη ανταγωνιστική δράση στον AhR έναντι της TCDD, θα μπορούσαν δυνητικά να είναι υποψήφιοι στη πρόληψη-αντιμετώπιση καρκίνου του δέρματος επαγόμενου από την TCDD.

Οι μεταβολίτες: 4',7-Ο-διμεθυλαπιγενίνη και 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροομανόλη ως μερικοί αγωνιστές του AhR έναντι της TCDD, μειώνουν την δράση της TCDD μέσω του εν λόγω υποδοχέα, αλλά σε μικρότερο βαθμό από τις προαναφερθείσες ουσίες που ασκούν μόνο ανταγωνιστική δράση.



Εικόνα 58

Καρκινογόνοι παράγοντες που ασκούν δράση μέσω ενεργοποίησης του AhR (Hidaka et al. 2019) και η προστατευτική-θεραπευτική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος *R. officinalis* L. (με κόκκινο) και των μεταβολιτών του (CA, CS και BA, με πορτοκαλί), λόγω ανταγωνισμού στον AhR σε σχέση με τις FICZ, IND και TCDD.

Από όλα τα παραπάνω φαίνεται ότι το μεθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου και οι ουσίες του CA, CS, BA, DMA και 7MER επηρεάζουν την canonical pathway του AhR, χωρίς να είναι γνωστή η επίδρασή τους στην non-canonical pathway.

Σε μια άλλη μελέτη με εκχύλισμα φύλλων *R. officinalis* L. σχετικά με το AhR, οι Amakura et al. (2014), διαπίστωσαν ότι το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα δεντρολίβανου προκάλεσε σημαντική ενεργοποίηση του AhR. Από τις ουσίες που ταυτοποιήθηκαν ως διεγέρτες του AhR σε αυτό το δείγμα ήταν η νεπιτρίνη και η ομοπλανταγενίνη, που είναι γλυκοσίδες φλαβόνης με σημαντική δοσοεξαρτώμενη αγωνιστική δράση έναντι του AhR. Φαινομενικά η συγκεκριμένη μελέτη διαφωνεί πλήρως με τα αποτελέσματά της παρούσας διατριβής. Ωστόσο, καμία από αυτές τις ουσίες δεν ήταν ίδια με τις ενώσεις του δεντρολίβανου που δοκιμάστηκαν στη παρούσα μελέτη. Η χημική σύσταση του εκχυλίσματος δεντρολίβανου από τους Amakura et al. (2014) ήταν διαφορετικό σε σχέση με αυτό της παρούσας διατριβής, αφού, σε κανένα από εκείνα δεν έγινε αναφορά σε διτερπενία αβιτανίου ή σε τριτερπενία. Επιπλέον, δεν χρησιμοποίησαν συν-εμβολιασμό με TCDD. Ωστόσο, αυτό είναι ένα πολύ καλό παράδειγμα για τη χημική ποικιλία και τη δράση των φυτικών

εκχυλισμάτων: **ίδιο φυτό, ίδια δρόγη, διαφορετικός χειρισμός, διαφορετικό εκχύλισμα, διαφορετική τελική δράση.**

Όπως συμβαίνει συνήθως με τα εκχυλίσματα φυτών, έτσι και το εκχύλισμα *R. officinalis* L. δεν συμπεριφέρεται ως ένα φάρμακο που περιέχει μια δραστική ένωση, αλλά ως ένα πολυπαραγοντικό φάρμακο, αφενός λόγω της συνέργειας μεταξύ των πολλών δραστικών συστατικών του, αφετέρου λόγω της πλειοτροπικής δράσης κάθε φαρμακολογικά σημαντικής ένωσης του.

Μια πολυπαραγοντική ασθένεια, όπως οι SD, ψωρίαση, καρκίνος, θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί καλύτερα με ένα πολυπαραγοντικό φάρμακο παρά με ένα φάρμακο που έχει υψηλή ειδικότητα για έναν μόνο μοριακό στόχο. Ένα φυσικό προϊόν μπορεί να δράσει με πλειοτροπικό τρόπο, προσφέροντας μια καλή πολυπαραγοντική θεραπεία. Επιπλέον, ένα φυσικό προϊόν μπορεί να έχει χαμηλή τοξικότητα στις συνήθεις δοσολογίες.

4.2.3 Εκχύλισμα φύλλων *Rosmarinus officinalis* L.: δονητική δράση επί του άξονα IDO1-Kyn-AhR (Indoleamine-pyrrole-2,3-dioxygenase-Kynurenine-Aryl hydrocarbon receptor)

Το μεθανολικό εκχύλισμα *Rosmarinus officinalis* L. είναι σε θέση να ανταγωνίζεται την δράση της FICZ και της IND που προέρχονται από το μεταβολισμό της τρυπτοφάνης. Επίσης όπως είδαμε, η FICZ είναι ο πιο ισχυρός αγωνιστής του AhR που γνωρίζουμε έως τώρα. Η κινουρενίνη, μια ακόμη ουσία που σχηματίζεται από τον μεταβολισμό της τρυπτοφάνης, συνδέεται στην ίδια περιοχή με αυτή της FICZ μέσω υδροφοβικών δεσμών (Seok et al. 2018), ωστόσο η ικανότητα δέσμευσης της κινουρενίνης στον AhR είναι πολύ πιο χαμηλή σε σύγκριση με τη FICZ (Stockinger et al. 2014).

Σύμφωνα με την εργασία των Seok et al., (2018) η κινουρενίνη, μια πολική ένωση, φαίνεται ότι όσον αφορά την ενεργοποίηση του AhR:

- δρα ως προ-πρόσδεμα, δηλαδή απαιτείται η μετατροπή της σε μόρια πολύ πιο δραστικά (κυρίως προϊόντα συμπίκνωσης)
- ότι η δράση της οφείλεται στην σύνδεση της στον AhR σε συγκεκριμένη υδρόφοβη κοιλότητα, δεδομένου ότι αλλαγές στα αμινοξέα της θέσης αυτής είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της ενεργοποίησης του AhR από την κινουρενίνη.

Η *in vitro* επώαση αθώων T λεμφοκυττάρων με τους υψηλής συγγένειας συνδετήρες TCDD και FICZ στον AhR, αυξάνει τους κυτταρικούς πληθυσμούς των κατασταλτικών Treg και των φλεγμονωδών κυττάρων Th17, αντίστοιχα. Είναι πλέον δεδομένο ότι η ενεργοποίηση του AhR προκαλεί ανοσολογική ανοχή ενεργώντας τόσο άμεσα στα δενδριτικά αντιγοπαρουσιαστικά κύτταρα όσο και έμμεσα αυξάνοντας τον πληθυσμό των ανοσοκατασταλτικών Tregs. Εκτός από την αναστολή του σχηματισμού ή την εξάντληση της κινουρενίνης, που παράγεται από τα ένζυμα IDO1/TDO2 και ενεργοποιεί τον AhR, μια εναλλακτική στρατηγική για την ανακατεύθυνση της ανοσίας έναντι της καταστολή του όγκου είναι να ρυθμιστεί η ενεργοποίηση του AhR μέσω συνθετικών ανταγωνιστών. Αν και πολλά συνθετικά και φυσικά μόρια είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν τη σηματοδότηση του AhR, μόνο μερικά μόρια είναι

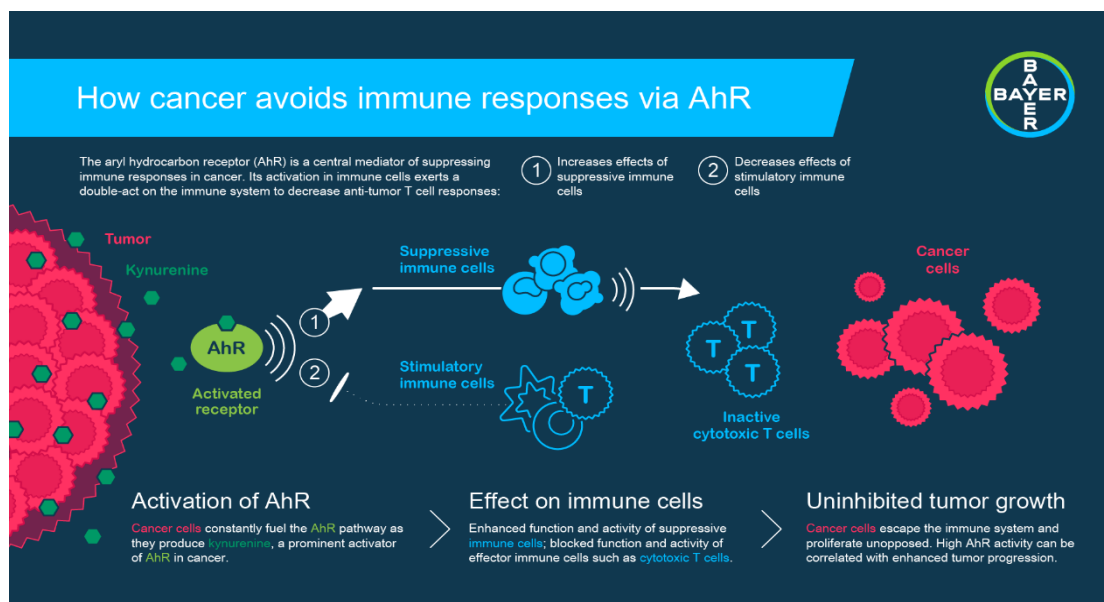
διαθέσιμα ως ανταγωνιστές του AhR, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για να βοηθήσουν στην περιγραφή των ανοσολογικών ρόλων του AhR (Cheong et al. 2018).

Δεδομένου ότι το μεθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου ανταγωνίζεται τόσο την TCDD όσο και την FICZ, που αλληλεπιδρούν με τον AhR σε διαφορετικά σημεία, προκύπτει ότι είναι σε θέση να ανταγωνιστεί τη δράση αγωνιστών και στις δυο διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης με τον υποδοχέα AhR, θέτοντας υποψηφιότητα ως πιθανός ανταγωνιστής της κυνουρενίνης.

Είναι λογικό και επόμενο ότι το μεθανολικό εκχύλισμα *R. officinalis* L. θα μπορούσε να έχει σημαντική δράση επί της έκφρασης της PD-1 στα κύτταρα του ανοσοποιητικού και στα νεοπλασματικά κύτταρα, που πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης του AhR. Κατ' επέκταση, η επικουρική χρήση *R. officinalis* L. μαζί με φάρμακα ανοσοθεραπείας του καρκίνου, όπως anti-PD-1 ή/και anti-PD-L1 ή άλλους παράγοντες που επιδρούν σε άλλα σημεία του άξονα IDO1-Κynuurenine-AhR, θα μπορούσε ίσως να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της αντικαρκινικής θεραπείας βελτιώνοντας την πρόγνωση της νόσου.

Οι CA, CS και BA, ως ισχυροί ανταγωνιστές της TCDD επί του AhR, θέτουν ισχυρή υποψηφιότητα ως **πιθανοί** ανταγωνιστές της κυνουρενίνης.

Οι ανταγωνιστές του AhR κατέχουν σημαντική θέση στη σύγχρονη θεραπευτική αντιμετώπιση διαφόρων τύπου καρκίνου. Για παράδειγμα ο φαρμακευτικός κολοσσός Bayer αναζητά ανταγωνιστές του AhR για την αντιμετώπιση του καρκίνου (<https://pharma.bayer.com/targeting-ahr-promising-new-approach-cancer-immunotherapy>)(εικόνα 59).



Εικόνα 59

Ο ρόλος του AhR στο φαινόμενο της ανοσολογικής ανοχής

(<https://pharma.bayer.com/targeting-ahr-promising-new-approach-cancer-immunotherapy>).

Η γερμανική Phenex Pharmaceuticals έχει ήδη ανακαλύψει συνθετικούς ανταγωνιστές του AhR, τους οποίους έχει δοκιμάσει *in vivo* σε πειραματόζωα με καρκίνο με πολύ καλά αποτελέσματα (www.phenex-pharma.com/wp-content/uploads/2020/01/AACR_2019_AhR.pdf).

Ιδιαίτερα σημαντικό είναι επίσης το παράδειγμα της εταιρείας βιοτεχνολογίας Hercules (<http://hercules-pharma.nl>) η οποία διεξάγει μελέτες με το μόριο HP163, που συμπεριφέρεται ως ανταγωνιστής του AhR, με στόχο τη θεραπεία του τριπλού αρνητικού καρκίνου του μαστού και γλοιοβλαστώματος.

4.2.4 Εκχύλισμα φύλλων *Rosmarinus officinalis* L.: δυνητικά επικουρικό στη θεραπεία μελανώματος σε περιπτώσεις χαμηλής αποτελεσματικότητας της ανοσοθεραπείας.

Οι αναστολείς BRAF και MEK (BRAFi και MEKi) είναι φάρμακα εκλογής για τη θεραπεία του μεταστατικού μελανώματος σε ασθενείς με μεταλλάξεις BRAFV600E, βελτιώνοντας σημαντικά την επιβίωση. Ωστόσο, η ανάπτυξη αντίστασης στους BRAFi (αναστολείς BRAF όπως vemurafenib, dabrafenib και encorafenib) και MEKi (αναστολείς MEK όπως cobimetinib, trametinib και binimetinib), παραμένει μια δύσκολη κλινική πρόκληση, δεδομένου ότι οι διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές για αυτούς τους ασθενείς καθίστανται περιορισμένες. Οι Leclair et al., (2020) διερεύνησαν το θεραπευτικό δυναμικό διάφορων φυσικών φλαβονοειδών (απιγενίνη, ρεσβερατρόλη κ.α.) ως ειδικών ανταγωνιστών του παράγοντα μεταγραφής AhR σε συνδυασμό με τους BRAFi. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν *in vitro* σε διάφορες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μελανώματος (μεταλλαγμένες για BRAFV600E) ευαίσθητες ή ανθεκτικές στο BRAFi και αξιολογήθηκε ο ρόλος των διαφόρων φλαβονοειδών στην ευαισθησία των κυττάρων στα BRAFi και την ικανότητά τους να αντισταθμίζουν την αντίσταση και τον διεσδυτικό φαινότυπο μελανώματος. Το αποτέλεσμα της μελέτης έδειξε ότι τα φλαβονοειδή:

- αυξάνουν την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στους BRAFi και μειώνουν την ομάδα των ανθεκτικών κυττάρων
- αποτρέπουν τη διήθηση και την μετανάστευση των ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων του μελανώματος
- προκαλούν την μείωση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον φαινότυπο αντίστασης
- τα προαναφερόμενα αποτελέσματα οφείλονται στην ικανότητα των φλαβονοειδών να δρουν ως ανταγωνιστές του AhR.

Σύμφωνα με τους συγγραφείς της έρευνας η χρήση των ανταγωνιστών του AhR ανοίγει νέες θεραπευτικές ευκαιρίες για τους ασθενείς με νόσο που είναι ανθεκτική στους BRAFi.

Είναι λογικό και επόμενο λοιπόν, ότι το μεθανολικό εκχύλισμα *Rosmarinus officinalis* L. και οι ουσίες του CS, CA και BA ως ανταγωνιστές του AhR θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντικούς υποψήφιους παράγοντες για τους ασθενείς με νόσο που είναι ανθεκτική στους BRAFi.

4.2.5 Δυνητική εφαρμογή σε άλλες μορφές καρκίνου

Το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (Basal Cell Carcinoma, BCC) ή αλλιώς, βασικοκυτταρικό επιθηλιώμα κυττάρων, αποτελεί τη συχνότερη μορφή καρκίνου του δέρματος, αλλά και τον συχνότερο καρκίνο του ανθρώπινου είδους. Παρόλο που αυτός ο καρκίνος είναι τοπικά διεισδυτικός, σπάνια δίνει μεταστάσεις και δεν θεωρείται απειλητικός για τη ζωή. Η πρόγνωση του σε περίπτωση έγκαιρης διάγνωσης είναι εξαιρετική. Αν αφεθεί χωρίς θεραπεία, το καρκίνωμα μπορεί να εξαπλωθεί, προκαλώντας νοσηρότητα ή και αναπηρίες, π.χ. σε περίπτωση που έχει εντοπισθεί στο έσω κανθό του ματιού. Τα αντι-PD-1 μονοκλωνικά αντισώματα έχουν δείξει αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητα στον έλεγχο της ανάπτυξης πολλαπλών τύπων όγκων. Ωστόσο, στο BCC που δεν μπορεί να ελεγχθεί ή στο μεταστατικό BCC, δεν έχουν δοκιμαστεί σε μεγάλο βαθμό. Οι Lipson et al., (2017) διερευνήσαν την έκφραση του PD-L1 και τη συσχέτιση της με την έκφραση του PD-1 στο μικροπεριβάλλον του BCC. Το 22% των δειγμάτων BCC παρουσίασε έκφραση του PD-L1 στα καρκινικά κύτταρα, ενώ το 82% των δειγμάτων παρουσίασε έκφραση του PD-1 στα λεμφοκύτταρα που διεισδύουν στον όγκο και στα μακροφάγα. Επιπλέον, οι ερευνητές παρουσίασαν για πρώτη φορά την θετική ανταπόκριση ενός ασθενή με μεταστατικό καρκίνωμα βασικών κυττάρων PD-L1(+), στο pembrolizumab (αντι-PD-1). Ο ασθενής για 14 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας παρέμεινε σε μερική ανταπόκριση.

Τα όσα αναφέρθηκαν για το εκχύλισμα *Rosmarinus officinalis* L. αναφορικά με τον καρκίνο του δέρματος ίσως να μπορούσαν μετά από περαιτέρω μελέτη να βρουν εφαρμογή σε περιπτώσεις καρκίνου όπου η ενεργοποίηση του AhR παίζει καταστρεπτικό ρόλο. Για παράδειγμα, οι Cole et al., (2003), ανέφεραν ότι ο κίνδυνος καρκίνου στον άνθρωπο ήταν μέτριος για άτομα που εκτέθηκαν σε TCDD. Έδειξαν ωστόσο ότι ο κίνδυνος καρκίνου αυξήθηκε όταν η έκθεση σε TCDD συνδυάστηκε με άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως ο καπνός των τσιγάρων. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι ο καπνός του τσιγάρου έχει εξαιρετικά υψηλά επίπεδα διοξινών και ενώσεων που μοιάζουν με τις διοξίνες οι οποίες είναι αγωνιστές του AhR. Επομένως, η ταυτόχρονη έκθεση της TCDD και άλλων χημικών ουσιών, όπως των καρκινογόνων των τσιγάρων, μπορεί να έχει συνεργικές επιπτώσεις στον καρκίνο (Kasai et al. 2006).

Ο καπνός του τσιγάρου και το καρκινογόνο B[a]P προκαλούν την έκφραση της PD-L1 στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα *in vitro* και *in vivo*, η οποία μεσολαβείται από τον AhR. Το αντίσωμα κατά της PD-L1 ή η ανεπάρκεια στο AhR καταστέλλει σημαντικά τον καρκίνο του πνεύμονα που προκαλείται από το BaP. Οι αναστολείς του AhR ασκούν σημαντική αντικαρκινική δράση και συνεργάζονται με τα αντισώματα αντι-PD-L1 σε μοντέλα ποντικού με καρκίνο του πνεύμονα. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο καπνός του καπνού επιτρέπει στα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων να ξεφύγουν από την προσαρμοστική ανοσία για να προωθήσουν την νεοπλασία και ότι ο AhR αντιπροσωπεύει έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο. Πράγματι η επαγωγή της PD-L1 μεσολαβείται από τον AhR (Wang et al. 2019)

Η α-ναφθοφλαβόνη ανταγωνίζεται (ANF, alpha-Naphthoflavone) την δράση της TCDD έναντι του AhR (Blank et al. 1987). Η ANF ως ανταγωνιστής του AhR παρουσίασε αντικαρκινική δράση *in vivo* σε ποντικούς κατά του καρκίνου του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και του ινοσαρκώματος. Η ANF κατέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου και ενίσχυσε την αποτελεσματικότητα του αντισώματος αντι-PD-L1 (Wang et al. 2019).

Περισσότερο από το 87% των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα οφείλονται στον καπνό του τσιγάρου ο οποίος επάγει την PD-L1 στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να αποφεύγουν την ανοσολογική απάντηση (Hecht 2012, Wang et al. 2019).

4.3 *Rosmarinus officinalis* L. και διοξίνες

Είναι αδιαμφισβήτητο γεγονός ότι όλοι μας έχουμε κάποιο ποσοστό διοξίνης στο σώμα μας. Η διατροφική πρόσληψη ζωικού λίπους είναι ο κυριότερος τρόπος έκθεσης στο γενικό πληθυσμό. Όταν οι διοξίνες εισέρχονται στο σώμα συσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό και παραμένουν εκεί με χρόνο ημίσειας ζωής τα 7 χρόνια κατά μέσο όρο. Ένα από τα πιο ισχυρά γνωστά τοξικά μόρια και η πιο γνωστή διοξίνη είναι η TCDD. Η μακροχρόνια έκθεση του οργανισμού στη TCDD σχετίζεται με διαταραχές στο νευρικό, ανοσοποιητικό, αναπαραγωγικό και ενδοκρινικό σύστημα. Η ταξινόμησή της αναβαθμίστηκε από «πιθανό ανθρώπινο καρκινογόνο» (ομάδα 2B) σε «ανθρώπινο καρκινογόνο» (ομάδα 1) σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον καρκίνο (IARC) το 1997. Η TCDD επιφέρει μια μεγάλη ποικιλία τοξικών και βιοχημικών επιδράσεων μέσω του AhR (Pelclová et al. 2006, Sorg et al. 2014, Mandal et al. 2005).

Η **χλωρακμή**, που όπως προαναφέρθηκε αποτελεί ένα ιδιαίτερο κλινικό σημείο της δηλητηρίασης από TCDD στους ανθρώπους (Panteleyev et al. 2006), χαρακτηρίζεται από την ισχυρή και κυρίως παρατεταμένη ενεργοποίηση του AhR από μέρους των διοξινών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υπερβολική κερατινοποίηση των κερατινοκυττάρων και των επιθηλιακών κυττάρων των σημηματογόνων αδένων (Furue et al. 2018, Ju et al. 2011).

Το εκχύλισμα φύλλων *Rosmarinus officinalis* και οι μεταβολίτες του (CA, CS και BA) ως ανταγωνιστές της TCDD έναντι του AhR, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αποφυγή ή την μείωση της τοξικότητας του στο νευρικό, στο ανοσοποιητικό, στο αναπαραγωγικό και στο ενδοκρινικό σύστημα, αλλά και στην περίπτωση της χλωρακμής, που προκύπτει από τη χρόνια έκθεση του οργανισμού στη TCDD και μεσολαβείται από τον AhR.

4.4 Το *Rosmarinus officinalis* L. και οι ενώσεις του CA, CS, BA ως αναστολείς της TCDD έναντι του AhR και ως ενεργοποιητές του Nrf2

Σύμφωνα με τους Haarmann-Stemmann et al., (2012), οι ενώσεις που είναι ικανές να ανταγωνίζονται την ενεργοποίηση του AhR και να διεγείρουν το σύστημα Nrf2, είναι πιθανώς οι πιο ισχυροί υποψήφιοι για την πρόληψη των σοβαρών επιπτώσεων στην υγεία που προκαλούνται από τα περιβαλλοντικούς τοξικούς παράγοντες όπως είναι οι διοξίνες. Η αναστολή του AhR μπορεί να μειώσει την ενεργοποίηση των χημικών ουσιών που μεσολαβείται από το CYP1 ενώ η αντιοξειδωτική άμυνα που

ξεκινά από την διέγερση του Nrf2 μπορεί ταυτόχρονα να απομακρύνει τους υπόλοιπους αντιδραστικούς μεταβολίτες.

Το CA, η CS και το BA και το εκχύλισμα *R. officinalis* L. (23,2% σε καρνοσικό οξύ και 12,4% σε καρνοσόλη) είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν τον Nrf2 (Satoh et al. 2008, Chen et al. 2011, Lipton et al. 2016, Tong et al. 2017, Mimura et al. 2019, Li et al. 2019, Yan et al. 2018, Wang et al. 2018, Wanga et al. 2020).

4.5 Ο ρόλος των υποκαταστατών σε συγκεκριμένες ενώσεις στην αλλαγή της συμπεριφοράς τους έναντι του AhR

Αξιζει να σημειωθεί ότι η απιγενίνη δρα ως ανταγωνιστής του AhR (Xue et al. 2017, Jin et al. 2018) ενώ η DMA ως μερικός αγωνιστής. Φαίνεται λοιπόν ότι στο μόριο της απιγενίνης η διπλή αντικατάσταση του υδρογόνου των -OH στις θέσεις 4' και 7 με μεθύλιο, οδηγεί σε αλλαγή της συμπεριφοράς της επί του AhR. Πρόκειται για μια πολύ σημαντική παρατήρηση διότι με μια απλή χημική αντίδραση ίσως να μπορούμε να αλλάξουμε τη συμπεριφορά και άλλων ανταγωνιστών ή αγωνιστών κατά το δοκούν.

Με το ίδιο σκεπτικό θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον αν γνωρίζαμε τη δράση της ροομανόλης έναντι του AhR. Αν δηλαδή η αντικατάσταση του υδρογόνου του -OH στη θέση 7 της ροομανόλης με το -CH₃ προς 7MER θα είχε ως αποτέλεσμα την αλλαγή της χημικής συγγένειας με τον AhR.

4.6 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματά της παρούσας διδακτορικής διατριβής **καταδεικνύουν για πρώτη φορά ότι:**

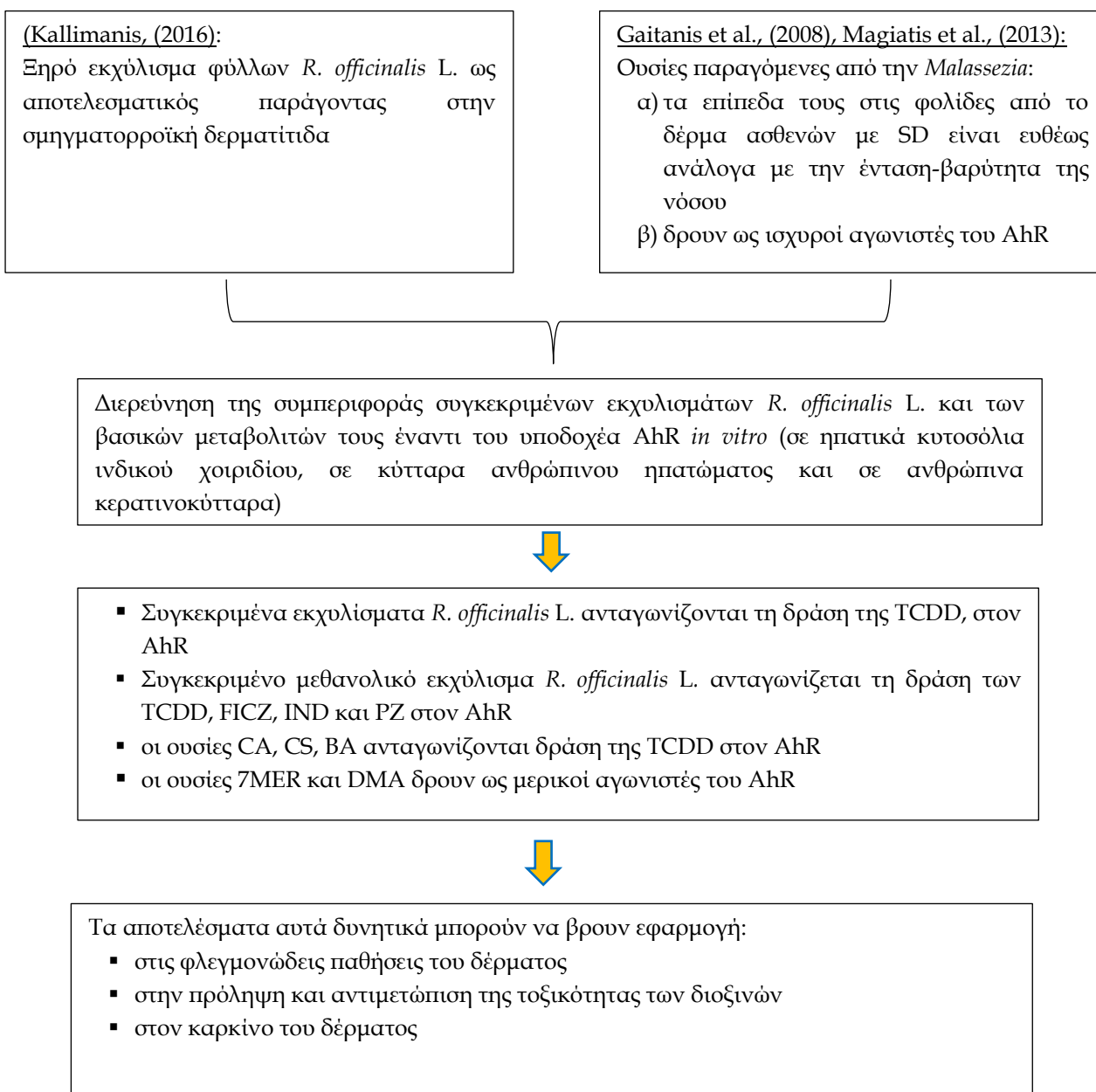
- το μεθανολικό εκχύλισμα *R. officinalis* και οι μεταβολίτες του (CA, CS, BA, DMA και 7MER) επηρεάζουν την canonical pathway του AhR. Δεν υπάρχουν δεδομένα δράσης τους στην non-canonical pathway
- συγκεκριμένο μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων *R. officinalis* παρουσιάζει *in vitro* ισχυρή ανταγωνιστική δόσοεξαρτώμενη δράση στον AhR έναντι διαφόρων αγωνιστών όπως η TCDD, η IND, η FICZ και η PZ. Ο ανταγωνισμός αυτός αφορά την canonical pathway του AhR
- οι μεταβολίτες του *R. officinalis* 7MER και DMA συμπεριφέρονται ως μερικοί αγωνιστές του AhR *in vitro* έναντι της TCDD στην canonical pathway του AhR
- η απιγενίνη δρα ως ανταγωνιστής του AhR (Jin et al. 2018) ενώ η DMA δρα ως μερικός αγωνιστής. Φαίνεται λοιπόν ότι η διπλή αντικατάσταση του -OH με αυτή του -OCH₃ στις θέσεις 4' και 7 στο μόριο της απιγενίνης, οδηγεί σε αλλαγή της συμπεριφοράς της επί του AhR: από ανταγωνιστής μετατρέπεται σε μερικό αγωνιστή (DMA)
- η αναστολή της δράσης του AhR από συγκεκριμένο μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων δεντρολίβανου, είναι πιθανό να συμβάλει στην αντιφλεγμονώδη δράση του βοτάνου έναντι των δερματικών φλεγμονωδών παθήσεων (όπως π.χ. SD), στις οποίες η ενεργοποίηση του AhR κατέχει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια τους
- η αναστολή της δράσης του AhR από το συγκεκριμένο μεθανολικό εκχύλισμα φύλλων δεντρολίβανου είναι πιθανό να συμβάλει στην αντικαρκινική δράση

του εκχυλίσματος επειδή θα μπορούσε να αποτρέψει τη βλάβη των δερματικών κυττάρων που προκαλείται:

- α) από την υπεριώδη ακτινοβολία μέσω FICZ,
 - β) από περιβαλλοντικούς ρύπους όπως η TCDD
 - γ) από τους μεταβολίτες του γένους *Malassezia* όπως είναι η FICZ, η PZ και η ιντιρουμπίνη.
- προστίθεται ένας νέος πιθανός μηχανισμός στη γνωστή αντικαρκινική δράση εκχυλίσματος δεντρολίβανου που είναι ο ανταγωνισμός του AhR έναντι περιβαλλοντικών καρκινογόνων.
 - δεδομένου ότι το μεθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου ανταγωνίζεται τόσο την TCDD όσο και την FICZ, που αλληλεπιδρούν με τον AhR σε διαφορετικά σημεία, προκύπτει ότι είναι σε θέση να ανταγωνιστεί τη δράση αγωνιστών και στις δυο διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης με τον υποδοχέα AhR
 - δεδομένου ότι:
 - α) το συγκεκριμένο εκχύλισμα δεντρολίβανου και οι μεταβολίτες του (CA, CS και BA), συμπεριφέρονται ως ανταγωνιστές του AhR
 - β) από την βιβλιογραφία το εκχύλισμα δεντρολίβανου και οι ουσίες του (CA, CS και BA), συμπεριφέρονται ως ενεργοποιητές του Nrf2συμπεραίνεται ότι το δεντρολίβανο και οι ουσίες του CA, CS και BA ανήκουν στην κατηγορία των φυσικών ουσιών που είναι ταυτόχρονα ανταγωνιστές του AhR και ενεργοποιητές του Nrf2
 - δεδομένου ότι το δεντρολίβανο και οι μεταβολίτες (CA, CS και BA), συμπεριφέρονται ως ανταγωνιστές του AhR και ως ενεργοποιητές του Nrf2, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν δυνητικά στην αντιμετώπιση της χλωρακμής και γενικότερα στις καταστάσεις οξειδωτικού στρες.
 - το εκχύλισμα φύλλων δεντρολίβανου και οι μεταβολίτες CA, CS και BA ως ανταγωνιστές της TCDD, την πιο γνωστή και πιο τοξική διοξίνη, έναντι του AhR, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως συμπλήρωμα διατροφής για την μείωση της τοξικότητας διαφόρων συστημάτων (νευρικό, ανοσοποιητικό, ενδοκρινικό κ.τ.λ.) μετά από χρόνια έκθεση του οργανισμού σε TCDD, δεδομένου ότι το δεντρολίβανο έχει εξαιρετικά χαμηλή τοξικότητα και έχει χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally Recognized as Safe), ενώ έχει εγκριθεί ως “antioxidant food preservative” (αντιοξειδωτικό για χρήση ως συντηρητικό των τροφών) (Aguilar et al. 2008, Petiwala et al. 2015).

4.7 Σύνοψη κεφαλαίου 2

Πίνακας 60



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ_ ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

Ποιοτική και ποσοτική μελέτη των μεταβολιτών ροσμανόλη, 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη, καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ, 4',7-Ο-διμεθυλαπιγενίνη και μπετουλινικό οξύ, σε 61 είδη της οικογένειας των Χειλανθών (Lamiaceae) που φύονται-καλλιεργούνται στην Ελλάδα.

*“[...] Όταν η σκέψη δίνει το φως
η σιωπή γίνεται μελωδία [...].”*

1. Εισαγωγή

Όπως καταδείχθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο οι μεταβολίτες καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, μπετουλινικό οξύ και το εκχύλισμα δεντρολίβανου ασκούν ανταγωνιστική δράση στον AhR, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την ενεργοποίηση του από ισχυρούς αγωνιστές όπως είναι η TCDD, η PZ, η FICZ και η IND, ενώ η 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη και η 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνη δρουν ως μερικοί αγωνιστές του AhR.

Σε αυτό το κεφάλαιο ερευνήθηκαν ποσοτικά και ποιοτικά, ως προς τους μεταβολίτες CA, CS, 7MER, RO, 12MCA, BA και DMA, τα μεθανολικά εκχυλίσματα 61 φυτών που φύονται-καλλιεργούνται στην Ελλάδα της οικογένειας των Χειλανθών, με το σκεπτικό μήπως κάποιο άλλο φυτό αποτελεί καλύτερη πηγή για μία, για μερικές ή για όλες τις προαναφερόμενες ουσίες.

2. Διαδικασία εκχύλισης

Ως μέθοδος εκχύλισης ακολουθήθηκε η εμβροχή σε λουτρό με υπερήχους (ultrasonic bath), έτσι ώστε να περιοριστεί ο χρόνος διαδικασίας και να αυξηθεί η απόδοση της εκχύλισης.

Για την επιλογή του πολικού διαλύτη πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα με τα αποξηραμένα φύλλα *R. officinalis*, που είχαν προηγουμένως κονιοποιηθεί, που εκχυλίστηκαν (σε αναλογία 1:30 w/v για 1h σε ultrasonic bath) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη μεθανόλη (εκχύλισμα A) και αιθανόλη (εκχύλισμα B). Με το πέρας της μίας ώρας τα δύο εκχυλίσματα διηθήθηκαν με ηθμό χάρτου και συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού. Τα δύο ξηρά εκχυλίσματα, αιθανολικό και μεθανολικό, αναλύθηκαν με ¹H-NMR (CDCl₃). Η ποσοτικοποίηση των εκχυλισμάτων έδειξε ότι με την μεθανόλη υπήρχε σαφώς υψηλότερη απόδοση σε ότι αφορά τις υπό εξέταση ουσίες.

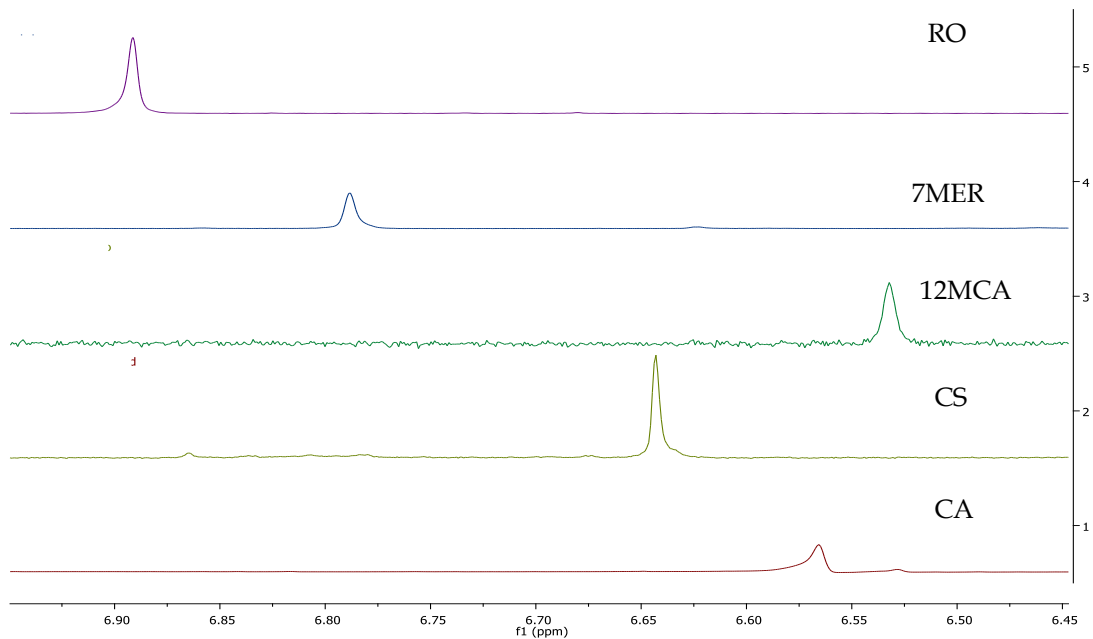
Οι αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχυλιστική διαδικασία ήταν 1 γραμμάριο δρόγης (αποξηραμένα κονιοποιημένα φύλλα) σε 30 mL μεθανόλης (HPLC grade). Ως χρόνος εκχύλισης ορίστηκαν τα 30min σε λουτρό υπερήχων (ultrasonic bath). Ακολούθησε διήθηση σε χάρτινο ηθμό. Το εκχύλισμα συλλέχθηκε, συμπυκνώθηκε υπό κενό (Rotavapor V-200 και heating bath B-490 Büchi, 40 °C) και αναλύθηκε.

3. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων

Τόσο η ποιοτική όσο και η ποσοτική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) όπως έχει αναλυθεί στο γενικό πειραματικό μέρος.

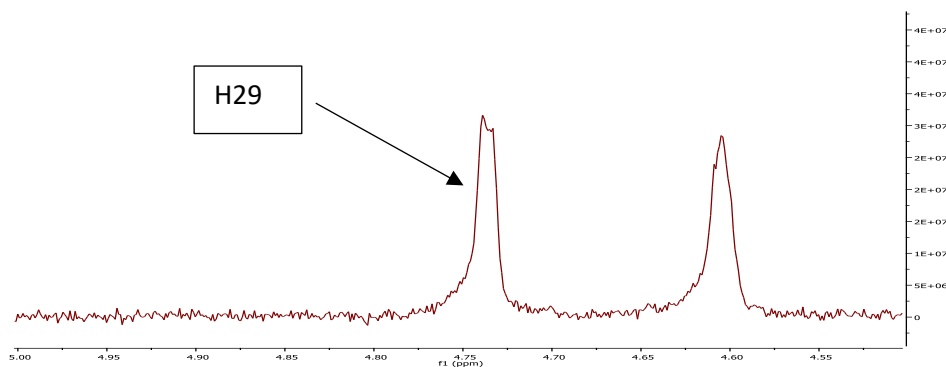
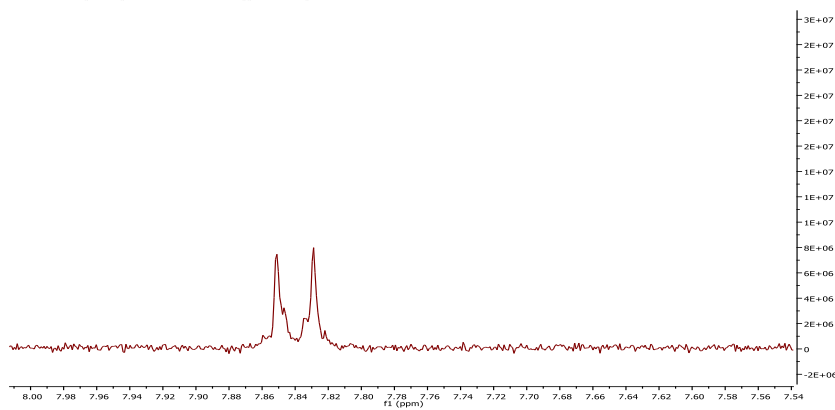
Η ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων έγινε με σύγκριση των φασμάτων τους με αυτά των καθαρών ουσιών που απομονώθηκαν όπως περιγράφηκε λεπτομερώς στο κεφάλαιο 1 του ειδικού εργαστηριακού μέρους της παρούσας διατριβής.

Οι κορυφές ολοκλήρωσης των εξεταζόμενων ουσιών παρουσιάζονται στις εικόνες 60 και 59.



Εικόνα 60

Φάσματα ¹H-NMR (CDCl₃). CA: καρνοσικό οξύ, CS: καρνοσόλη, 12MCA: 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ, 7MER: 7-O-μεθυλ-*επι*-ροσμανόλη, RO: ροσμανόλη σε 6,45-6,95 ppm, με έμφαση στις κορυφές ολοκλήρωσης.



Εικόνα 61

Φάσμα ¹H-NMR (CDCl₃) της 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνης σε 7,54-8,00 ppm, με έμφαση στην διπλή κορυφή ολοκλήρωσης στα 7,84 ppm και του μπετουλινικού οξέος με έμφαση στη μονή κορυφή ολοκλήρωσης στα 4,73 ppm.

4. Αποτελέσματα

Στις δρόγες όπου η ανάλυση $^1\text{H-NMR}$ έδειξε την ύπαρξη ενός τουλάχιστον από τους υπό ανίχνευση μεταβολίτες, έγιναν 3 εκχυλίσαις και αντίστοιχες μετρήσεις στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$.

Για τις δρόγες που εξετάστηκαν για πρώτη φορά και εμφανίστηκε από το πρώτο εκχύλισμα ότι δεν υπήρχαν οι υπό ανίχνευση ουσίες δεν έγιναν άλλες μετρήσεις.

Σε όσες δρόγες φάνηκε από το πρώτο φάσμα του εκχυλίσματος ότι δεν υπάρχουν οι εξεταζόμενες ουσίες, αλλά υπήρχε βιβλιογραφία με θετικά αποτελέσματα, τότε επαναλήφθηκε το πείραμα και αν και το δεύτερο ήταν αρνητικό δεν έγιναν περαιτέρω μετρήσεις.

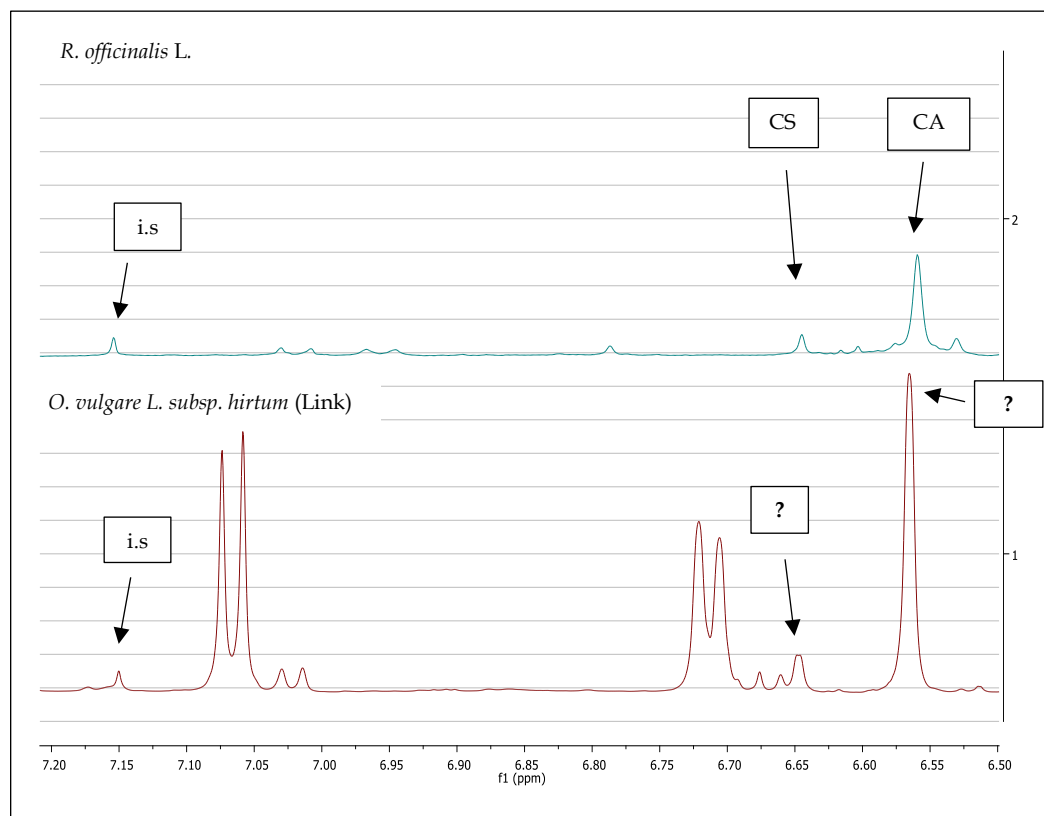
4.1 Φυτά που δεν περιείχαν καμία από τις εξεταζόμενες ουσίες

Η ανάλυση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ έδειξε ότι τα παρακάτω φυτά (σε παρένθεση αναγράφεται το βάρος σε γραμμάρια του μεθανολικού ξηρού εκχυλίσματος που προκύπτει από 1 γραμμάριο της εκάστοτε ξηρής δρόγης): *Salvia superba* Vilm. (0,0877), *Salvia bucharica* Popov. (0,0858), *Salvia desoleana* Atzei and V.Picci (0,0868), *Salvia transylvanica* Schur (0,1102), *Phlomis cretica* C. Presl (0,1046), *Phlomis fruticosa* L. (0,0980), *Mentha pulegium* L. (0,0551), *Sideritis clandestina* Chaub and Bory (0,1424), *Hyssopus officinalis* L. (0,0566), *Satureja thymbra* L. (0,0434), *Betonica officinalis* L. (0,0943), *Nepeta cataria* L. (0,1033), *Marrubium album* Garsault (0,0815), *Satureja juliana* L. (0,0380), *Stachys candida* subsp. *chrysantha* (Boiss. and Heldr.) (0,0398), *Stachys iva* Griseb (0,0752), *Teucrium capitatum* L. (0,1026), *Teucrium flavum* L. (0,1183), *Lamium album* L. (0,0733), *Lamium garganicum* L. (0,1191), *Ballota acetabulosa* L. (0,0777), *Nepeta melissifolia* Lam., *Stachys officinalis* (L.) Trevis (0,1612), *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Link) (0,0918), *Origanum majorana* L. (0,0643), *Origanum dictamnus* L. (0,0997), *Coridothymus capitatus* (L.) Rchb.f. (0,0867), *Salvia cadmica* Boiss. (0,0782), *Salvia ringens* Sm. (0,0683), *Salvia chionantha* Boiss. (0,0458), *Salvia sclarea turkestanica* (Noter) Mottet (0,0791), *Salvia sclarea* L. (0,1354), *Salvia scabiosifolia* Lam. (0,0374), *Salvia misella* Kunth (0,0662), *Salvia dominica* L. (0,1048), *Salvia leucantha* Cav. (0,0796), *Salvia recognita* Fisch. & C.A.Mey (0,1306) δεν περιείχαν καμία από τις εξεταζόμενες ουσίες.

Η ποιοτική ανάλυση $^1\text{H-NMR}$ φάσματος του μεθανολικού εκχυλίσματος *Salvia sclarea* L. έδειξε ότι δεν ταυτοποιήθηκε κάποιο διτερπένιο του αβιετανίου. Το αποτέλεσμα αυτό δεν συμπίπτει με τις εργασίες των Sulniute et al., (2017) που ανίχνευσαν το CA (~195 $\mu\text{g/g}$ ξηρής δρόγης) σε αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού, και των Fotounvat et al., (2019), που επίσης ταυτοποίησαν το CA σε μεθανολικά εκχυλίσματα *S. sclarea* L. προερχόμενα από 3 διαφορετικές περιοχές του Ιράν. Στις δύο προαναφερόμενες έρευνες δεν γίνεται αναφορά για την παρουσία ή όχι της καρνοσόλης. Το αποτέλεσμα της *S. sclarea* L. στην παρούσα μελέτη είναι ίδιο με αυτό της μελέτης των Abreu et al., (2008) όπου δεν ανίχνευσαν κανένα διτερπένιο αβιετανίου στο εν λόγω φυτό.

Σε κανένα από τα 3 είδη του γένους *Origanum* (*O. vulgare* subsp. *hirtum* (Link), *O. majorana* L., *O. dictamnus* L.) που μελετήθηκαν δεν ταυτοποιήθηκε κάποια από τις εξεταζόμενες ουσίες. Ωστόσο, αρχικά, βάσει του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των τριών φυτών του είδους *Origanum* φαίνεται ότι ίσως να υπάρχουν η CA και η CS (σε

συμφωνία με την βιβλιογραφία, τουλάχιστον όσον αφορά το *O. majorana* L.). Κατόπιν έγινε σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των μεθανολικών εκχυλισμάτων των τριών φυτών του γένους *Origanum* και του *R. officinalis* L., όπου πάλι φαινόταν ότι μπορούν να ταυτοποιηθούν τόσο το CA όσο και η CS (εικόνα 62).



Εικόνα 62

Σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) μεθανολικών εκχυλισμάτων των *R. officinalis* L. και *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) μεταξύ 6,50 και 7,20 ppm. Στα 7,15 ppm εμφανίζεται η απλή κορυφή του εσωτερικού προτύπου (i.s), στα 6,64 ppm η απλή κορυφή του H-14 της καρνοσόλης (CS) (ολοκλήρωση για 1H) και στα 6,56 ppm η απλή κορυφή του H-14 του καρνοσικού οξέος (CA) (ολοκλήρωση για 1H).

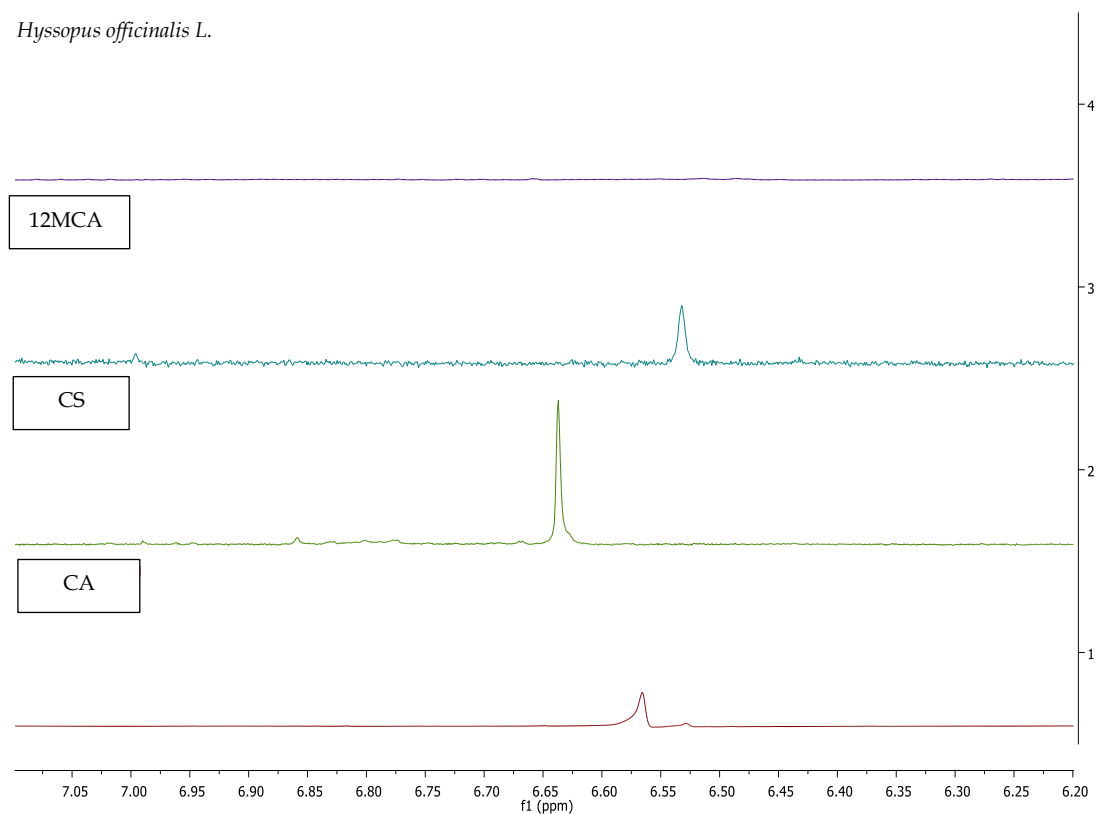
Η μεγάλη τιμή ολοκλήρωσης της υποτιθέμενης κορυφής του CA στο εκχύλισμα του *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) μας οδήγησε στο να ληφθεί φάσμα του εκχυλίσματος και σε CD_3OD , όπου διαπιστώθηκε ότι οι υπό διερεύνηση κορυφές δεν έχουν να κάνουν με το CA ή την CS. Η ίδια τακτική ακολουθήθηκε και με τα φυτά *O. majorana* L. και *O. dictamnus* L. Εκτός της χρήσης και άλλου δευτεριωμένου διαλύτη για τη λήψη φάσματος, μια άλλη μέθοδος για την λύση τέτοιων προβλημάτων ταυτοποίησης είναι η προσθήκη μιας ποσότητας της καθαρής-απομονωμένης ουσίας που θέλουμε να ταυτοποιήσουμε στο υπό εξέταση εκχύλισμα, με ακόλουθη λήψη νέου φάσματος $^1\text{H-NMR}$. Αν η ουσία υπήρχε αρχικά στο εκχύλισμα τότε η κορυφή της θα είναι μεγαλύτερη από αυτή του αρχικού φάσματος. Αν η ουσία δεν υπήρχε δεν θα έχουμε αύξηση της προηγούμενης κορυφής στο φάσμα, αλλά την εμφάνιση νέων κορυφών που αντιστοιχούν στην πρόσθετη καθαρή ουσία. Στη μελέτη των Hossain et

al., (2010) ταυτοποιήθηκε στο *O. vulgare* L., Τουρκικής προέλευσης, τόσο το καρνοσικό οξύ όσο και η καρνοσόλη, χωρίς ωστόσο να αναφερθούν ποσοτικά δεδομένα. Η μέθοδος που χρησιμοποίησαν ήταν LC-ESI-MS/MS. Οι Hernandez et al., (2009) επίσης ταυτοποίησαν καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη στο *O. vulgare* L. Μεξικανικής προέλευσης. Οι Vagi et al., (2005), ταυτοποίησαν καρνοσόλη αλλά όχι καρνοσικό οξύ στην *O. majorana* L., αποδίδοντας το αποτέλεσμα αυτό στην επεξεργασία της δρόγης, την ευαισθησία του καρνοσικού οξέος στους πολικούς διαλύτες και στην αυξημένη θερμοκρασία (έγχυμα 90-100 ° C με αποσταγμένο νερό 30 min σε υδατόλουτρο, εκχύλιση σε Soxhlet χρησιμοποιώντας n-εξάνιο και αιθανόλη για 6 h).

Στο κεφαλοθύμαρο, *Coridothymus capitatus* L., δεν ταυτοποιήθηκε καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη ή κάποια άλλη από τις εξεταζόμενες ουσίες. Οι Hossain et al., (2010), ταυτοποίησαν σε θυμάρι Τουρκικής προέλευσης, καρνοσόλη και 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ αλλά όχι καρνοσικό οξύ. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές εκχύλισαν το φυτό με μίγμα μεθανόλη/νερό =80/20, Στη μελέτη αυτή το θυμάρι αναφέρεται με το αγγλοσαξονικό *Thyme*, χωρίς να υπάρχει η λατινική διωνυμική ονομασία του φυτού. Το πιο πιθανό είναι να εννοούν το *Thymus vulgaris* L., ωστόσο να σημειωθεί ότι το *Coridothymus capitatus* L. είναι αρκετά διαδεδομένο στη γείτονα χώρα. Η βιβλιογραφική έρευνα έδειξε ότι δεν υπάρχει μελέτη που να αναφέρει την ύπαρξη καρνοσικού οξέος ή κάποιου άλλου διτερπενίου αβιετανίου στο *Coridothymus capitatus* L. Στη βιβλιογραφική έρευνα χρησιμοποιήθηκε και το συνώνυμο του, με βάση το theplantlist.org, *Thymbra capitata* L.

Η ανάλυση του φάσματος ¹H-NMR του *Hyssopus officinalis* L. δεν έδειξε την ύπαρξη κάποιας από τις εξεταζόμενες ουσίες. Ωστόσο, στη μελέτη των Babonic et al., (2010), το CO₂ εκχύλισμα του ίδιου φυτού, αναλύθηκε με τη μέθοδο HPLC-DAD/ESI-ToF και ταυτοποιήθηκε καρνοσόλη σε τιμές 7,3341g/100g εκχυλίσματος, ενώ δεν βρέθηκε ίχνος καρνοσικού οξέος. Το αποτέλεσμα της εργασίας αυτής είναι σε αντίθεση με αυτό της παρούσας διατριβής, όπου όπως ήδη αναφέρθηκε, σε όσα φυτά ανιχνεύθηκε η καρνοσόλη υπήρχε πάντα το καρνοσικό οξύ. Στην εικόνα 63 έχουμε τη σύγκριση των φασμάτων ¹H-NMR (CDCl₃), του εκχυλίσματος φύλλων ύσσωπου και των καθαρών μεταβολιτών: CA, CS, 12MCA, μεταξύ 7,10 και 6,20 ppm, δηλαδή, στο διάστημα όπου εμφανίζεται η απλή κορυφή του αρωματικού πρωτονίου της θέσης 14 στον χημικό τύπο των προαναφερόμενων ουσιών. Όπως φαίνεται στην εικόνα 63, στο φάσμα *Hyssopus officinalis* L. δεν παρατηρήθηκε κορυφή στο συγκεκριμένο εύρος των ppm, με ανάλογη εμφάνιση του φάσματος του φυτού και στα άλλα χαρακτηριστικά σημεία όπου τα διτερπένια αβιετανίου παρουσιάζουν κορυφές.

Hyssopus officinalis L.



Εικόνα 63

Σύγκριση φασμάτων ¹H-NMR (CDCl₃) μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων *Hyssopus officinalis* L. και καθαρών μεταβολιτών: CA, CS, 12MCA, μεταξύ 7,10 και 6,20 ppm.

4.2 Φυτά που περιείχαν έστω και μια από τις εξεταζόμενες ουσίες

Τα αποτελέσματα των 61 φυτών στους οικογένειες Labiate που περιείχαν έστω και μια από στους εξεταζόμενες ουσίες παρουσιάζονται στους πίνακες 61, 62.

Πίνακας 61

Αποτελέσματα των φυτών της οικογένειας Labiatae που μελετήθηκαν ποσοτικά και ποιοτικά ως προς τις κάτωθι ουσίες: ροσμανόλη (RO), 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη (7MER), καρνοσικό οξύ (CA), καρνοσόλη (CS), 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ (12MCA), 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνη (DMA) και μπετουλινικό οξύ (BA). Οι τιμές είναι σε mg/g αποξηραμένης δρόγης και αντιστοιχούν σε 3 μετρήσεις (μέσος όρος \pm SD).

Φυτά	12MCA	CA	CS	7MER	RO	DMA	BA
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. ^α	2,03 \pm 0,66	6,99 \pm 0,81	1,07 \pm 0,13	n.d.	n.d.	0,41 \pm 0,10	7,55 \pm 1,06
<i>Rosmarinus officinalis</i> var. <i>prostratus</i> Pasq. ^α	0,42 \pm 0,03	8,10 \pm 0,92	0,56 \pm 0,05	n.d.	n.d.	0,12 \pm 0,02	3,88 \pm 0,04
<i>Salvia officinalis</i> L. ^α	6,12 \pm 2,30	11,66 \pm 4,33	1,11 \pm 0,43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Salvia fruticosa</i> Mill. ^α	1,93 \pm 0,63	10,28 \pm 1,50	1,57 \pm 0,38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Salvia fruticosa</i> Mill. ^β	1,02 \pm 0,10	6,52 \pm 1,02	0,82 \pm 0,27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Salvia fruticosa</i> Mill. ^γ	3,05 \pm 0,29	12,50 \pm 1,56	0,18 \pm 0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Salvia argentea</i> L. ^α	tr	0,68 \pm 0,09	0,13 \pm 0,03	n.d.	n.d.	tr	n.d.
<i>Salvia pomifera</i> subsp. <i>pomifera</i> L. ^δ	1,68 \pm 0,30	21,64 \pm 0,60	0,80 \pm 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Salvia pomifera</i> subsp. <i>calycina</i> (Sm) Hayek ^ε	0,29 \pm 0,03	tr	0,52 \pm 0,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Salvia canariensis</i> L. ^α	n.d.	8,10 \pm 0,21	1,13 \pm 0,32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Salvia microphylla</i> Kunth ^α	10,68 \pm 3,27	7,35 \pm 2,48	0,87 \pm 0,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Salvia somalensis</i> Vatke ^α	n.d.	32,15 \pm 0,93	4,24 \pm 0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Φυτό	12MCA	CA	CS	7MER	RO	DMA	BA
<i>Salvia verticillata</i> L. ^α	n.d.	tr	tr	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Salvia aurita</i> L. ^α	n.d.	tr	-	n.d.	n.d.	tr	n.d.
<i>Salvia viscosa</i> Jacq. ^α	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	0,33±0,05	n.d.
<i>Salvia glutinosa</i> L. ^α	0,43±0,05	tr	tr	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Salvia darcyi</i> J Comptom ^α	0,28±0,02	0,14±0,02	tr	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Salvia pratensis</i> L. ^α	n.d.	0,86±0,11	-	n.d.	n.d.	n.d.	1,11±0,10
<i>Salvia virgata</i> Jacq. ^α	n.d.	0,36±0,03	0,26±0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Mentha spiccata</i> L. ^ε	n.d.	0,19±0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Mentha longifolia</i> L. ^ε	n.d.	0,20±0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Melissa officinalis</i> L. ^ε	n.d.	0,48±0,06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Lavandula officinalis</i> L. ^α	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,14±0,14
<i>Lavandula dentata</i> L. ^α	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,46±0,05
<i>Lavandula stoechas</i> L. ^α	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,94±0,10
<i>Ocimum basilicum</i> L. ^α	n.d.	0,52±0,09	tr	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^α Καλλιέργειες, Βοτανικός κήπος ΕΚΠΑ, Διομήδους

^β Άγρια, Άνω Μέλπεια Μεσσηνίας (600m υψόμετρο)

^γ Άγρια, Ηράκλειο Κρήτης (350m υψόμετρο)

^δ Άγρια, Ψηλορείτης, Κρήτη

^ε Άγρια, Όρος Πάρνωνας, Αρκαδία

n.d.: μη ανιχνεύσιμο

tr: ίχνη

Πίνακας 62

Σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου (RO, 7MER, CA, CS, 12MCA). Οι τιμές είναι σε mg/g αποξηραμένης δρόγης (άθροισμα των μέσων όρων των επιμέρους ουσιών). Στην τελευταία στήλη αναγράφεται το βάρος σε mg του μεθανολικού ξηρού εκχυλίσματος που προκύπτει από 1 γραμμάριο της εκάστοτε δρόγης.

ΦΥΤΑ	Σύνολο εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου σε mg/g δρόγης	Βάρος εκχυλίσματος mg/g ξηρής δρόγης
<i>Salvia somalensis</i> Vatke	36,4	137,6±29,5
<i>Salvia pomifera</i> subsp. <i>pomifera</i> L.	24,1	95,3± 13,9
<i>Salvia officinalis</i> L.	18,9	91,8±±19,5
<i>S. microphylla</i> Kunth	18,9	102,4±27,8
<i>Salvia fruticosa</i> Mill. (Άγρια, Ηράκλειο Κρήτης)	15,7	86,5±19,3
<i>Salvia fruticosa</i> Mill. (Καλλιέργειας)	13,8	90,7±21,4
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	10,09	86,7±15,7
<i>Salvia canariensis</i> L.	9,3	57,6±13,4
<i>Rosmarinus officinalis</i> var. <i>prostratus</i> Pasq.	9,08	89,2±17,3
<i>Salvia fruticosa</i> Mill. (Άγρια, Άνω Μέλπεια Μεσσηνίας)	8,36	83,7±11,2
<i>Salvia pratensis</i> L.	0,86	106,7±23,2
<i>Salvia pomifera</i> subsp <i>calycina</i> (Sm) Hayek	0,81	115,1±21,6
<i>Salvia argentea</i> L.	0,81	83,8±21,3
<i>Salvia virgata</i> Jacq.	0,62	87,4±13,3
<i>Ocimum basilicum</i> L.	0,52	54,8±13,4
<i>Melissa officinalis</i> L.	0,48	108,9±15,7
<i>Salvia glutinosa</i> L.	0,43	95,3±13,7

<i>Salvia darcyi</i> J Comptom	0,42	74,4±11,8
<i>Mentha longifolia</i> L.	0,20	79,2±11,4
<i>Mentha spiccata</i> L.	0,19	101,2±18,6
<i>Salvia aurita</i> L.	tr	126,7±26,3
<i>Salvia verticillata</i> L.	tr	106,45±33,9

Συνοπτικά, από τα 61 είδη φυτών της οικογένειας των Χειλανθών:

- στα 24 είδη βρέθηκαν τουλάχιστον ένας από τους υπό εξέταση μεταβολίτες
- από τα 29 είδη του γένους *Salvia* στα 14 ανιχνεύθηκε τουλάχιστον ένα από τα υπό εξέταση διτερπένια αβιετανίου

Η μεγαλύτερη ποσότητα καρνοσικού οξέος βρέθηκε στο εκχύλισμα των φύλλων της *Salvia somalensis* Vatke με τιμή 32,15±0,93 mg/g αποξηραμένης δρόγης. Το δεδομένο αυτό καθιστά το συγκεκριμένο φυτό εξαιρετική πηγή για την απομόνωση του καρνοσικού οξέος. Η παρουσία του καρνοσικού οξέος στη *Salvia somalensis* Vatke έχει αναφερθεί και από τους Barberini et al. 2012, χωρίς όμως να αναφέρουν ποσοτικά δεδομένα. Επίσης, δρόγες πλούσιες σε καρνοσικό οξύ και συνεπώς καλές πρώτες ύλες για την απομόνωση του κατά φθίνουσα σειρά, βάσει των ποσοτικών αποτελεσμάτων, είναι το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων: *Salvia pomifera* subsp. *pomifera* L., *Salvia officinalis* L., *Salvia fruticosa* Mill., *Rosmarinus officinalis* var. *prostratus* Pasq., *Salvia canariensis* L., *Salvia microphylla* Kunth και *Rosmarinus officinalis* L.

Η μεγαλύτερη ποσότητα καρνοσόλης παρατηρήθηκε στο εκχύλισμα των φύλλων της *Salvia somalensis* Vatke με τιμή 4,24±0,04 mg/g αποξηραμένης δρόγης. Ακολούθησαν κατά σειρά η *Salvia fruticosa* Mill., η *Salvia officinalis* L. και η *Salvia canariensis* L.

Κατά φθίνουσα σειρά, το 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ εμφάνισε τις μεγαλύτερες ποσότητες σε: *Salvia microphylla* Kunth, *Salvia officinalis* L., *Salvia fruticosa* Mill., *Rosmarinus officinalis* L. και *Salvia pomifera* subsp. *pomifera* L. Συνεπώς τα φύλλα της *Salvia microphylla* Kunth αποτελούν την καλύτερη πρώτη ύλη για απομόνωση του 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικού οξέος.

Η 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη δεν ταυτοποιήθηκε σε κανένα εκχύλισμα. Η ουσία όπως έχει αναλυθεί προκύπτει από το καρνοσικό οξύ και την καρνοσόλη υπό την επίδραση της μεθανόλης. Το ότι δεν ταυτοποιήθηκε στα μελετημένα εκχυλίσματα ίσως να οφείλεται στο ότι απαιτείται περισσότερος χρόνος εκχύλισης από τη μία ώρα που χρησιμοποιήθηκε, ή ότι οι ποσότητες που ενδεχομένως να έχουν παραχθεί να είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ¹H-qNMR.

Η ροσμανόλη σχηματίζεται από το καρνοσικό οξύ και την καρνοσόλη υπό την επίδραση της μεθανόλης. Ωστόσο δεν ταυτοποιήθηκε στα εξεταζόμενα φυτά που είχαν στο εκχύλισμα τους καρνοσικό οξύ ή καρνοσόλη, πιθανών για τους ίδιους λόγους που δεν ανιχνεύθηκε και η 7MER.

Η μέγιστη τιμή της 4',7-Ο-διμεθυλαπιγενίνης παρατηρήθηκε στο εκχύλισμα των φύλλων των: *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia viscosa* Jacq. και *Rosmarinus officinalis* var. *prostratus* Pasq. με τιμές 0,41±0,10 mg/g, 0,33±0,05 και 0,10±0,01 mg/g αντίστοιχα.

Η μεγαλύτερη ποσότητα μπετουλινικού οξέος βρέθηκε στο εκχύλισμα των φύλλων *Rosmarinus officinalis* L. και *Rosmarinus officinalis* var. *prostratus* Pasq. με τιμές 7,55±1,06 mg/g και 3,88±0,04 mg/g αντίστοιχα. Επίσης, στις *L. officinalis* L., *L. dentata* L. και *L. stoechas* L., ταυτοποιήθηκε το μπετουλινικό οξύ, με το είδος *L. officinalis* L. να είναι το πιο πλούσιο. Η παρουσία του μπετουλινικού οξέος στη *L. dentata* L., έχει αναφερθεί από τους Jan-Qiao et al., 2006, ενώ για την *L. officinalis* L. και τη *L. stoechas* L. αναφέρεται για πρώτη φορά στη παρούσα διατριβή. Το μπετουλινικό οξύ ταυτοποιήθηκε και στη *S. pratensis* L. Να σημειωθεί ότι η ταυτοποίηση βασίστηκε σε δύο κορυφές στο φάσμα ¹H-NMR και υπάρχει ένα ποσοστό αβεβαιότητας. Στα υπόλοιπα φυτά που εξετάστηκαν δεν κατέστη εφικτή η ταυτοποίηση του μπετουλινικού οξέος με 1D-NMR, ακόμα και αν υπήρχαν βιβλιογραφικές αναφορές ανίχνευσης του, λόγω της αλληλοεπικάλυψης των σημάτων στην αλειφατική περιοχή του φάσματος 1D-NMR. Για τον ίδιο λόγο δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση του ουρσολικού και ολεανολικού οξέος στα φυτά που εξετάστηκαν.

Στη *Melissa officinalis* L. ταυτοποιήθηκε καρνοσικό οξύ. Οι Herodez et al. 2003, επίσης ανέφεραν το καρνοσικό οξύ ως συστατικό του μελισσόχορτου.

Κανένα από τα 3 είδη *Lanandula* που ερευνήθηκαν δεν περιείχαν κάποιο διτερπένιο αβιετανίου ούτε 4',7-Ο-διμεθυλαπιγενίνη.

Από τα 3 είδη *Mentha* που μελετήθηκαν, *M. pulegium* L., *M. spiccata* L. και *M. longifolia* L., ταυτοποιήθηκε το καρνοσικό οξύ μόνο στις *M. spiccata* L. και *M. longifolia* L., με πολύ μικρή ποσοτική διαφορά μεταξύ τους.

Στο *Ocimum basilicum* L. ταυτοποιήθηκε καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη. Στην εργασία των Jayasinghe et al., (2003), ανιχνεύθηκε καρνοσικό οξύ αλλά όχι καρνοσόλη. Η διαφορά στο αποτέλεσμα της καρνοσόλης μεταξύ των δύο εργασιών ίσως να οφείλεται στους διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης της δρόγης (5 min στην εργασία των Jayasinghe et al., 2003). Η επεξεργασία των φασμάτων ¹H-NMR έδειξε ότι δεν υπήρχε 4',7-Ο-διμεθυλαπιγενίνη ούτε μπετουλινικό οξύ.

Στο *R. officinalis* L. και στην ποικιλία *R. officinalis* var. *prostratus* Pasq. ταυτοποιήθηκαν καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη και 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ.

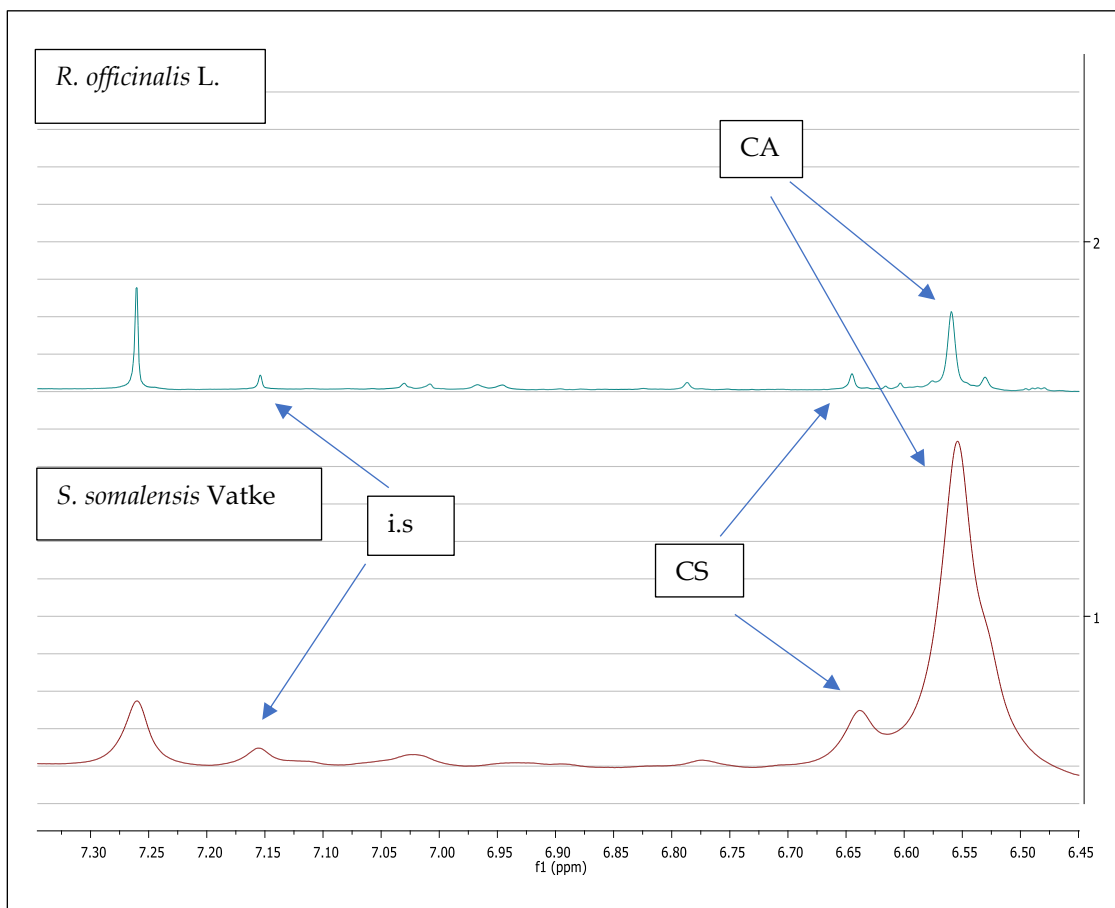
Όπως ήταν αναμενόμενο βάσει της πλούσιας βιβλιογραφίας, στα *S. officinalis* L. και *S. fruticosa* Mill., ταυτοποιήθηκαν καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη και 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το είδος *S. pomifera*. Πράγματι, τόσο στη *Salvia pomifera* subsp. *pomifera* L. Κρητικής προέλευσης, όσο και στη *Salvia pomifera* subsp. *calycina* (Sm) Hayek της Ηπειρωτικής Ελλάδας, ταυτοποιήθηκαν τα ίδια διτερπένια αβιετανίου. Ωστόσο οι ποσοτικές διαφορές των επιμέρους ουσιών είναι σημαντικές. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 61 η *Salvia pomifera* L. subsp. *pomifera* παρουσιάζει μια από τις μεγαλύτερες τιμές στο καρνοσικό οξύ ενώ η *Salvia pomifera* subsp. *calycina* (Sm) Hayek μια από τις χαμηλότερες. Οι Koutsoulas et. al., (2019) ανέλυσαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα των *S. pomifera* L. και *S. fruticosa* Mill. με τη μέθοδο HPLC-ESI-QTOF-MS. Όσον αφορά τα διτερπένια αβιετανίου, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *S. pomifera*

L. περιείχε μόνον 12-O-μεθυλοκαρνοσικό και ισομερή της ροσμανόλης, χωρίς την ύπαρξη καρνοσικού οξέος και καρνοσόλης, κάτι που έρχεται σε ευθεία αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής. Πράγματι, στην παρούσα διατριβή η σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ των απομονωμένων ουσιών με τα φάσματα εκχυλίσματος *S. pomifera* L. subsp. *pomifera*, και με την συμβολή της βιβλιογραφίας, μας οδήγησαν στην ταυτοποίηση τόσο του καρνοσικού οξέος όσο και της καρνοσόλης και του 12-O-μεθυλοκαρνοσικού οξέος. Η *S. pomifera* L. στη μελέτη των Koutsoulas et. al., (2019) συλλέχθηκε στην Κρήτη λίγο πριν ανθοφορία της, ενώ το μεθανολικό εκχύλισμα έγινε με συσκευή Soxhlet για 6h, σε αναλογία διαλύτη: δρόγη= 20: 1, Η *S. pomifera* L. της παρούσας διατριβής συλλέχθηκε επίσης από την Κρήτη (όρος Ψηλορείτης), όμως κατά την ανθοφορία της. Οι αναλογίες δρόγης-διαλύτη ήταν σχεδόν οι ίδιες και στις δύο εργασίες (1:20 σε σχέση με 1:30). Εκτιμάται ότι οι διαφορές στο χρόνο συλλογής και στην παρασκευή των μεθανολικών εκχυλισμάτων ή οι διαφορετικές μέθοδοι ανάλυσης, δεν δικαιολογούν τέτοια ποιοτική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο αυτών εργασιών. Εξάλλου οι Koutsoulas et. al., (2019) στο εκχύλισμα της *S. fruticosa* Mill. με τις ίδιες συνθήκες εκχύλισης με αυτό της *S. pomifera* L., ταυτοποίησαν καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη και 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ, όπως ακριβώς και στην παρούσα διατριβή. Να σημειωθεί ότι μολονότι οι Koutsoulas et. al., (2019) δεν αναφέρονται σε υποείδος της *S. pomifera* που μελετήθηκε, δηλαδή *pomifera* ή *calycina*, θεωρήσαμε ότι πρόκειται για την *S. pomifera* subsp. *pomifera* δεδομένου ότι συλλέχθηκε στην Κρήτη όπου ευδοκίμει μόνο αυτό το υποείδος.

Από τα 61 φυτά της οικογένειας των Χειλανθών που μελετήθηκαν, η *S. somalensis* Vatke ήταν η πιο πλούσια τόσο στο καρνοσικό οξύ ($32,15 \pm 0,93$ mg/g αποξηραμένης δρόγης) όσο και στην καρνοσόλη ($4,24 \pm 0,04$ mg/g αποξηραμένης δρόγης), καθιστώντας το είδος αυτό μια εξαιρετική πηγή αυτών των δύο ουσιών. Στην εικόνα 64 παρουσιάζεται η σύγκριση του φάσματος της *S. somalensis* Vatke με αυτό του *R. officinalis* L. Αξίζει να σημειωθεί ότι για πρώτη φορά αναφέρονται ποσοτικά στοιχεία του εκχυλίσματος του φυτού *S. somalensis* Vatke που αφορούν το CA και την CS. Δεν ανιχνεύθηκε 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνη και μπετουλινικό οξύ.

Στο εκχύλισμα της *S. somalensis* Vatke έγινε και φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε CD_3OD , όπου υπήρχαν τα ίδια ποιοτικά και ποσοτικά αποτελέσματα.



Εικόνα 64

Σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) μεθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών *R. officinalis* L. και *S. somalensis* Vatke μεταξύ 6,45 και 7,35 ppm. Στα 7,15 ppm εμφανίζεται η απλή κορυφή του εσωτερικού προτύπου (i.s), στα 6,64 ppm η απλή κορυφή του H-14 της καρνοσόλης (CS) (ολοκλήρωση για 1H), και στα 6,56 ppm η απλή κορυφή του H-14 του καρνοσικού οξέος (CA) (ολοκλήρωση για 1H).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η *S. microphylla* Kunth δεδομένου ότι παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποσότητα σε 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ από όλα τα φυτά που μελετήθηκαν. Αυτό την καθιστά μια εξαιρετική πρώτη ύλη για την απομόνωση του τελευταίου. Επίσης, ταυτοποιήθηκαν καρνοσικό οξύ σε υψηλή ποσότητα και καρνοσόλη. Οι Aydogmus et al., (2006) ανίχνευσαν το 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ και το καρνοσικό οξύ αλλά όχι την καρνοσόλη.

Στη *Salvia argentea* L., όσον αφορά τα διτερπένια αβιετανίου ταυτοποιήθηκαν το καρνοσικό οξύ, η καρνοσόλη και το 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ. Οι Farhat et al., (2013) ταυτοποίησαν το καρνοσικό οξύ αλλά όχι την καρνοσόλη, και δεν έδωσαν καμία πληροφορία για το 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ. Οι τελευταίοι εκχύλισαν την δρόγη με συσκευή Soxhlet για 2h σε μεθανόλη.

Στη *S. glutinosa* L. ταυτοποιήθηκαν καρνοσικό οξύ, 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ και καρνοσόλη. Σε αντίθεση με την εργασία των Abreu et al., (2008), που ανίχνευσαν μόνο την ύπαρξη καρνοσικού οξέος. Οι διαφορές μεταξύ των δύο αποτελεσμάτων ίσως

να έγκειται στο χρόνο εκχύλισης με τη μεθανόλη. Οι Sulniute et al., (2017) σε υδατικό εκχύλισμα της *S. glutinosa* L. ανίχνευσαν ~350 μg/g ξηρής δρόγης καρνοοσικού οξέος, ενώ σε αιθανολικό διάλυμα μόνο ίχνη.

Στη *Salvia darcyi* J Comptom ανιχνεύθηκαν καρνοοσικό οξύ, 12-O-μεθυλοκαρνοοσικό οξύ και καρνοσόλη. Στην εργασία των Abreu et al., (2008), ταυτοποιήθηκε μόνο καρνοοσικό και καρνοσόλη.

Στη *Salvia aurita* L. ανιχνεύθηκε καρνοοσικό οξύ, αλλά όχι 12-O-μεθυλοκαρνοοσικό οξύ και καρνοσόλη. Προηγούμενα έχει ταυτοποιηθεί καρνοοσικό οξύ και καρνοσόλη χωρίς πληροφορία για το 12-O-μεθυλοκαρνοοσικό οξύ (Kamatou 2006).

Στη *Salvia virgata* Jacq. ανιχνεύθηκε καρνοοσικό οξύ και καρνοσόλη. Στην εργασία των Fotovvat et al., (2019) ταυτοποιήθηκε καρνοοσικό οξύ σε φύλλα και ρίζα του φυτού.

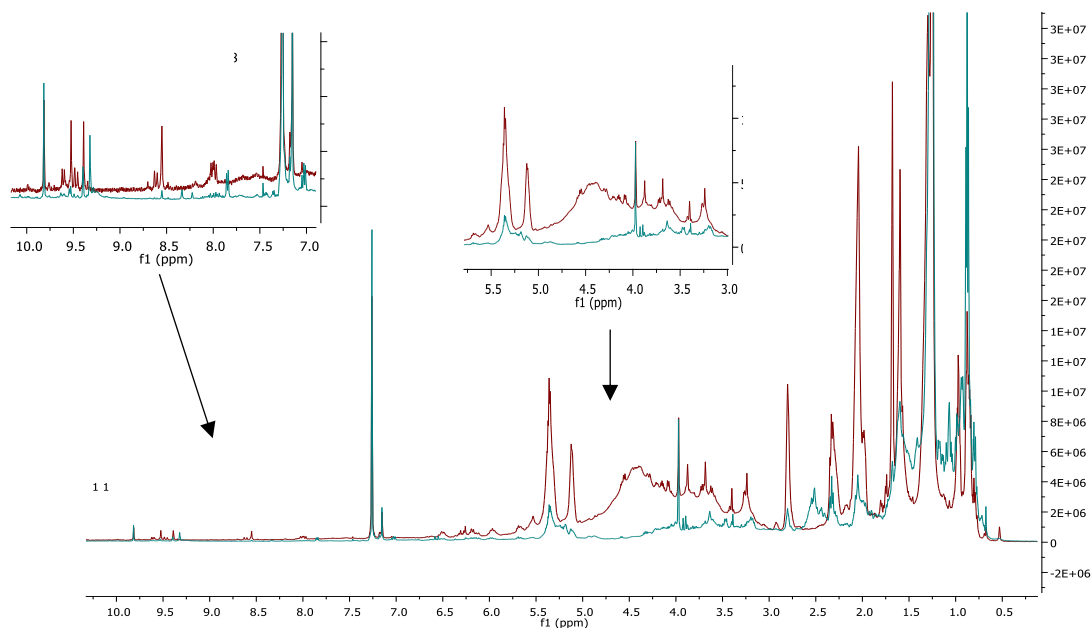
Σε *Salvia canariensis* L. και *Salvia verticillata* L. ταυτοποιήθηκαν καρνοοσικό οξύ και καρνοσόλη όπως και στις εργασίες των Abreu et al., (2008) και Fotovvat et al., (2019).

Σε *Salvia pratensis* L. ταυτοποιήθηκε μόνο καρνοοσικό οξύ. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ίδιο με τις εργασίες των Sulniute et al., (2017) και Abreu et al., (2008).

5. 1D-πρωτονιακά φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR, Nuclear Magnetic Resonance spectra, ¹H-NMR) ως χημικό αποτύπωμα των φυτικών εκχυλισμάτων

Σύμφωνα με την ονοματολογία των φυτών από την έγκυρη και έγκριτη ιστοσελίδα theplantlist.com η *Salvia sclarea* var. *turkestanica* (Noter) Mottet και η *Salvia sclarea* L. είναι τα ίδια φυτά και οι ονομασίες τους είναι συνώνυμες. Ωστόσο, η ποιοτική ανάλυση και η σύγκριση των φασμάτων ¹H-NMR (CDCl₃) των μεθανολικών εκχυλισμάτων τους στην παρούσα διατριβή, έδειξε ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις μεταξύ τους, ιδιαίτερα δε στην περιοχή των αρωματικών ενώσεων. Συνεπώς ίσως να μην είναι ίδιο είδος φυτού αλλά διαφορετικά (εικόνα 65) Είναι γνωστό ότι η τελική σύνθεση των εκχυλισμάτων επηρεάζεται από την ποιότητα του αρχικού φυτού, τη γεωγραφική προέλευσή του, την ημερομηνία συγκομιδής, την αποθήκευσή του και την επεξεργασία του πριν από την εκχύλιση. Γίνεται κατανοητό ότι για την σύγκριση των φασμάτων δύο φυτών και την εξαγωγή συμπερασμάτων απαιτούνται πολλές διάφορες μετρήσεις που θα σεβαστούν όλες τις προαναφερόμενες παραμέτρους που επηρεάζουν την ποιότητα της δρόγης.

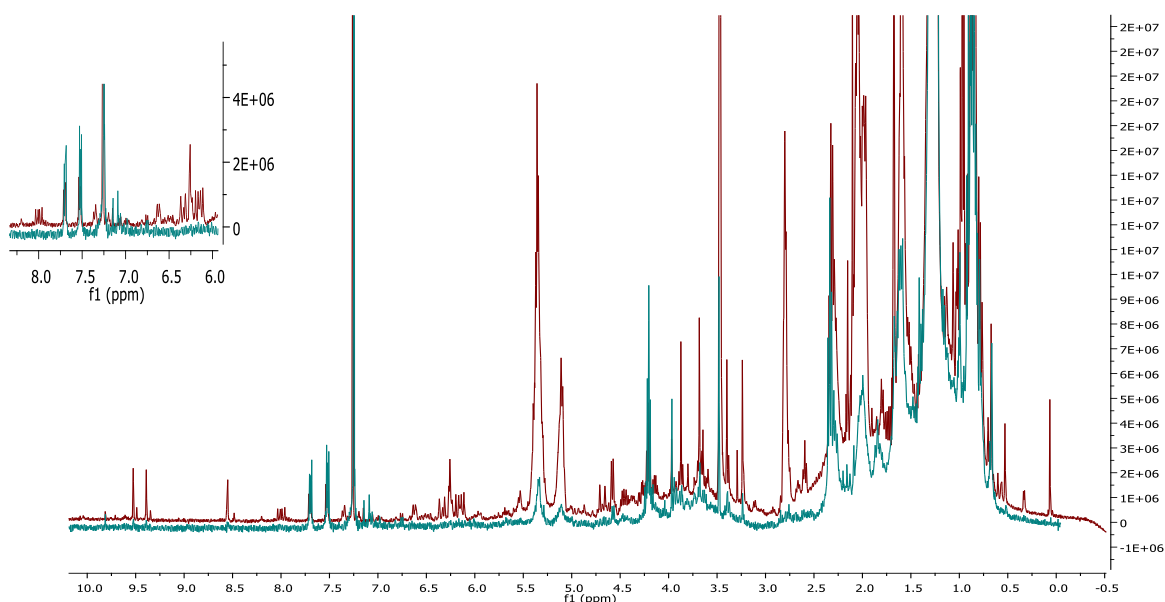
Η *Salvia sclarea* var. *turkestanica* και η *Salvia sclarea* L. συλλέχθηκαν από το ίδιο τόπο (Βοτανικό κήπος Διομήδους του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών) την ίδια μέρα και όλη η επόμενη επεξεργασία έγινε υπό τις ίδιες συνθήκες, δίνοντας ωστόσο ενδεικτικά αποτελέσματα.



Εικόνα 65

Ποιοτική σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), μεθανολικών εκχυλισμάτων *Salvia sclarea* var. *turkestanica* (Noter) Mottet (πράσινο χρώμα) και *Salvia sclarea* L. (κόκκινο χρώμα) με εμφανείς διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις.

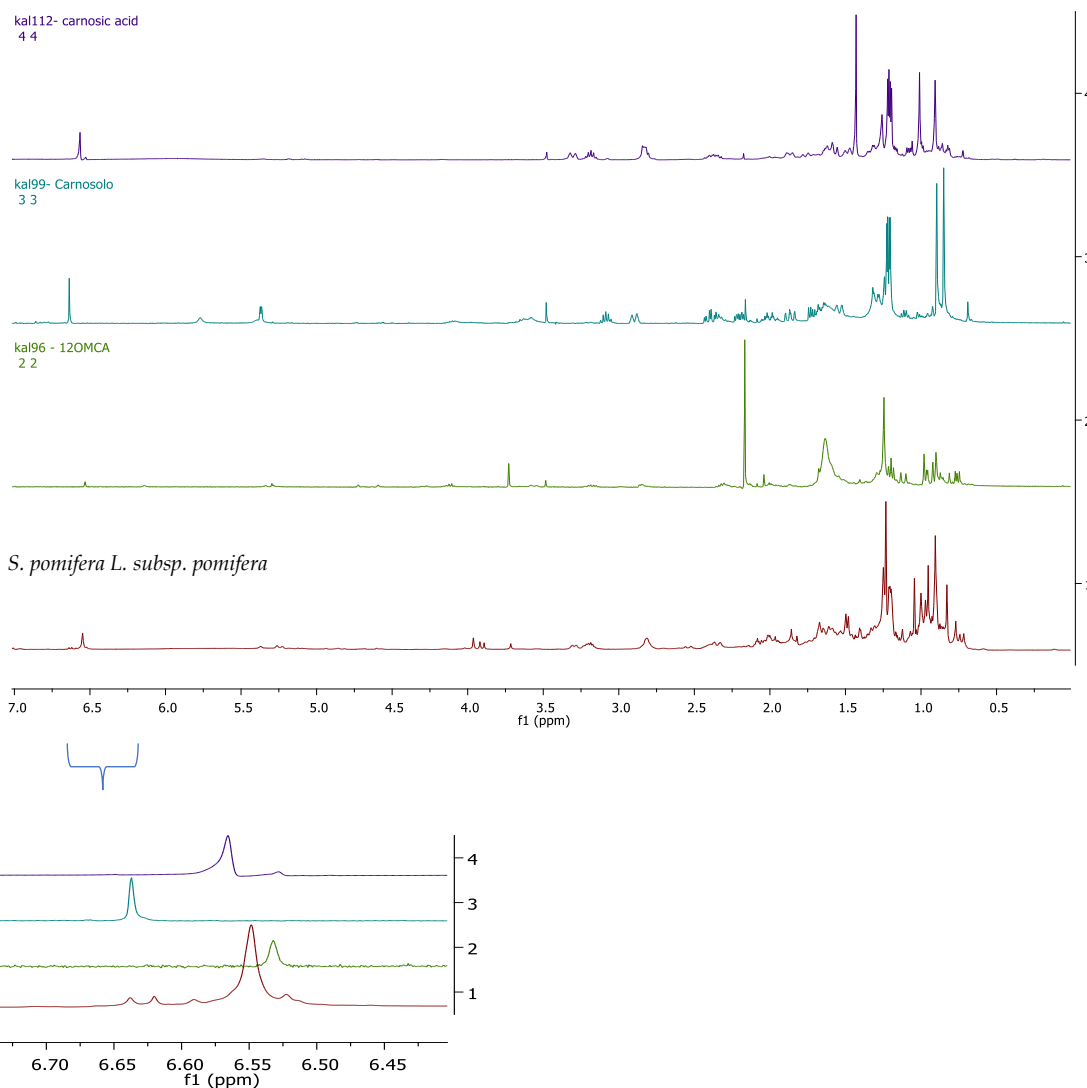
Η *Betonica officinalis* L. και *Stachys officinalis* (L.) Trevis. αναφέρονται ως συνώνυμα από ορισμένους συγγραφείς (Bobev et al. 2002), ενώ σε άλλες πηγές ως διαφορετικά είδη φυτών (theplantlist.com). Η ποιοτική ανάλυση και η σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των μεθανολικών εκχυλισμάτων τους, έδειξε ότι υπάρχουν διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις μεταξύ τους, ιδιαίτερα στην αρωματική περιοχή (εικόνα 66).



Εικόνα 66

Ποιοτική σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), μεθανολικών εκχυλισμάτων της *Betonica officinalis* L. (πράσινο χρώμα) και του *Stachys officinalis* (L.) Trevis. (κόκκινο χρώμα) με εμφανείς διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις.

Στην εικόνα 67 παρουσιάζονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων *S. pomifera subsp. pomifera* με τα αντίστοιχα καρνοσικού οξέος, καρνοσόλης και 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικού οξέος.

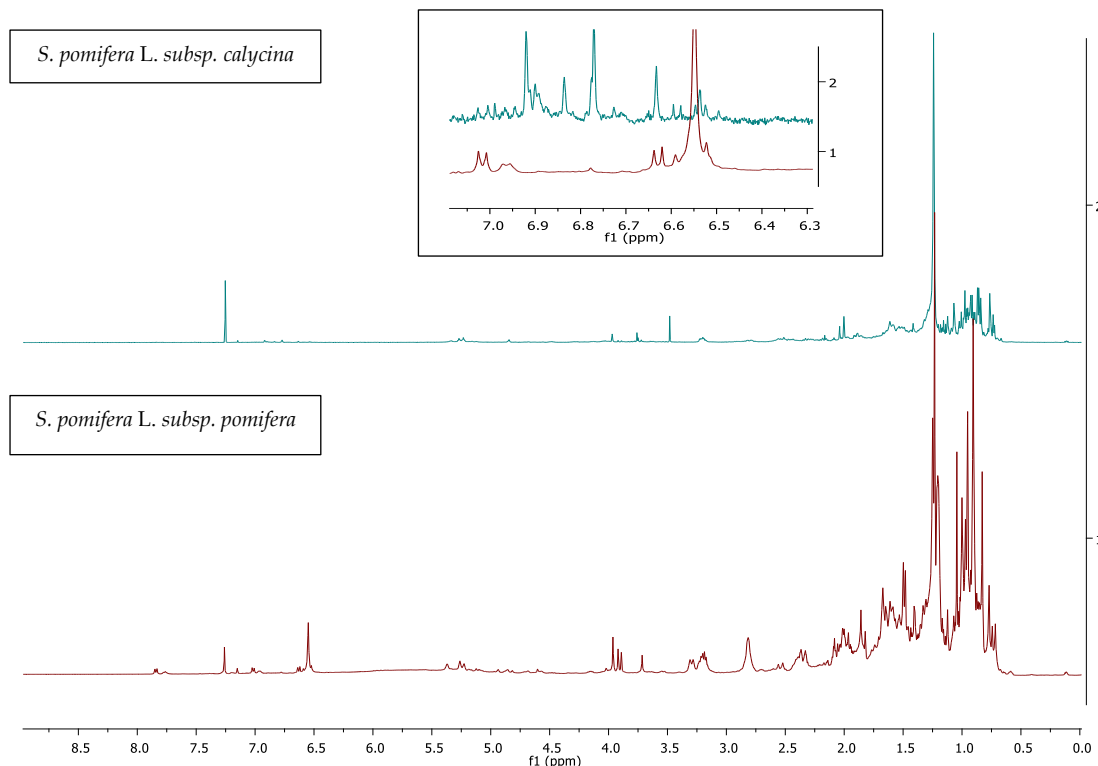


Εικόνα 67

Σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων *S. pomifera subsp. pomifera* (κόκκινο χρώμα) με τα αντίστοιχα καρνοσικού οξέος, καρνοσόλης και 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικού οξέος.

Η ποιοτική σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ μεθανολικών εκχυλίσμάτων φύλλων της *S. pomifera* L. subsp. *calycina* (πράσινο χρώμα) και *S. pomifera* L. subsp. *pomifera* δείχνει ότι υπάρχουν πολλές διαφορές μεταξύ τους. Για παράδειγμα στο φάσμα της *S.*

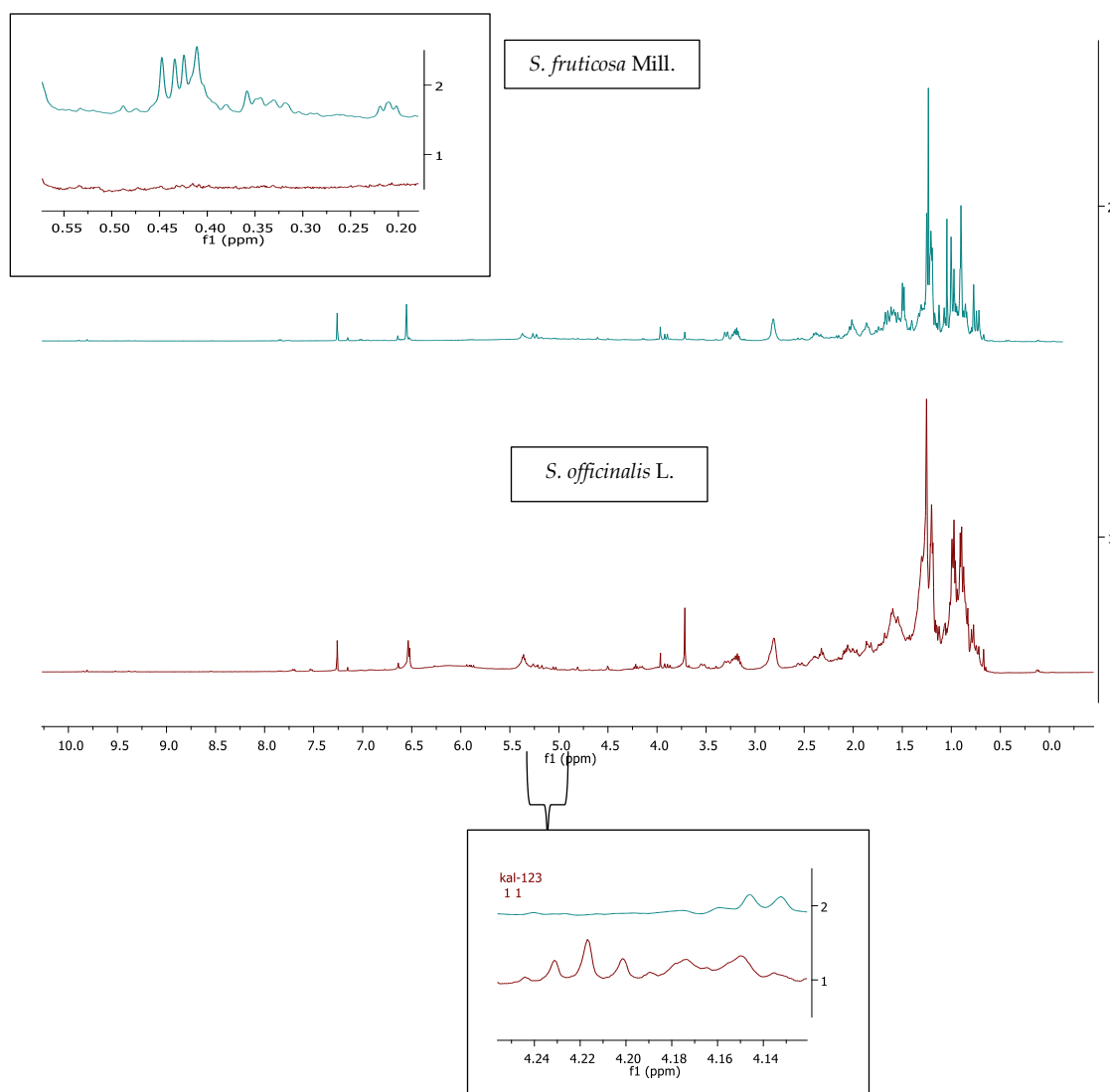
romifera L. subsp. *romifera* συναντούμε διπλή κορυφή στα 3,30 ppm απλές κορυφές στα 9,90, 9,84, 9,75, 9,65 ppm, και διπλή κορυφή στα 3,30 ppm, που δεν υπάρχουν στο φάσμα της *S. romifera* L. subsp. *calycina*, στο οποίο ανιχνεύονται οι απλές κορυφές στα 6,91, 6,87, 6,83, 6,72, 6,49 ppm (εικόνα 68).



Εικόνα 68

Ποιοτική σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) μεθανολικών εκχυλισμάτων της *S. romifera* L. subsp. *calycina* (πράσινο χρώμα) και *S. romifera* L. subsp. *romifera* (κόκκινο χρώμα).

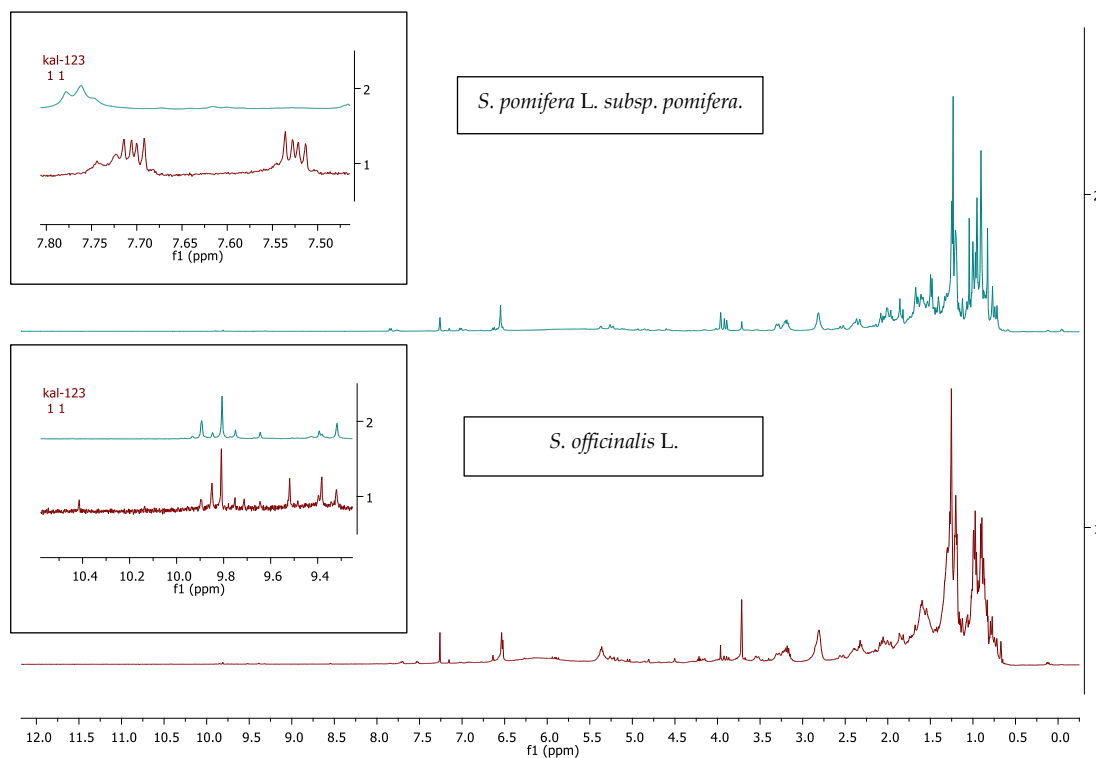
Με βάση την ποιοτική σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φύλλων των *S. officinalis* L. και *S. fruticosa* Mill., λόγω των εμφανιζόμενων χαρακτηριστικών διαφορών τους εν δυνάμει θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την βοτανική διαφοροποίηση τους. Στο φάσμα *S. officinalis* L. εμφανίζονται κορυφές (πχ: 4,23 s, 4,22 s, 4,20 s) που δεν υπάρχουν στο φάσμα *S. fruticosa* Mill., στο οποίο, αντίστροφα, στα 0,43 ppm εμφανίζεται κορυφή m (εικόνα 69).



Εικόνα 69

Σύγκριση φασμάτων ¹H-NMR (CDCl₃) μεθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων της *S. officinalis* L. (κόκκινο χρώμα) και της *S. fruticosa* Mill. (πράσινο χρώμα).

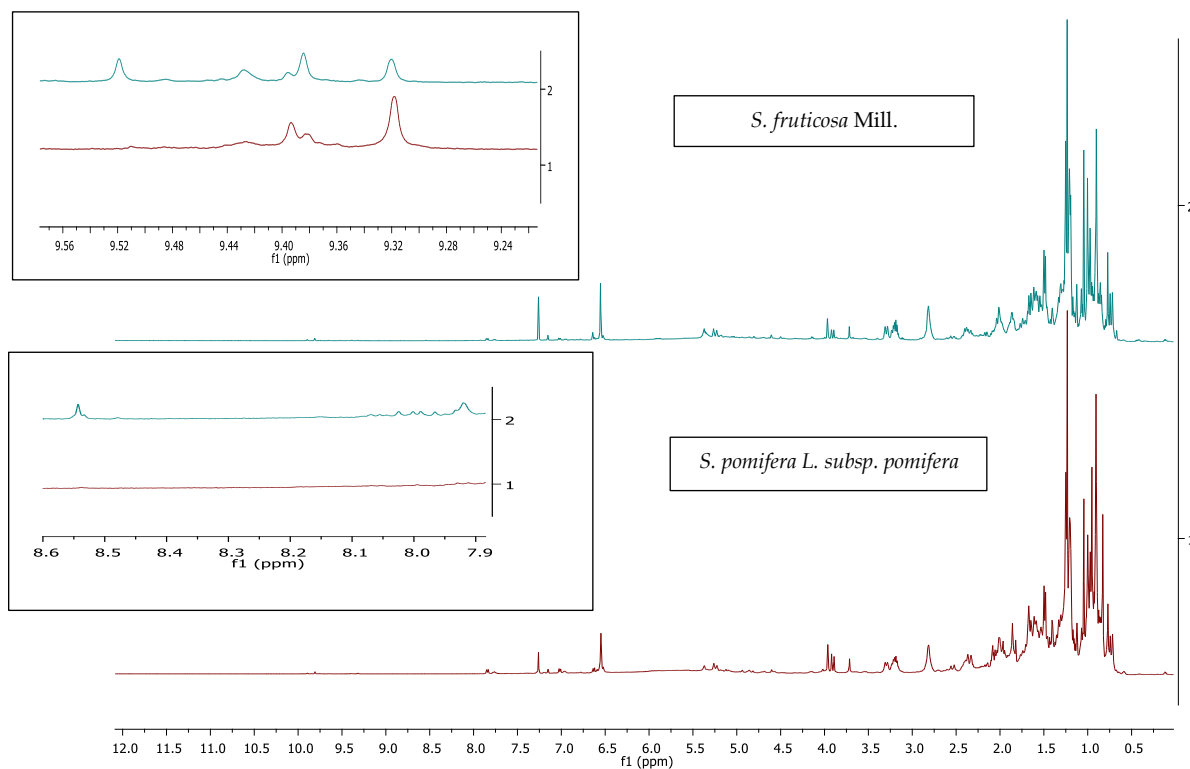
Με βάση την ποιοτική σύγκριση φασμάτων ¹H-NMR μεθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων *S. officinalis* L. και *S. pomifera* L. *subsp. pomifera* θα μπορούσαμε να διαφοροποιήσουμε τα δύο φυτά. Τα δύο φάσματα έχουν πολλές ομοιότητες, ωστόσο υπάρχουν και μερικές διαφορές. Στο φάσμα της *S. officinalis* L. εμφανίζονται κορυφές πχ: 10,42 s, 9,71 s, 9,52 s, 8,55 s, 7,70 m, 7,52 m, 4,23 s, 4,22 s, 4,20 s ppm που δεν υπάρχουν στο φάσμα της *S. pomifera* L. *subsp. pomifera* (στο οποίο, αντίστροφα, στα 9,93 ppm υπάρχει μονή κορυφή και διπλή κορυφή στα 1,49 ppm που δεν παρατηρείται στη *S. officinalis* L. (εικόνα 70)



Εικόνα 70

Σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) μεθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων της *S. officinalis* L. (κόκκινο χρώμα) και *S. pomifera* L. subsp. *pomifera* (πράσινο χρώμα).

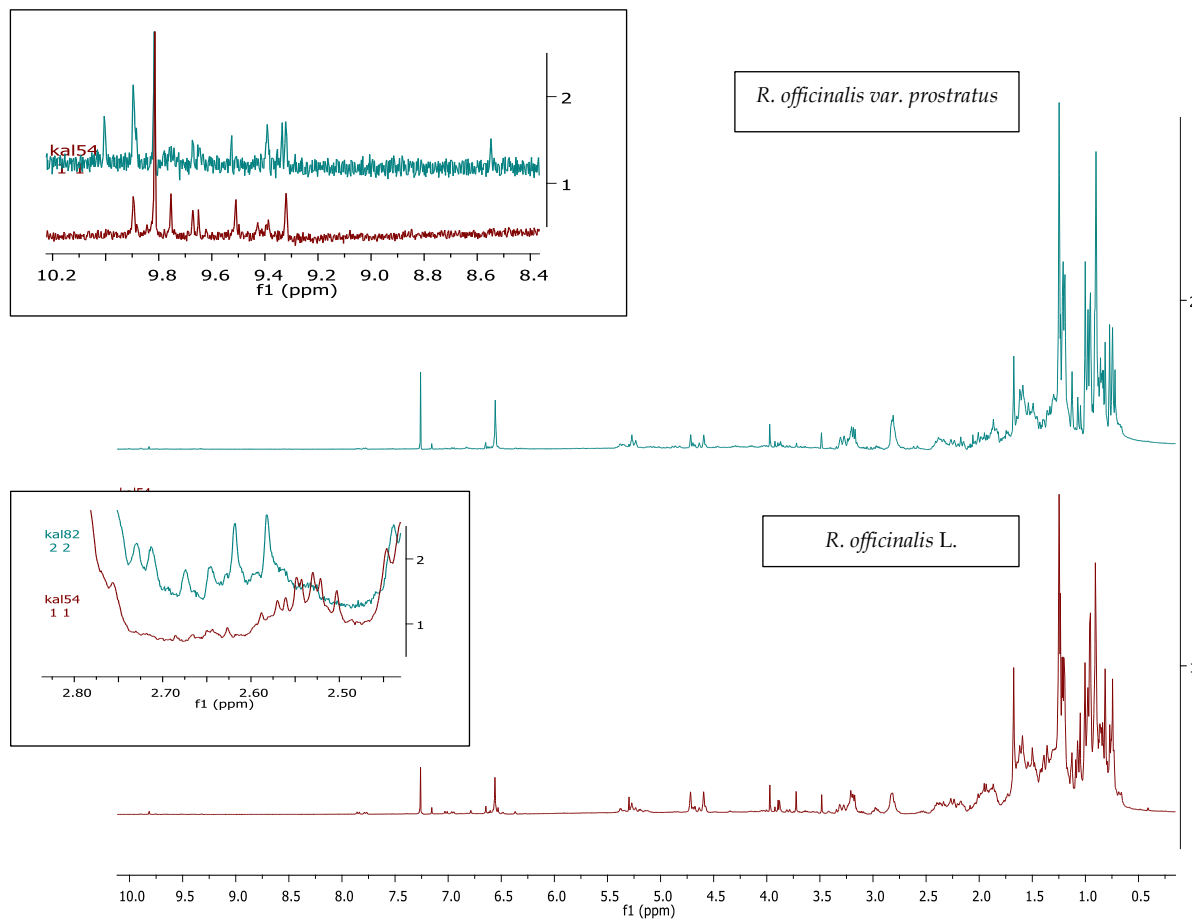
Με βάση την ποιοτική σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φύλλων της *S. fruticosa* Mill. και της *S. pomifera* L. subsp. *pomifera* μπορούμε να διαφοροποιήσουμε τα δύο φυτά. Πράγματι τα δύο φάσματα έχουν αρκετές διαφορές. Στο φάσμα της *S. fruticosa* Mill. συναντούμε κορυφές (για παράδειγμα: 11,19 s, 10,42 s, 9,71 s, 9,52 s, 8,55 s, 7,92 s) που δεν υπάρχουν στο φάσμα της *S. pomifera* L. subsp. *pomifera* (εικόνα 71).



Εικόνα 71

Σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) μεθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων *S. fruticosa* Mill. (πράσινο χρώμα) και *S. pomifera* L. subsp. *pomifera*. (κόκκινο χρώμα).

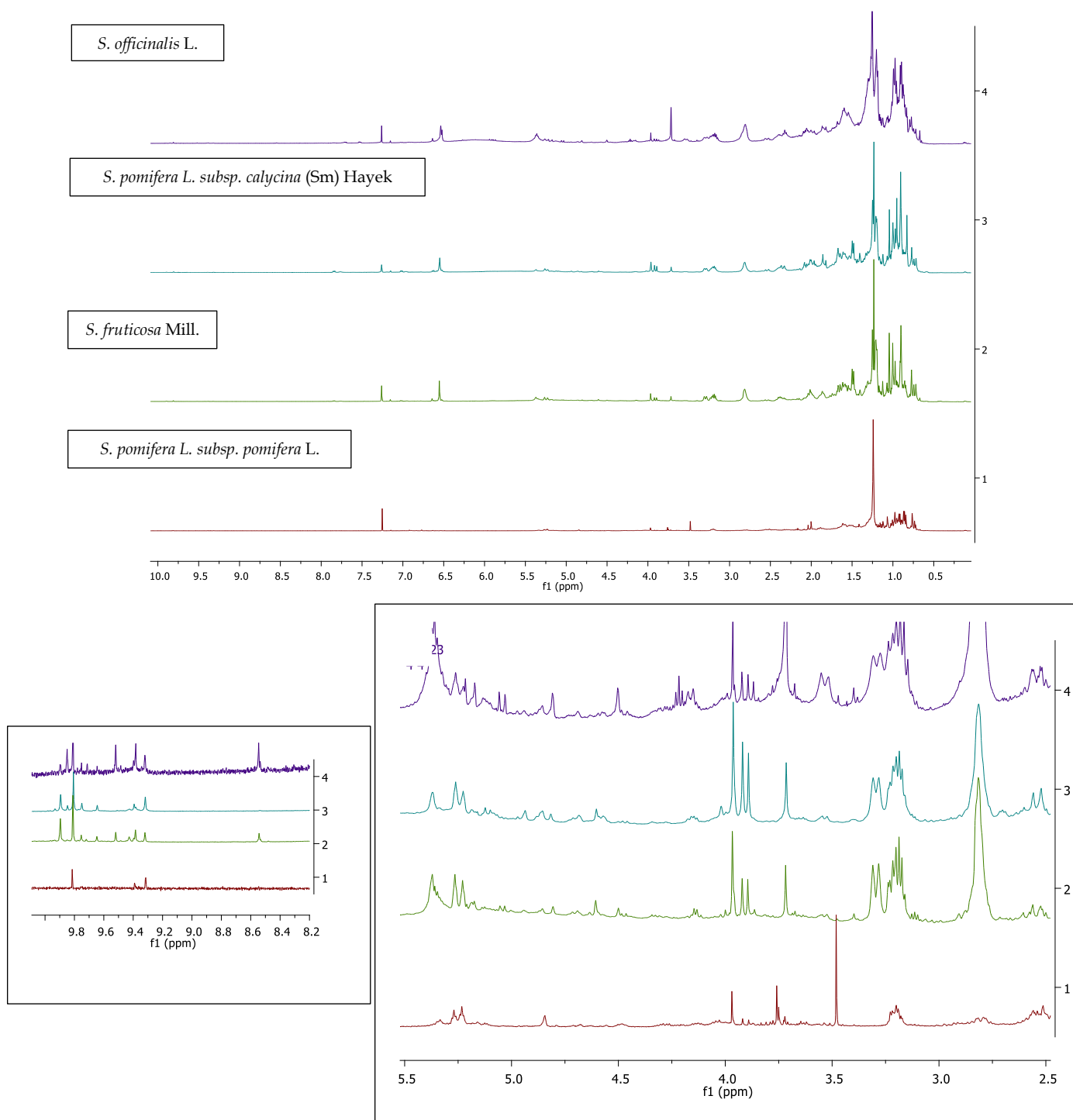
Με βάση την ποιοτική σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ μεθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων *R. officinalis* L. και *R. officinalis* var. *prostratus* μπορούμε να διαφοροποιήσουμε βοτανικά τα δύο φυτά, αφού τα δύο φάσματα έχουν ομοιότητες, ωστόσο υπάρχουν και μερικές διαφορές αφού στο φάσμα *R. officinalis* var. *prostratus* εμφανίζονται κορυφές π.χ.: 8,55 s, 10,00 s, 9,34 s, 5,10 s, 5,06 s, 5,02 s, 4,29 m, 2,62 s, 2,58 s που δεν υπάρχουν στο φάσμα *R. officinalis* L. στο οποίο αντίθετα, στα 5,20 ppm υπάρχει διπλή κορυφή που δεν παρατηρείται στο προηγούμενο (εικόνα 72).



Εικόνα 72

Σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) μεθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων *R. officinalis L.* (κόκκινο χρώμα) και *R. officinalis var. prostratus* (πράσινο χρώμα).

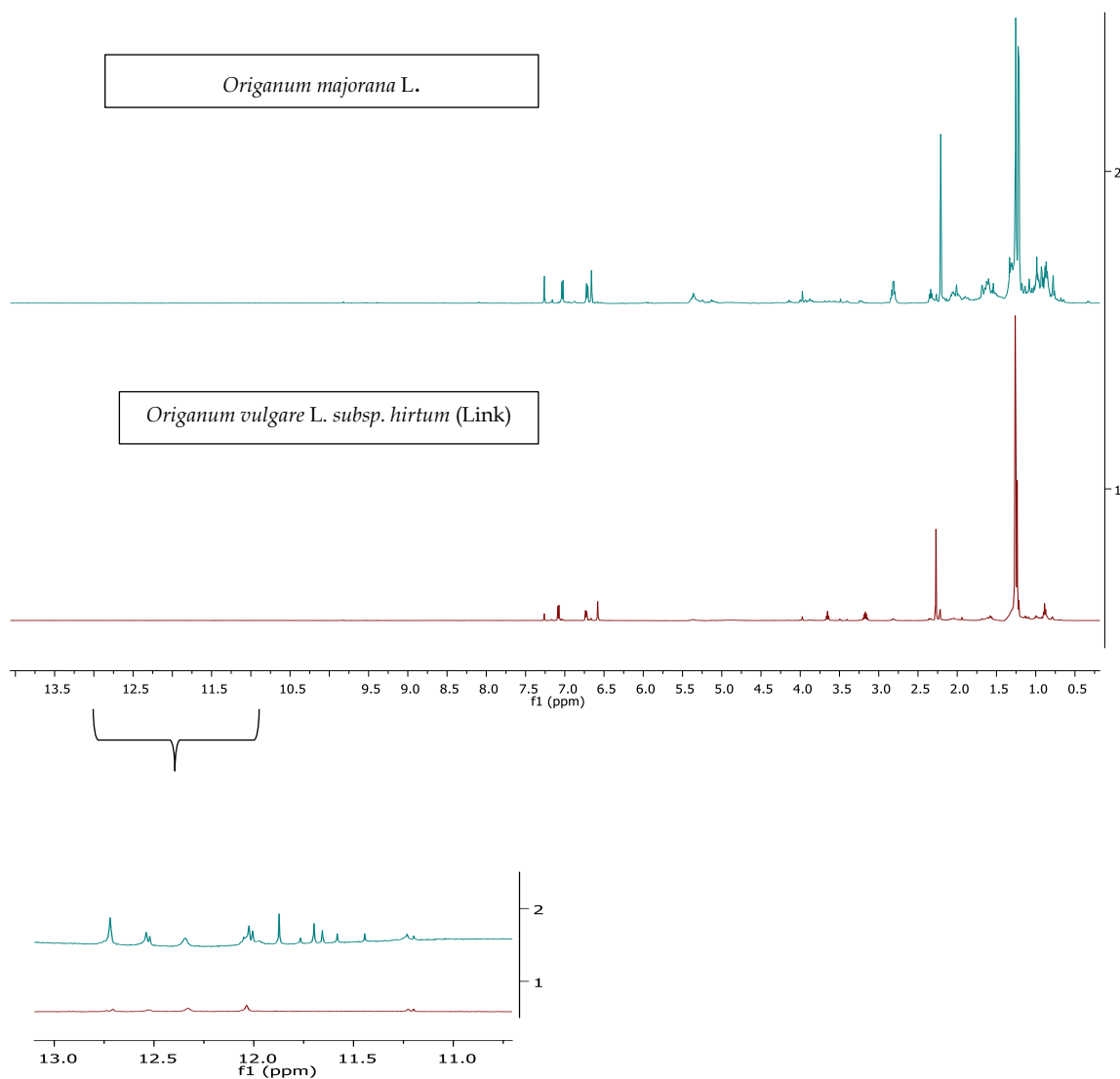
Στην εικόνα 73 συνοψίζονται τα φάσματα τεσσάρων φυτών του γένους *Salvia*



Εικόνα 73

Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των φυτών *S. pomifera* L. subsp. *pomifera* L., *S. officinalis* L., *S. pomifera* L. subsp. *calycina* (Sm) Hayek, και *S. fruticosa* Mill.

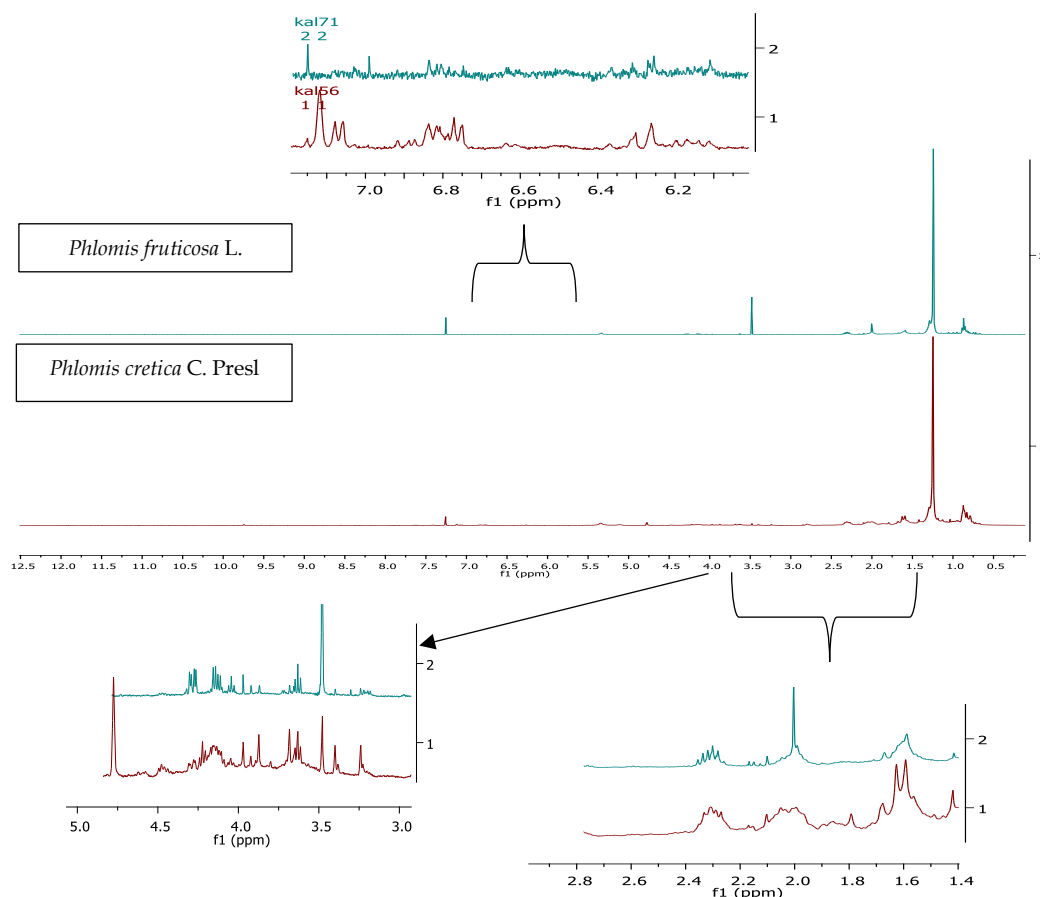
Τα φάσματα *Origanum majorana* L. και *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) μοιάζουν πολύ σε όλο τους το εύρος, εκτός της περιοχής από 11,5 έως 12,5 ppm (εικόνα 74).



Εικόνα 74

Σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) μεθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων *Origanum majorana* L. (πράσινο χρώμα) και *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) (κόκκινο χρώμα).

Με βάση την ποιοτική σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ μεθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων *Phlomis cretica* C. Presl και *Phlomis fruticosa* L. θα μπορούσαν να διαφοροποιηθούν βοτανικά τα δύο φυτά. Πράγματι, τα δύο φάσματα έχουν πολλές ομοιότητες, ωστόσο στο φάσμα *P. cretica* συναντώνται κορυφές πχ: 1,49 s, 1,79 s, 2,83 s, 2,86 s, 3,80 s, 4,77 s, 6,88 d, 7,07 d, 7,12 br s που δεν υπάρχουν στο φάσμα *P. fruticosa* στο οποίο, αντίθετα, υπάρχουν απλές κορυφές στα 3,30 και 4,32 ppm (εικόνα 75).



Εικόνα 75

Σύγκριση φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) μεθανολικών εκχυλισμάτων φύλλων *Phlomis cretica* C. Presl (κόκκινο χρώμα) και *Phlomis fruticosa* L. (πράσινο χρώμα).

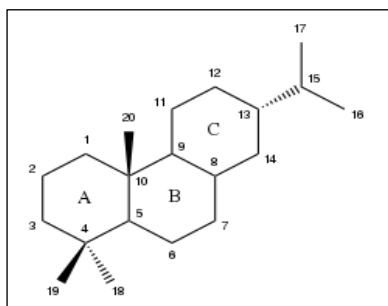
6. Συζήτηση-συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάστηκε για πρώτη φορά η ποιοτική και η ποσοτική μελέτη των 12MCA, 7MER, RO, CA, CS, DMA και BA σε 61 φυτικά είδη της οικογένειας των Χειλανθών (Lamiaceae-Labiatae) που φύονται στην Ελλάδα.

Αναμένεται ότι τα αποτελέσματα που λαμβάνονται θα βοηθήσουν στην αξιοποίηση και άλλων ειδών, πέραν των γνωστών, για τις ευρύτερες πρακτικές εφαρμογές τους, π.χ. ως φυσικό πρόσθετο τροφίμων, ως λειτουργικά συστατικά τροφίμων και ως πρώτη ύλη για την απομόνωση των εξεταζόμενων ουσιών.

Με τη χρήση του $^1\text{H-NMR}$ πραγματοποιήθηκε η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση συγκεκριμένων ουσιών σε σύνθετα μείγματα, όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα, με μια απλή, ταχεία και μεγάλης ακρίβειας διαδικασία.

Ο χημικός τύπος των διτερπενίων αβιετανίου (εικόνα 76) που εξετάστηκαν, παρουσιάζουν συγκεκριμένες ομοιότητες που, ωστόσο, λόγω των λοιπών χαρακτηριστικών διαφορών τους αποτυπώνονται σε διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3). Να σημειωθεί ότι ο δακτύλιος C αβιετανίου στην περίπτωση των CA, CS, 7MER, RO και 12MCA αρωματικός.



Εικόνα 76

Χημικός τύπος αβιτανίου

Οι ομοιότητες που βοήθησαν στη ταυτοποίηση του σκελετού των διτερπενίων αβιτανίου είναι:

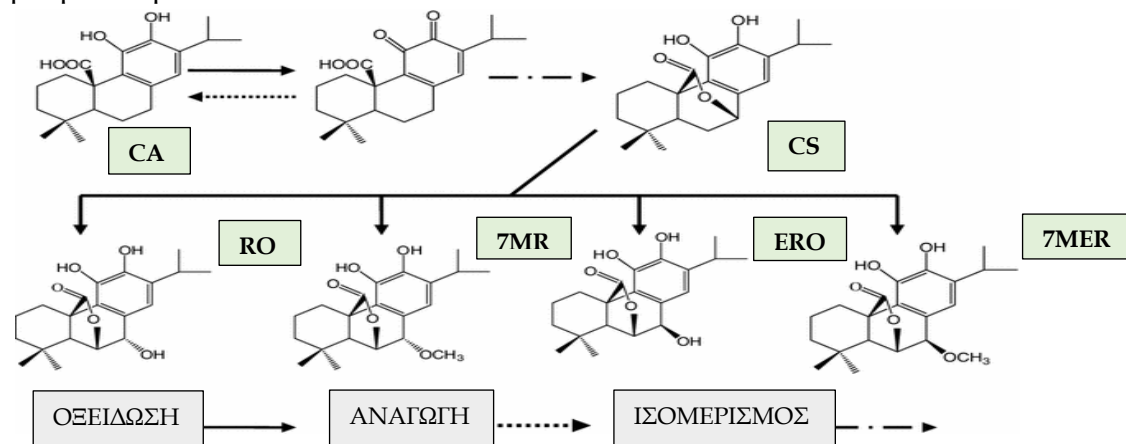
- -τέσσερα μεθύλια:
 - i. στη θέση 16 που εμφανίζει διπλή κορυφή (d) στην αλειφατική ζώνη και ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια
 - ii. στη θέση 17 που εμφανίζει διπλή κορυφή (d) στην αλειφατική ζώνη και ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια
 - iii. στη θέση 18 που εμφανίζει απλή κορυφή (s) στην αλειφατική ζώνη και ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια
 - iv. στη θέση 19 που εμφανίζει απλή κορυφή (s) στην αλειφατική ζώνη και ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια
- ένα μεθυνικό πρωτόνιο στη θέση 15 που εμφανίζει επταπλή κορυφή (sept) στην αλειφατική ζώνη και ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο
- ένα μεθυνικό πρωτόνιο στη θέση 5 που εμφανίζει μονή κορυφή (s) στην αλειφατική ζώνη και ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο
- ένα αρωματικό πρωτόνιο στη θέση 14 που εμφανίζει μονή κορυφή (s) και ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο
- το πρωτόνιο του φαινολικού υδροξυλίου της θέσης 11 που εμφανίζει ευρεία μονή κορυφή (br s) στην αρωματική ζώνη και ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο
- το πρωτόνιο του φαινολικού υδροξυλίου της θέσης 12 που εμφανίζει ευρεία μονή κορυφή (br s) στην αρωματική ζώνη και ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο

Η ταυτοποίηση των εξεταζόμενων ουσιών βασίστηκε στην σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (σε CDCl_3) των καθαρών απομονωμένων ουσιών, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 1 του εργαστηριακού μέρους της παρούσας διατριβής, με τα φάσματα των ολικών εκχυλισμάτων των φυτών που εξετάστηκαν.

Σε όλα τα φυτικά εκχυλίσματα που αναλύθηκαν δεν υπήρξε περίπτωση κατά την οποία να έχει ταυτοποιηθεί η καρνοσόλη, ή η ροσμανόλη, ή η 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη, ή το 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ, χωρίς την παρουσία του καρνοσικού οξέος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ουσίες ροσμανόλη, 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη και καρνοσόλη προκύπτουν από την μετατροπή του καρνοσικού οξέος και δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν χωρίς την παρουσία του τελευταίου. Η παρατήρηση αυτή, ως προς την καρνοσόλη και το καρνοσικό οξύ, είναι σε πλήρη συμφωνία με την εργασία των Abreu et al., (2008), οι οποίοι ερέυνησαν τα μεθανολικά εκχυλίσματα, με

HPLC/MS, σε 60 είδη του γένους *Salvia* ως προς την καρνοσόλη, το καρνοσικό οξύ, το 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ και την ισοροσμανόλη, διαπιστώνοντας ότι όλα τα είδη φυτών που περιείχαν καρνοσόλη εμφάνιζαν και καρνοσικό οξύ στα φύλλα τους, χωρίς όμως να ισχύει το αντίστροφο. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι το καρνοσικό οξύ είναι η πρόδρομη ουσία των φαινολικών διτερπενίων με γ- και δ- λακτονικές δομές και ότι, παρουσία οξυγόνου, το καρνοσικό οξύ μετατρέπεται σε καρνοσόλη και ισοροσμανόλη (Schwarz et al. 1992, Cuvelier et al. 1996).

Σε κανένα από τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών που αναλύθηκαν δεν ταυτοποιήθηκε η 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη. Η ουσία αυτή απομονώθηκε από τα φύλλα του *R. officinalis* L. τα οποία έμειναν σε επαφή με το διαλύτη (μεθανόλη) για 2 μήνες, όπως αναλυτικά περιγράφηκε στο κεφάλαιο 1 της παρούσας διατριβής. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία της ουσίας αυτής υπήρχε και στο εκχύλισμα δεντρολίβανου που είχε μείνει σε επαφή με το διαλύτη (εμβροχή) για 7 ημέρες, αλλά σε πολύ μικρότερες ποσότητες από αυτές που συναντήθηκαν στους 2 μήνες εμβροχής. Όσον αφορά το παρόν πείραμα, φαίνεται ότι τα 30 min επαφής του διαλύτη (υπό την επίδραση των υπερήχων) με τα φύλλα των φυτών, που περιείχαν καρνοσικό οξύ, δεν ήταν επαρκής για τη μετατροπή μέρους του καρνοσικού οξέος σε 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη. Σύμφωνα με τους Liu et al., (2013), η προτεινόμενη οδός αποικοδόμησης του καρνοσικού οξέος σε διάλυμα μεθανόλης παρουσιάζεται στην εικόνα 77. Οι ίδιοι συγγραφείς θεώρησαν ότι οι ενώσεις ροσμανόλη, 7-O-μεθυλ-ροσμανόλη και 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη, λόγω της σταθερότητας τους, αποτελούν τα τελικά προϊόντα της αποικοδόμησης του καρνοσικού οξέος στη μεθανόλη. Στην συγκεκριμένη μελέτη άφησαν καθαρό καρνοσικό οξύ στην μεθανόλη για 36 ώρες πριν αρχίσουν την ταυτοποίηση των μεταβολιτών του καρνοσικού οξέος με την μέθοδο HPLC-UV. Σε άλλη εργασία, οι Richheimer et. al., (1996), διαπίστωσαν ότι η 7-μεθοξυ-ροσμανόλη και η 7-μεθοξυ-επιροσμανόλη σχηματίστηκαν όταν μια μικρή ποσότητα, είτε του καρνοσικού οξέος είτε της καρνοσόλης, θερμάνθηκε με μεθανόλη στους 100 °C για 2 ώρες, καταλήγοντας ότι η ροσμανόλη και η επιροσμανόλη, με την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας, μπορούν να μετατραπούν σε 7-O-μεθυλ-ροσμανόλη και 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη.



Εικόνα 77

Διαδρομή αποικοδόμησης καρνοσικού οξέος (CA) σε μεθανόλη προς καρνοσόλη (CS) ροσμανόλη (RO), επιροσμανόλη (ERO), 7-O-μεθυλοροσμανόλη (7MR) και 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη (7MER) (Liu et al. 2013).

Η παρουσία καρνοσικού οξέος ή/και καρνοσόλης σε ένα εκχύλισμα, δεν συνεπάγεται και την ύπαρξη του 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικού οξέος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το μεθανολικό εκχύλισμα των φύλλων της *Salvia somalensis*, που παρουσιάζει μεγάλες ποσότητες καρνοσικού οξέος και καρνοσόλης, αλλά δεν περιέχει 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικού οξύ. Ωστόσο, το αντίστροφο δεν ισχύει, διότι όποτε ταυτοποιήθηκε το τελευταίο υπήρχαν πάντα μια ή και οι δύο πρώτες ουσίες.

Άλλη μια παρατήρηση που προκύπτει είναι ότι τα υψηλά επίπεδα καρνοσικού οξέος δεν συσχετίζονται κατ' ανάγκη με υψηλά επίπεδα καρνοσόλης στα είδη που μελετήθηκαν. Δεδομένου ότι η καρνοσόλη προέρχεται από τη μετατροπή του καρνοσικού οξέος, γίνεται εύλογο ότι:

- μείωση της ποσότητας του καρνοσικού οξέος να συνεπάγεται έστω παροδική αύξηση καρνοσόλης
- παρουσία υψηλών ποσοτήτων και των δύο ουσιών σε ένα φυτικό εκχύλισμα οφείλεται σε ακόμα μεγαλύτερη αρχική ποσότητα καρνοσικού οξέος.

Δεδομένης της ευαισθησίας του καρνοσικού οξέος σε διάφορους παράγοντες, όπως είναι: υψηλή θερμοκρασία, pH, παρουσία οξυγόνου και πολικότητα διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί, γίνεται κατανοητό πόσο μεγάλη σημασία διαδραματίζει η επεξεργασία της δρόγης στα ποσοτικά στοιχεία των διτερπενίων αβιετανίου.

Η λήψη των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ των δειγμάτων σε CDCl_3 εξασφαλίζει ότι δεν θα υπάρξει αλληλεπίδραση με το διαλύτη κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, αντίθετα με το ότι θα συνέβαινε αν χρησιμοποιούνταν κάποιος πολικός διαλύτης όπως είναι η CD_3OD .

Εν κατακλείδι, το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του μεθανολικού εκχυλίσματος του κάθε φυτού που εξετάστηκε, παρουσιάζει μια μοναδική αλληλουχία κορυφών, που μπορεί, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, να χρησιμοποιηθεί ως «δακτυλικό αποτύπωμα» με απώτερο σκοπό την βοτανική διαφοροποίηση και αναγνώριση των φυτών κοντινών γενών και ειδών. Αυτή η διαδικασία μπορεί να έχει περαιτέρω εφαρμογή και στον έλεγχο των δρογών για τυχόν νοθεύσεις. Οι ποιοτικές και ποσοτικές αναλύσεις με χρήση τεχνικής φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$:

- Είναι σύντομες,
- Εμφανίζουν υψηλή επαναληψιμότητα και ακρίβεια,
- Παρέχουν δυνατότητα σύγκρισης φασμάτων μεταξύ διαφορετικών οργάνων χωρίς την ανάγκη για εσωτερική τυποποίηση ή βαθμονόμηση,
- Επιτρέπουν τη σύγχρονη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεγάλου αριθμού ενώσεων,
- Αποτελούν μη καταστροφική για το δείγμα τεχνική αφού αυτό μένει αμετάβλητο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά.

Να σημειωθεί ότι σε όλα τα παραδείγματα αναγνώρισης-διαφοροποίησης φυτών με $^1\text{H-NMR}$ που προηγήθηκαν, δεν λήφθηκαν υπόψη τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των φασμάτων, δηλαδή η ολοκλήρωση των κορυφών ενδιαφέροντος, για το λόγο ότι οι παράμετροι που επηρεάζουν τα ποσοτικά δεδομένα είναι πάρα πολλοί και απρόβλεπτοι. Αξίζει να αναφέρουμε το παράδειγμα στην εργασία των Abreu et al. (2008), οι οποίοι διαπίστωσαν πως η περιεκτικότητα σε καρνοσικό οξύ των δρογών

που ερευνηθήκαν ήταν σε συνάρτηση με την ηλικία του φυτού και με την εποχή συγκομιδής.

Θα αναφερθεί ως μειονέκτημα της τεχνικής $^1\text{H-NMR}$ η αδυναμία ανίχνευσης αλειφατικών ουσιών σε ένα περίπλοκο φάσμα $^1\text{H-NMR}$, όπως είναι αυτά που αφορούν ολικά εκχυλίσματα φυτικών δρογών, χωρίς προηγούμενες χρωματογραφικές διαδικασίες.

Πράγματι, στην παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης δύο αλειφατικών ουσιών, της θουγιόνης στα ολικά μεθανολικά εκχυλίσματα των φύλλων φυτών *S. officinalis* και *S. fruticosa*, καθώς και κάμφορας στα φύλλα *R. officinalis* με τη μέθοδο $^1\text{H-NMR}$, δηλαδή σε φυτά γνωστά για την ύπαρξη αυτών των μεταβολιτών, χωρίς όμως θετικό αποτέλεσμα. Η επικάλυψη των σημάτων των μεθυλιών στην αλειφατική ζώνη δεν επέτρεψε την ταυτοποίηση των ουσιών αυτών, μολονότι υπήρχαν τα $^1\text{H-NMR}$ φάσματα των καθαρών ουσιών. Η θουγιόνη και κάμφορα ως πιητικές ουσίες θα ήταν καλύτερο να ταυτοποιηθούν σε νωπή δρόγη, ωστόσο επιλέχθηκε η μελέτη τους να γίνει σε αποξηραμένη, λόγω του ότι με αυτή τη μορφή χρησιμοποιείται η δρόγη των ειδών του γένους *Salvia* και *Rosmarinus* στην παραδοσιακή ιατρική για την παρασκευή αφεψημάτων, εγχυμάτων, φαρμακευτικών βαμμάτων κ.α. Η α - β -θουγιόνη και η (1S)-(-)-κάμφορα αγοράστηκαν από την Sigma Aldrich, Germany

Περιορισμό στη χρήση $^1\text{H-NMR}$ αποτελεί και η χαμηλή ευαισθησία (το όριο ανίχνευσης στα 10^{-6} mol και η ανάγκη διάθεσης μεγαλύτερης ποσότητας του εξεταζόμενου δείγματος) του σε σύγκριση με τη φασματομετρία μάζας (όριο ανίχνευσης 10^{-12} mol, ανάγκη διάθεσης μικρότερης ποσότητας του εξεταζόμενου δείγματος). Συνεπώς η $^1\text{H-NMR}$ δεν είναι η καταλληλότερη μέθοδος ανάλυσης για την ταυτοποίηση ουσιών που βρίσκονται σε πολύ μικρή συγκέντρωση ($<10^{-6}$ mol) στο δείγμα ή στις περιπτώσεις όπου η διαθέσιμη ποσότητα του δείγματος είναι πάρα πολύ μικρή (De Falco et al. 2018). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί, ότι η ευαισθησία της τεχνικής $^1\text{H-NMR}$ έχει αυξηθεί δραστικά με τις πρόσφατες εξελίξεις, όπως είναι η εφαρμογή μαγνητικών πεδίων υψηλότερης έντασης (Kim et al. 2011, Forseth et al. 2011). Επίσης, η τεχνική $^1\text{H-NMR}$ επιτρέπει την αναγνώριση άγνωστων ενώσεων στα αναλυμένα μείγματα, καθώς δίνει σημαντικές δομικές πληροφορίες (Forseth et al. 2011).

Η εκθετική αύξηση του αριθμού των δημοσιεύσεων σχετικά με τις εφαρμογές της μεθόδου NMR στην επιστήμη των τροφίμων και στην ανάλυση των φυτικών εκχυλισμάτων την τελευταία δεκαετία, επιβεβαιώνει ότι αυτή η τεχνική, η οποία στο παρελθόν έχει εφαρμοστεί αποκλειστικά σχεδόν στην βασική έρευνα της οργανικής χημείας, χρησιμοποιείται πλέον στον έλεγχο των τροφίμων ως πρακτική ρουτίνας. Η μέθοδος NMR είναι μοναδικά εφαρμόσιμη σε βάσεις δεδομένων, όπου το χημικό αποτύπωμα των αυθεντικών προϊόντων μπορούν να αποθηκευτούν και αργότερα να συγκριθούν για να επαληθευτεί η συμμόρφωση των εμπορικών δειγμάτων. Για παράδειγμα, οι εμπορικές βάσεις δεδομένων που δημιουργήθηκαν από την Bruker για χυμούς φρούτων, κρασί και μέλι μπορούν να θεωρηθούν παραδειγματικές για μια τέτοια προσέγγιση. Παρόμοιες βάσεις δεδομένων πρέπει να δημιουργηθούν στο

μέλλον για εκχυλίσματα φαρμακευτικών φυτών και για καθαρές ουσίες φυσικής προέλευσης (Kuballa et al. 2018, Lachenmeier et al. 2016)

Συνεπώς, η εναπομένουσα πρόκληση με την προσέγγιση NMR έγκειται στη δημιουργία βάσης δεδομένων. Για το λόγο αυτό θα πρέπει:

- να καθοριστεί το πρωτόκολλο προετοιμασίας δείγματος (π.χ. η εκχύλιση, η αραιώση, ο διαλύτης, το pH, κ.λπ.) και να ενοποιηθεί μεταξύ όλων των ινστιτούτων που συμβάλλουν σε μια τέτοια βάση δεδομένων,
- να καθοριστεί ο πραγματικός εξοπλισμός NMR (ειδικά η ισχύς πεδίου) και τα πρωτόκολλα μέτρησης,
- να ληφθούν πρότυπα δείγματα.

Στην παρούσα διατριβή, με τη χρήση του $^1\text{H-NMR}$ πραγματοποιήθηκε η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση συγκεκριμένων ουσιών σε σύνθετα μείγματα, όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα, με μια απλή, ταχεία και μεγάλης ακρίβειας διαδικασία. Πράγματι, η ποσοτική $^1\text{H-NMR}$ (q-NMR) είναι ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών σε φυτικά εκχυλίσματα χωρίς την ανάγκη επίπονης και χρονοβόρας διαδικασίας κλασμάτωσης και απομόνωσης. Η περιοχή (αναφερόμενη ως η ένταση ή το ολοκλήρωμα) ενός σήματος NMR είναι ευθέως ανάλογη προς τον αριθμό των αντίστοιχων πυρήνων και έτσι, σε αντίθεση με άλλες τεχνικές, ο παράγοντας απόκρισης δεν εξαρτάται από τη μοριακή δομή. Μέχρι σήμερα, το q-NMR θεωρείται ότι είναι τουλάχιστον εξίσου αξιόπιστο και ακριβές με τις συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες χρωματογραφικές τεχνικές ενώ παρέχει αρκετά πλεονεκτήματα όπως απλή ανάπτυξη μεθόδου, εύκολη προετοιμασία δείγματος και σύντομο χρόνο ανάλυσης.

Η ποσοτικοποίηση των πολυφαινόλων και των τερπενίων σε σύνθετα φυτικά εκχυλίσματα με τη χρήση q-NMR έχει περιγραφεί εκτεταμένα (SimmLer et al. 2014, Kontogianni et al. 2009, Charisiadis et al. 2012).

Η μεταβολομική ανάλυση με τη χρήση της NMR έχει πολλές εφαρμογές στην επιστήμη των φυτών. Για παράδειγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διαφοροποιηθούν τα φυτά από διαφορετική προέλευση ή μετά από διαφορετικές επεξεργασίες (Kim et al. 2010). Το κύριο πλεονέκτημα της NMR μεταβολομικής ανάλυσης των φυτικών δρογών είναι η δυνατότητα ταυτοποίησης μεταβολιτών με σύγκριση δεδομένων NMR με παραπομπές ή με διαλεύκανση δομής με τη χρήση δισδιάστατου NMR.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ_ ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των εξεταζόμενων μεταβολιτών στα εγχύματα, αφεψήματα, φαρμακευτικά βάμματα, φαρμακευτικό οίνο και ελαιόλυτα των *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. και *Salvia fruticosa* Mill.: διερεύνηση της αποδοτικότερης μεθόδου

“Μπορούμε να μιμηθούμε και να αντιγράψουμε τη φύση, αλλά δεν είναι δυνατό να ξεπεράσουμε τη φαντασία της και την σοφία της. Αφενός την φαντασία της και την σοφία της η φύση την καλλιεργεί εδώ και εκατομμύρια χρόνια εξ αρχής του κόσμου, αφετέρου πως μπορεί κάποιος να ξεπεράσει τη φαντασία και τη σοφία του Θεού μια και η φύση είναι η ζωγραφιά του?”

1. Εισαγωγή

Στα προηγούμενα κεφάλαια του πειραματικού μέρους της παρούσας διατριβής:

- αναλύθηκε ο δυνητικά σημαντικός ρόλος του μεθανολικού εκχυλίσματος του *R. officinalis*, των διτερπενίων καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη, του τριτερπενίου μπετουλινικό οξύ και του φλαβονοειδούς 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνη, ως παράγοντες πρόληψης και θεραπείας λόγω της συμπεριφορά τους έναντι του AhR
- πραγματοποιήθηκε η ποσοτική και η ποιοτική ανάλυση σε ένα σημαντικό αριθμό φυτών που φθόνται-καλλιεργούνται στην Ελλάδα της οικογένειας των Χειλανθών ως προς τις ουσίες καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ, 7-O-μεθυλ-*epi*-ροσμανόλη, ροσμανόλη, μπετουλινικό οξύ και 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνη.

Το επόμενο βήμα είναι πως όλα αυτά τα αποτελέσματα θα μπορέσουν να αποκτήσουν πρακτική εφαρμογή έτσι ώστε ο καθένας μας στην καθημερινότητα του να μπορεί να επωφεληθεί από αυτά.

Όπως λεπτομερώς περιγράφηκε στο θεωρητικό μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής τα φυτά *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* και *Salvia fruticosa* είναι από τα πιο γνωστά σε παγκόσμιο επίπεδο. Επίσης, όπως διαπιστώθηκε στο κεφάλαιο 3 του πειραματικού μέρους, τα φύλλα αυτών των φυτών είναι από τα πιο πλούσια σε CA και CS. Πρόκειται για φυτά που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην παραδοσιακή λαϊκή ιατρική, αλλά και από επιστήμονες φυτοθεραπευτές, για την πρόληψη και την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών και συμπτωμάτων, σε διάφορες φαρμακευτικές μορφές:

- κυρίως ως εγχύματα και αφεψήματα
- ως φαρμακευτικά βάμματα και μητρικά βάμματα
- πιο σπάνια ως ελαιόλυτα και ως οινόλυτα

Ο στόχος αυτού του κεφαλαίου δεν ήταν μια απλή ανάλυση ενός εγχύματος ή αφεψήματος, αλλά η εύρεση της ιδανικής μεθόδου (π.χ. χρόνος επαφής δρόγης-διαλύτη) με την οποία θα υπάρχει η καλύτερη απόδοση εκχύλισης για τις εξεταζόμενες ουσίες. Για παράδειγμα, το CA είναι η πιο ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία του *R. officinalis* L. Επιπλέον, η βιβλιογραφική έρευνα στην ιστοσελίδα PubMed έδειξε ότι είναι και το πιο μελετημένο μόριο από τα διτερπένια αβιετανίου αναφορικά με την προστατευτική του δράση στο ΚΝΣ, την μείωση της μνήμης, την άνοια και τη νόσο του Alzheimer (η πρόταση carnosic central nervous system είχε 21 άρθρα, η carnosol central nervous system 9 άρθρα, η carnosic Alzheimer 17 άρθρα, η carnosol Alzheimer 3 άρθρα, η carnosic dementia 7 άρθρα και η carnosol dementia 3 άρθρα). Πράγματι οι φυσικοχημικές ιδιότητες του CA του επιτρέπουν να διαβεί τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Blood Brain Barrier) καθιστώντας το χρήσιμο για το ΚΝΣ (Sato et al. 2008). Το εκχύλισμα φύλλων *R. officinalis* L. που περιέχει CA ανέστειλε τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης και της βουτυρυλοχολινεστεράσης στον εγκέφαλο αρουραίων (Ozarowski et al. 2013). Γίνεται εύκολα κατανοητό ότι στην περίπτωση που θέλουμε να ενισχύσουμε την μνήμη με τα φύλλα *R. officinalis* L. θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια τέτοια μέθοδος εκχύλισης έτσι ώστε να έχουμε τη μέγιστη τιμή του CA.

Συνεπώς, ήταν επόμενη και εύλογη η σκέψη για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των προαναφερόμενων φαρμακευτικών μορφών των εν λόγω φυτών, ως προς τις ουσίες CA, CS, 12MCA, 7MER, RO, BA και DMA.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων εξάχθηκαν χρήσιμες πληροφορίες και για την σταθερότητα των ουσιών αυτών στις διάφορες φαρμακευτικές μορφές που αναλύθηκαν.

2. Επιλογή φυτών της οικογένειας Lamiaceae που αναπτύσσονται στην Ελλάδα για την ποιοτική και ποσοτική μελέτη των φαρμακευτικών τους μορφών

Επιλέχθηκαν τα φυτά *R. officinalis*, *S. officinalis* και *S. fruticosa* γιατί:

- είναι από τα πιο πλούσια στις εξεταζόμενες ουσίες
- είναι από τα πιο γνωστά φυτά παγκοσμίως (σε σχέση με άλλες φυτικές δρόγες που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση στις εξεταζόμενες ουσίες) με ευρεία εφαρμογή στην παραδοσιακή ιατρική και στην φυτοθεραπεία, με πολύ μεγάλο αριθμό επιστημονικών δημοσιεύσεων
- φυτά πολύ διαδεδομένα για την χρήση τους ως εγχύματα-αφεψήματα, ως συστατικά σε συμπληρώματα διατροφής, σε ιατροτεχνολογικά προϊόντα ή απλά ως καρυκεύματα (Ribeiro-Santos et al. 2015).

3. Υδατικά εκχυλίσματα

Επιλέχθηκαν τα ίδια φυτά *R. officinalis*, *S. officinalis* και *S. fruticosa*.

Έγιναν εγχύματα, αφεψήματα και εκχυλίσματα με τυρβώδη ροή.

Σε όλα τα πειράματα που απαιτούνταν ζεστό νερό η θερμοκρασία του ήταν ίση με 150 °C. Χρησιμοποιήθηκε εμφιαλωμένο μεταλλικό νερό "Ζαγόρι".

Χρησιμοποιήθηκαν τα αποξηραμένα φύλλα των φυτών. Η αναλογία δρόγης/διαλύτη ήταν:

- 2: 150 w/v για το *R. officinalis* (ESCOP, WHO)
- και 1,5: 150 w/v για την *Salvia officinalis* (ESCOP) και την *Salvia fruticosa*.

Για το κάθε φυτό που προαναφέρθηκε έγιναν:

- 4 διαφορετικά πειράματα σε συνάρτηση με το χρόνο έγχυσης-αφέψησης: 2 min, 5 min, 10 min και 15 min. Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές.
- 2 διαφορετικά πειράματα σε συνάρτηση με την θερμοκρασία του ύδατος: σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (εκχύλιση με τυρβώδη ροή εν ψυχρώ) ή βραστό (εκχύλιση με τυρβώδη ροή εν θερμώ). Ο χρόνος στροβιλισμού ήταν σταθερός στα δύο 2 min. Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε εις τριπλούν.

3.1. Ανάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων ¹H-qNMR

Το υδατικό εκχύλισμα (έγχυμα ή αφέψημα ή εκχύλισμα με τυρβώδη ροή) εκχυλίστηκε σε διαχωριστική χοάνη με ίσο όγκο CH₂Cl₂ και συλλογή της οργανικής φάσης σε σφαιρική φιάλη με προσθήκη 500 μL διαλύματος συριγγαλδεΐδης. Το συλλεχθέν υγρό συμπυκνώνεται υπό κενό (40 °C) και ακολουθεί λήψη φάσματος 1D ¹H-NMR (CDCl₃).

3.2 Εγχύματα

Τα εγχύματα είναι προϊόντα εκχύλισης που προκύπτουν με την εμβροχή της δρόγης, συνήθως αποξηραμένης, με ζεστό νερό που προηγουμένως έχει βράσει. Ο συνήθης χρόνος επαφής δρόγης-ύδατος είναι 2 με 5 λεπτά. Ακολουθεί διήθηση επί χάρτου, συλλογή του διηθήματος και επαναφορά στον αρχικό όγκο με προσθήκη νερού που είχε χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή του εγχύματος. (Bettiol et al. 2009, Bettiol 2010, Firenzuoli 2009, Capasso et al. 2006).

3.3 Αφεψήματα

Τα αφεψήματα είναι προϊόντα που προκύπτουν όταν η δρόγη, συνήθως αποξηραμένη, εκχυλίζεται δια βρασμού στο νερό επί ορισμένου χρόνου (Bettiol et al. 2009, Bettiol 2010, Firenzuoli 2009, Capasso et al. 2006).

3.4 Εκχύλιση με τυρβώδη ροή, στροβιλισμό (Turbolent-extraction)

Η διαδικασία παρασκευής του εκχυλίσματος και η ανάλυση του ήταν όπως και με την κλασική μέθοδο εμβροχής με την διαφορά ότι η τεμαχισμένη δρόγη-νερό τοποθετήθηκε σε μίξερ και ακολούθησε στροβιλισμός για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Το νερό ήταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (εκχύλιση με τυρβώδη ροή εν ψυχρώ) ή βραστό (εκχύλιση με τυρβώδη ροή εν θερμώ).

3.5 Αποτελέσματα υδατικών εκχυλισμάτων

Τα αποτελέσματα των εγχυμάτων, αφεψημάτων και εκχυλισμάτων με τυρβώδη ροή παρουσιάζονται στο πίνακα 63 και στα γραφήματα 3,4,5,6,7,8,9,10 και 11.

Πίνακας 63

ΥΔΑΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΣΕ ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΜΕ ΤΟ ΧΡΟΝΟ (mg±SD/g δρόγης)						
Φυτό/ Εκχύλισμα		Ουσίες	2 min	5 min	10 min	15 min
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Εγχύματα	12MCA	tr	tr	tr	tr
		CA	tr	tr	tr	0,18±0,05
		CS	tr	tr	tr	tr
		7MER	nd	nd	nd	nd
		RO	0,25±0,03	0,32±0,08	0,42±0,07	0,21±0,03
		DMA	nd	nd	nd	nd
		BA	nd	nd	tr	tr
		Σ ¹	0,25	0,32	0,42	0,39
	Αφεψήματα	12MCA	tr	tr	0,12± 0,04	0,11±0,04
		CA	tr	tr	0,16±0,07	0,29±0,08
		CS	nd	nd	tr	tr
		7MER	nd	nd	nd	nd
		RO	0,30±0,04	0,38±0,05	0,40±0,06	0,40±0,02
		DMA	nd	nd	nd	nd
		BA	nd	nd	nd	nd
		Σ ¹	0,30	0,38	0,68	0,80
	Εκχυλίσματα με τυρβώδη ροή σε Τ ^ο περιβάλλοντος	12MCA	nd	nm	nm	nm
		CA	nd	nm	nm	nm
		CS	trace	nm	nm	nm
		7MER	nd	nm	nm	nm
		RO	nd	nm	nm	nm

		DMA	nd	nm	nm	nm
		BA	nd	nm	nm	nm
		Σ ¹	tr	nm	nm	nm
	Εκχυλίσματα με τυρβώδη ροή εν θερμώ	12MCA	0,12±0,01	nm	nm	nm
		CA	0,32±0,03	nm	nm	nm
		CS	0,17±0,02	nm	nm	nm
		7MER	nd	nm	nm	nm
		RO	0,23±0,03	nm	nm	nm
		DMA	nd	nm	nm	nm
		BA	0,11±0,02	nm	nm	nm
Σ ¹		0,84	nm	nm	nm	
Φυτό/ Εκχύλισμα	Ουσίες	2 min	5 min	10 min	15 min	
<i>Salvia fruticosa</i> Mill.	Εγχύματα	12MCA	0,10±0,01	0,11±0,01	0,13±0,01	tr
		CA	0,13±0,01	0,37±0,08	0,56±0,06	0,75±0,09
		CS	tr	tr	0,13±0,01	0,19±0,01
		7MER	nd	nd	nd	nd
		RO	0,52±0,04	0,42±0,03	0,34±0,02	0,34±0,02
		Σ ¹	0,75	0,90	1,16	1,28
	Αφεψήματα	12MCA	0,20±0,03	0,32±0,05	0,34±0,03	0,33±0,07
		CA	0,86±0,09	1,62±0,18	1,38±0,12	1,33±0,38
		CS	0,14±0,06	0,26±0,10	0,25±0,06	0,17±0,06
		7MER	nd	nd	nd	nd
		RO	0,96±0,01	1,12±0,19	1,24±0,03	1,00±0,08
		Σ ¹	2,16	3,32	3,21	2,83

	Εκχυλίσματα με τυρβώδη ροή σε Τ° περιβάλλοντος	12MCA	tr	nm	nm	nm
		CA	tr	nm	nm	nm
		CS	0,19±0,10	nm	nm	nm
		7MER	nd	nm	nm	nm
		RO	nd	nm	nm	nm
		Σ ¹	0,19	nm	nm	nm
	Εκχυλίσματα με τυρβώδη ροή εν θερμώ	12MCA	0,17±0,04	nm	nm	nm
		CA	1,12±0,44	nm	nm	nm
		CS	0,24±0,03	nm	nm	nm
		7MER	nd	nm	nm	nm
		RO	0,53±0,18	nm	nm	nm
		Σ ¹	2,06	nm	nm	nm
Φυτό/ Εκχύλισμα		Ουσίες	2 min	5 min	10 min	15 min
<i>Salvia officinalis</i> L.	Εγχύματα	12MCA	0,31±0,02	0,31±0,02	0,39±0,03	0,31±0,04
		CA	0,48±0,03	0,50±0,02	0,62±0,04	0,64±0,02
		CS	0,13±0,01	0,13±0,01	0,15±0,01	0,18±0,02
		7MER	nd	nd	nd	nd
		RO	0,14±0,02	0,14±0,02	0,24±0,08	0,16±0,01
		Σ ¹	1,06	1,08	1,40	1,29
	Αφεψήματα	12MCA	0,84±0,02	1,02±0,03	0,95± 0,05	0,74±0,03
		CA	1,25±0,02	1,52±0,13	0,81±0,12	0,60±0,02
		CS	tr	0,11±0,02	0,17±0,03	0,12±0,01
		7MER	nd	nd	nd	nd
		RO	0,65±0,04	0,74±0,09	0,85±0,05	0,41±0,07

	Σ ¹	2,74	3,39	2,78	1,87
Εκχυλίσματα με τυρβώδη ροή σε Τ ^ο περιβάλλοντος	12MCA	0,22±0,02	nm	nm	nm
	CA	0,11±0,01	nm	nm	nm
	CS	0,21±0,02	nm	nm	nm
	7MER	nd	nm	nm	nm
	RO	nd	nm	nm	nm
	Σ ¹	0,54	nm	nm	nm
Εκχυλίσματα με τυρβώδη ροή εν θερμώ	12MCA	0,95±0,04	nm	nm	nm
	CA	1,59±0,16	nm	nm	nm
	CS	0,30±0,03	nm	nm	nm
	7MER	nd	nm	nm	nm
	RO	0,11±0,03	nm	nm	nm
	Σ ¹	2,95	nm	nm	nm

¹Σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιτανίου ως άθροισμα των επιμέρους ΜΟ.

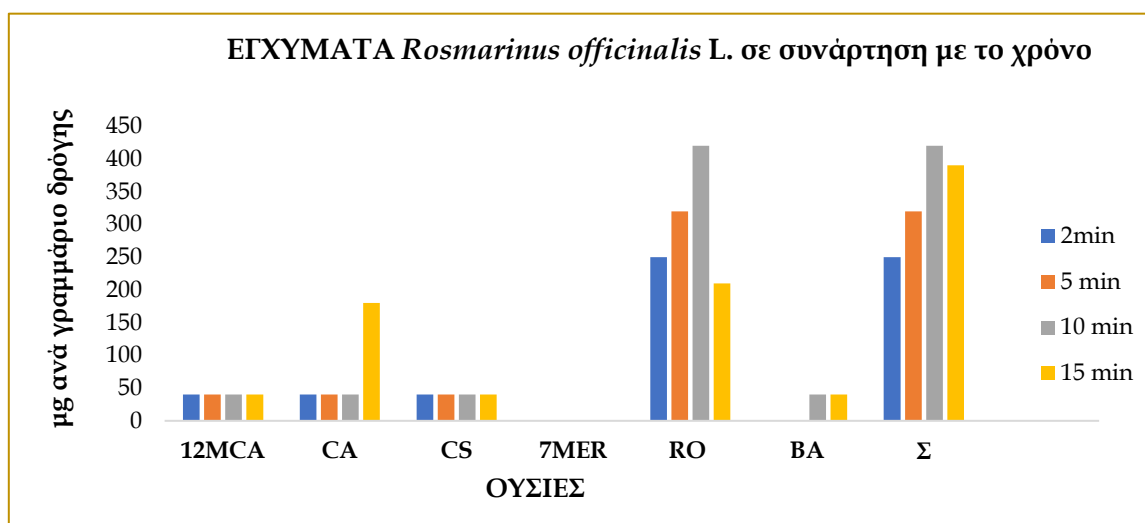
tr: trace, ίχνη (\geq LOD, $<$ LOQ)

nd: not detected, μη ανιχνεύσιμο ($<$ LOD)

nm: not measured, δεν μετρήθηκε

Γράφημα 3

ΜΟ $\mu\text{g/g}$ δρόγης ($40 \mu\text{g/g}$ δρόγης \leq trace $<$ $100 \mu\text{g/g}$).



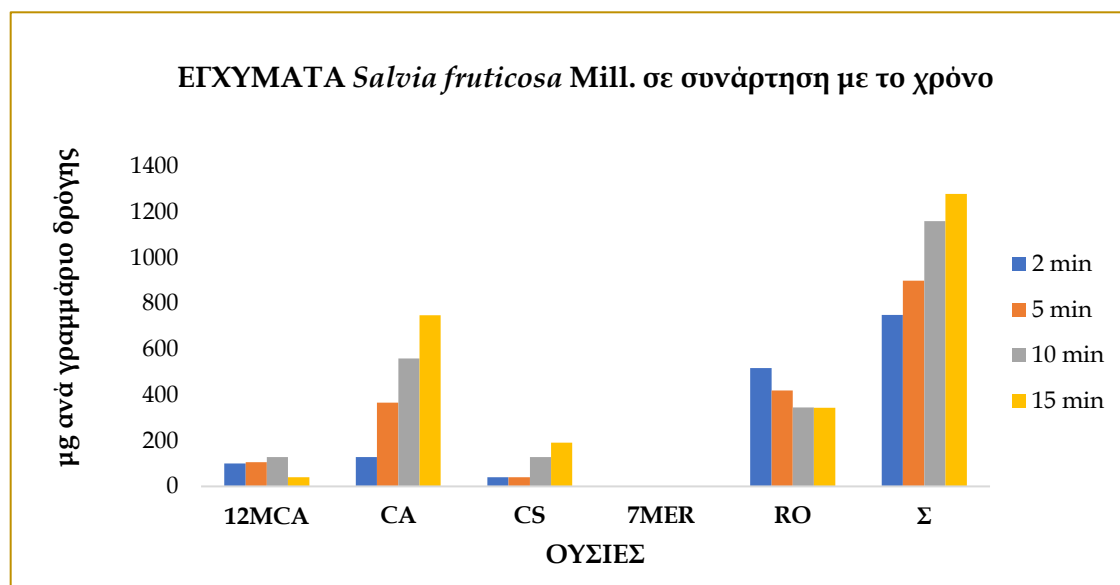
Όσον αφορά τα εγχύματα των φύλλων της *Rosmarinus officinalis* L. αποδείχθηκε ότι:

- κυρίαρχη ουσία σε όλους τους χρόνους των πειραμάτων ήταν η RO. Το ποσοτικό μέγιστο της RO ήταν στα 10 min έγχυσης
- το CA έδειξε την μέγιστη ποσότητα του στα 15 min έγχυσης.
- δεν ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες 7MER και DMA
- το άθροισμα των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου ήταν μέγιστο στα 10 min έγχυσης. Συγκεκριμένα κατά φθίνουσα σειρά είχαμε:
 $\Sigma_{10\text{min}} > \Sigma_{15\text{min}} > \Sigma_{5\text{min}} > \Sigma_{2\text{min}}$.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι εφόσον υπάρχει ενδιαφέρον για τα διτερπένια αβιετανίου και το BA, ο βέλτιστος χρόνος έγχυσης φύλλων του *R. officinalis* L. είναι από 10 έως 15 min.

Γράφημα 4

MO $\mu\text{g/g}$ δρόγης ($40 \mu\text{g/g}$ δρόγης \leq trace $<$ $100 \mu\text{g/g}$).



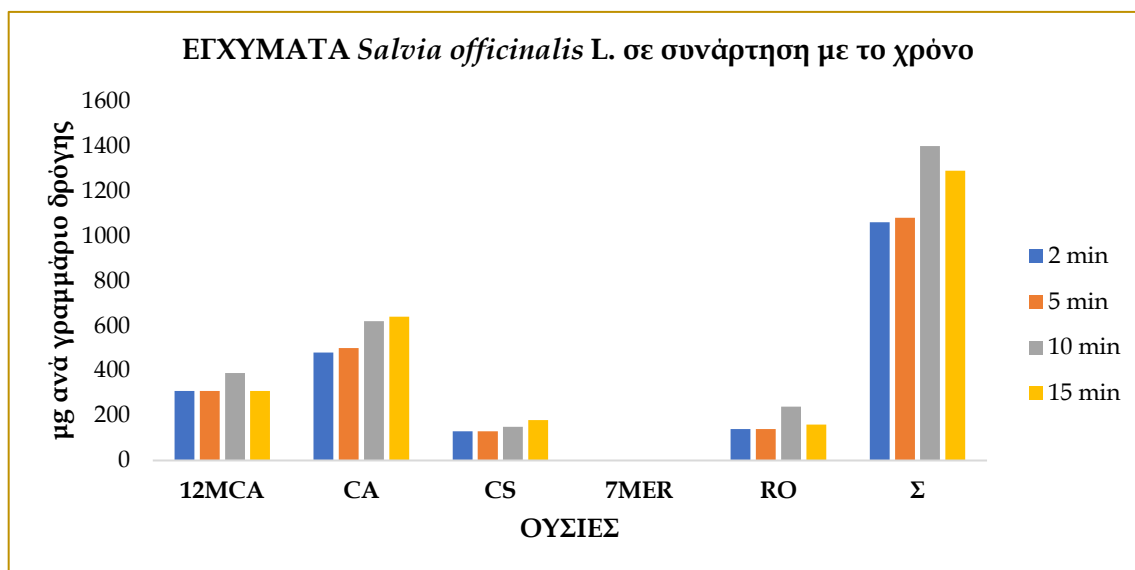
Όσον αφορά τα εγχύματα των φύλλων της *Salvia fruticosa* Mill. αποδείχθηκε ότι:

- η κυρίαρχη ουσία στα 2 και 5 min ήταν η RO ενώ στα 10 και 15 min ήταν το CA.
- οι ποσότητες των CA, CS ήταν ευθέως ανάλογες με τον χρόνο έγχυσης εμφανίζοντας την μέγιστη ποσότητα τους στα 15 min έγχυσης.
- το 12MCA είχε το ποσοτικό του μέγιστο στα 10 min έγχυσης
- δεν ταυτοποιήθηκε η 7MER
- το άθροισμα των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου ήταν μέγιστο στα 15 min έγχυσης. Πιο συγκεκριμένα κατά φθίνουσα σειρά είχαμε:
 $\Sigma_{15\text{min}} > \Sigma_{10\text{min}} > \Sigma_{5\text{min}} > \Sigma_{2\text{min}}$.

Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα αποτελέσματα προκύπτει ότι για την παραλαβή διτερπενίων αβιετανίου ο βέλτιστος χρόνος έγχυσης είναι τα 15 min όπως και για τη τους μεταβολίτες CA και CS.

Γράφημα 5

Τα αποτελέσματα είναι ΜΟ σε $\mu\text{g}/\text{g}$ δρόγης ($40 \mu\text{g}/\text{g}$ δρόγης $\leq \text{trace} < 100 \mu\text{g}/\text{g}$).



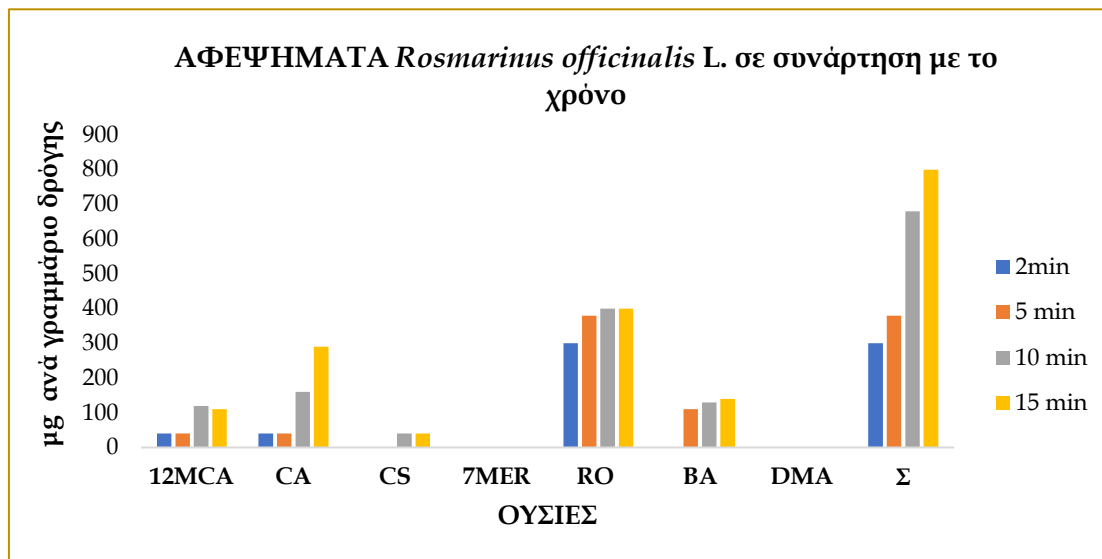
Όσον αφορά τα εγχύματα των φύλλων της *Salvia officinalis* L. αποδείχθηκε ότι:

- η κυρίαρχη ουσία σε όλους τους χρόνους των πειραμάτων ήταν το CA.
- οι ποσότητες του CA και της CS ήταν ευθέως ανάλογες με τον χρόνο επαφής της δρόγης στον διαλύτη (max=15 min έγχυσης)
- η RO και το 12MCA είχαν το ποσοτικό τους μέγιστο στα 10 min έγχυσης
- δεν ταυτοποιήθηκε η 7MER
- το άθροισμα των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου ήταν μέγιστο στα 10 min έγχυσης. Πιο συγκεκριμένα κατά φθίνουσα σειρά:
 $\Sigma_{10\text{min}} > \Sigma_{15\text{min}} > \Sigma_{5\text{min}} > \Sigma_{2\text{min}}$.

Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα αποτελέσματα μπορούμε να ισχυριστούμε ότι για τα διτερπένια αβιετανίου ο βέλτιστος χρόνος έγχυσης των φύλλων της *Salvia officinalis* L. είναι από 10 έως 15 min.

Γράφημα 6

ΜΟ σε µg/g δρόγης (40 µg/g δρόγης ≤ trace < 100 µg/g).

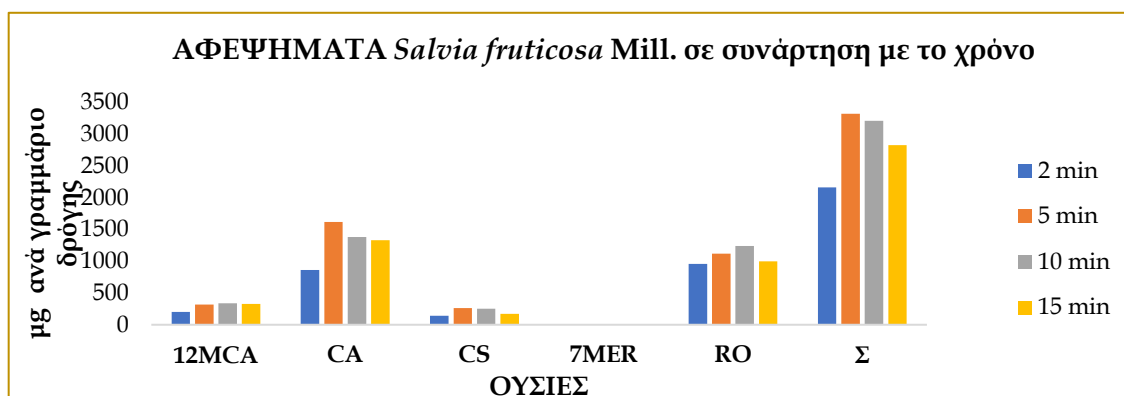


Όσον αφορά τα αφεψήματα φύλλων *R. officinalis* L. αποδείχθηκε ότι:

- η κυρίαρχη ουσία σε όλους τους χρόνους των πειραμάτων ήταν η RO
- οι ποσότητες CA, RO και BA ήταν ευθέως ανάλογες με τον χρόνο αφέψησης με μέγιστο στα 15 min.
- δεν ταυτοποιήθηκε η 7MER και η DMA
- το άθροισμα των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου ήταν ευθέως ανάλογο με τον χρόνο αφέψησης με μέγιστο στα 15 min. Πιο συγκεκριμένα κατά φθίνουσα σειρά είχαμε:
Σ_{15min} > Σ_{10min} > Σ_{5min} > Σ_{2min}.

Γράφημα 7

ΜΟ σε µg/g δρόγης (40 µg/g δρόγης ≤ trace < 100 µg/g).



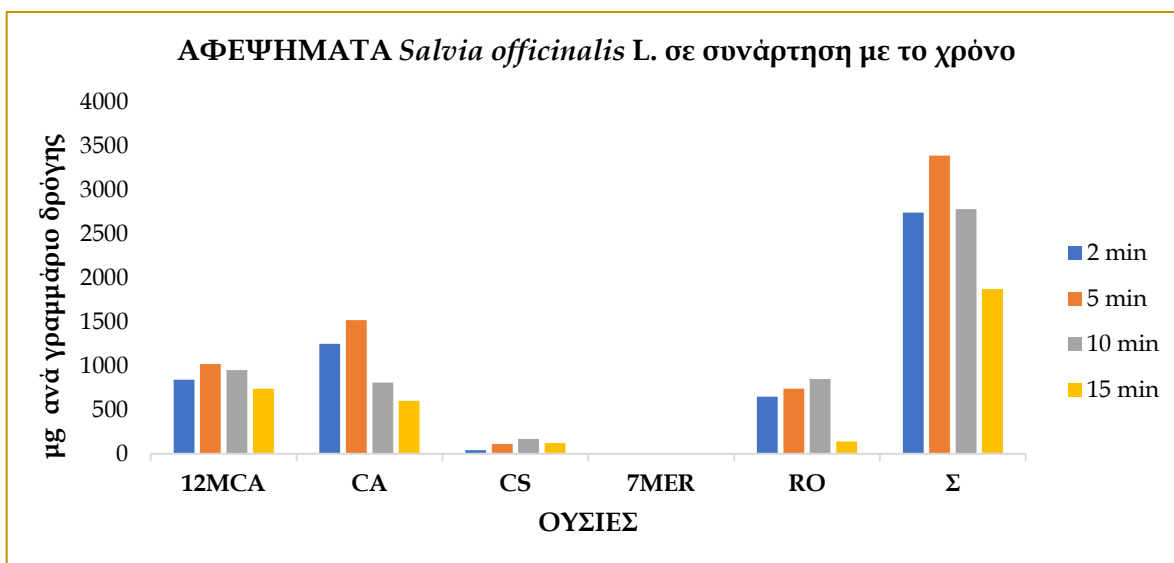
Όσον αφορά τα αφεψήματα των φύλλων της *Salvia fruticosa* Mill. αποδείχθηκε ότι:

- Η κυρίαρχη ουσία ήταν:
 - α) η RO μέχρι τα 2 min
 - β) το CA στα 5-10-15 min

- οι ποσότητες του CA και της CS ήταν ευθέως ανάλογες με τον χρόνο αφέψησης μέχρι τα 5 min όπου έδειξαν την μέγιστη ποσότητα τους ενώ στα 10 και 15 min ήταν αντιστρόφως ανάλογες με τον χρόνο.
- το 12MCA είχε το ποσοτικό του μέγιστο στα 10 min
- δεν ταυτοποιήθηκε η 7MER
- η RO είχε το μέγιστο της στα 10 min
- το άθροισμα των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου είχε μέγιστο στα 5 min. Πιο συγκεκριμένα κατά φθίνουσα σειρά είχαμε: $\Sigma^{5min} > \Sigma^{10min} > \Sigma^{15min} > \Sigma^{2min}$.

Γράφημα 8

ΜΟ σε $\mu\text{g/g}$ δρόγης ($40 \mu\text{g/g}$ δρόγης \leq trace $<$ $100 \mu\text{g/g}$).



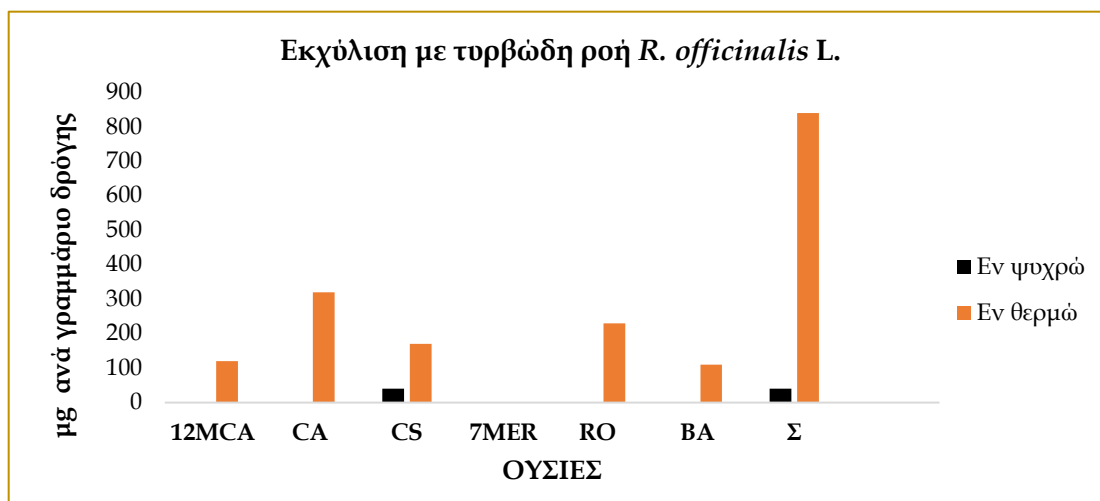
Όσον αφορά τα αφεψήματα φύλλων *Salvia officinalis* L. αποδείχθηκε ότι:

- Η κυρίαρχη ουσία ήταν:
 - α) το CA στα 2 και 5 min
 - β) το 12MCA στα 10 και 15 min
- η ποσότητα του CA ήταν ευθέως ανάλογη με τον χρόνο αφέψησης μέχρι τα 5 min όπου εμφάνισε το μέγιστο ενώ στα 10 και 15 min ήταν αντιστρόφως ανάλογη με τον χρόνο αφέψησης.
- το 12MCA είχε το ποσοτικό του μέγιστο στα 5 min αφέψησης.
- η RO είχε το ποσοτικό της μέγιστο στα 10 min αφέψησης.
- δεν ταυτοποιήθηκε η 7MER
- το άθροισμα των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου είχε μέγιστο στα 5 min. Πιο συγκεκριμένα κατά φθίνουσα σειρά είχαμε: $\Sigma^{5min} > \Sigma^{10min} > \Sigma^{2min} > \Sigma^{15min}$.

Στην περίπτωση που θα θέλαμε να αποκομίσουμε από το αφέψημα την μεγαλύτερη ποσότητα του CA και της CS, ως άθροισμα, πρέπει γίνει στα 5 min.

Γράφημα 9

ΜΟ σε µg/g δρόγης (40 µg/g δρόγης ≤ trace < 100 µg/g).

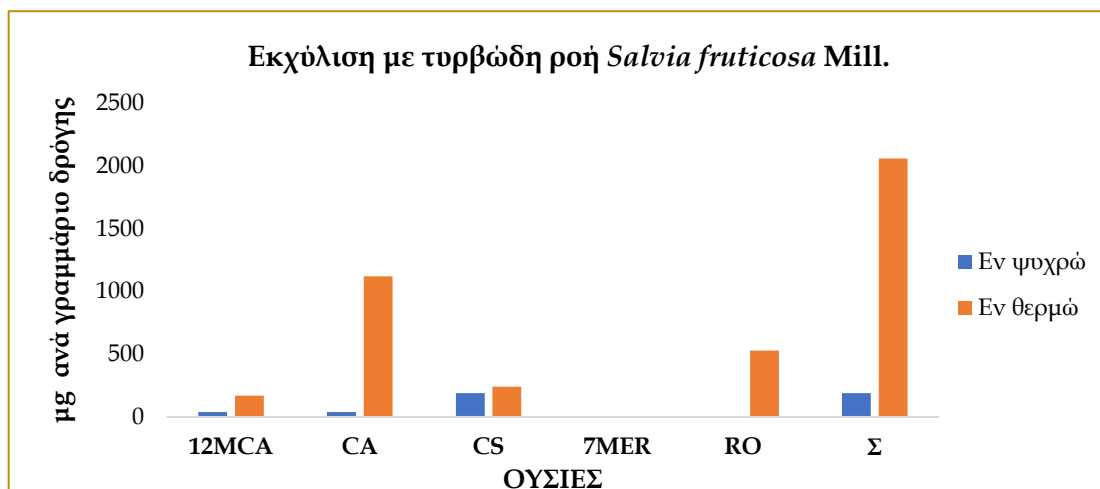


Το πείραμα εκχύλισης φύλλων *R. officinalis* L. με τυρβώδη ροή έδειξε ότι η διαδικασία εν θερμώ είναι σημαντικά πιο αποδοτική από αυτή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για παράδειγμα το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου ήταν 0,836 σε mg/g δρόγης εν θερμώ ενώ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ταυτοποιήθηκαν ίχνη. Αξιοσημείωτο είναι ότι στην περίπτωση της εκχύλισης με τυρβώδη ροή:

- σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ταυτοποιήθηκε μόνο η καρνοσόλη
- εν θερμώ η κλίμακα ήταν CA>RO>CS>12MCA
- εν θερμώ ταυτοποιήθηκε μπετουλινικό οξύ.
- δεν ταυτοποιήθηκαν 7MER και η DMA σε κανένα πείραμα.

Γράφημα 10

ΜΟ σε µg/g δρόγης (40 µg/g δρόγης ≤ trace < 100 µg/g).



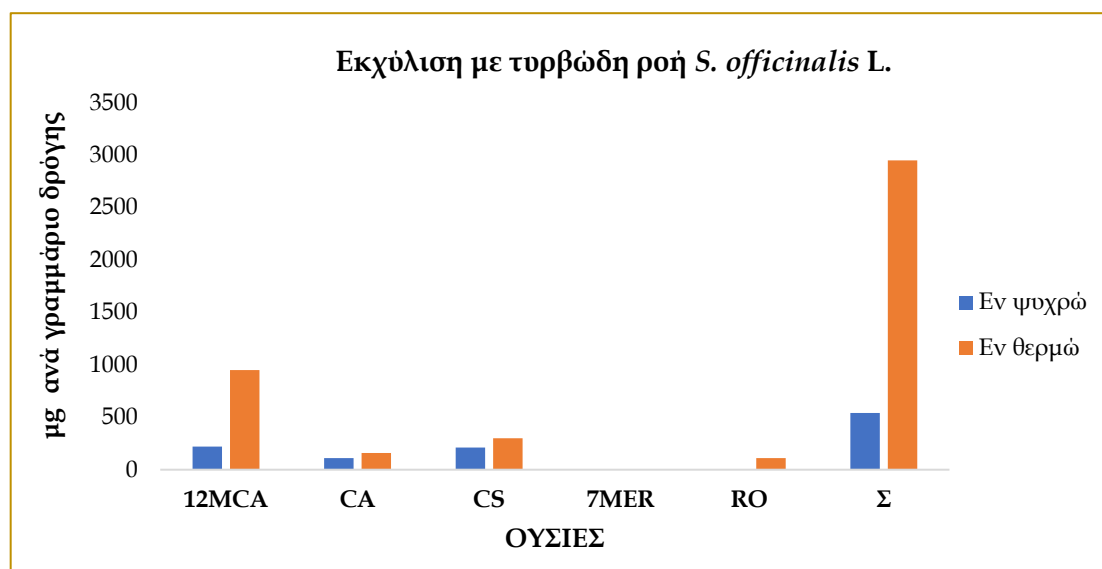
Το πείραμα εκχύλισης φύλλων *Salvia fruticosa* Mill. με τυρβώδη ροή έδειξε ότι η διαδικασία εν θερμώ είναι σημαντικά πιο αποδοτική από αυτή που έγινε σε

θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για παράδειγμα το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου ήταν 0,19 mg/g δρόγης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και 2,06 mg/g δρόγης εν θερμώ, δηλαδή 10,84 φορές μεγαλύτερη. Αξιοσημείωτο είναι ότι στην περίπτωση της εκχύλισης με τυρβώδη ροή:

- σε θερμοκρασία περιβάλλοντος η κυρίαρχη ουσία ήταν η καρνοσόλη
- εν θερμώ η ποσοτική κλίμακα ήταν CA>RO>CS>12MCA
- δεν ταυτοποιήθηκε 7MER και DMA σε κανένα πείραμα

Γράφημα 11

MO σε mg/g δρόγης (40 μg/g δρόγης ≤ trace < 100 μg/g).



Το πείραμα εκχύλισης των φύλλων *Salvia officinalis* με τυρβώδη ροή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έδειξε ότι η διαδικασία εν θερμώ είναι σημαντικά πιο αποδοτική από αυτή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για παράδειγμα το σύνολο των εξεταζόμενων μεταβολιτών καρνοσικού οξέος ήταν 0,54 mg/g δρόγης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και 2,95 mg/g δρόγης εν θερμώ, δηλαδή 5,46 φορές μεγαλύτερη στη δεύτερη περίπτωση. Αξιοσημείωτο είναι ότι στην περίπτωση της εκχύλισης με τυρβώδη ροή:

- σε θερμοκρασία περιβάλλοντος η ποσοτική κλίμακα των ουσιών κατά φθίνουσα σειρά ήταν 12MCA> CS>CA
- εν θερμώ η ποσοτική κλίμακα ήταν CA>12MCA>CS>RO
- δεν ταυτοποιήθηκε 7MER, DMA σε κανένα πείραμα

3.6 Σύγκριση μεταξύ της εκχύλισης τυρβώδους ροής-εγχυμάτων-αφεψημάτων

Η σύγκριση της απόδοσης μεταξύ των εγχυμάτων και των αφεψημάτων για το *Rosmarinus officinalis* L. δείχνει ότι:

- Όσον αφορά το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου το αφέψημα στα 15 min είναι το αποδοτικότερο όλων. Πιο συγκεκριμένα κατά φθίνουσα σειρά είχαμε:

$\Sigma(\text{αφέψημα})^{15\text{min}} > \Sigma(\text{αφέψημα})^{10\text{min}} > \Sigma(\text{έγχυμα})^{10\text{min}} > \Sigma(\text{έγχυμα})^{15\text{min}} > \Sigma(\text{αφέψημα})^{5\text{min}} > \Sigma(\text{έγχυμα})^{5\text{min}} > \Sigma(\text{αφέψημα})^{2\text{min}} > \Sigma(\text{έγχυμα})^{2\text{min}}$.

- η μέγιστη τιμή του CA ήταν στα 15 min αφεψήματος και κατόπιν στα 15min εγχύματος με πολύ μικρή διαφορά από το αφέψημα των 10 min.

Η σύγκριση της απόδοσης μεταξύ των εγχυμάτων και των αφεψημάτων για τη *Salvia fruticosa* Mill. δείχνει ότι:

- το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου έχει μέγιστο στο αφέψημα των 5 min. Πιο συγκεκριμένα κατά φθίνουσα σειρά είχαμε:

$\Sigma(\text{αφέψημα})^{5\text{min}} > \Sigma(\text{αφέψημα})^{10\text{min}} > \Sigma(\text{αφέψημα})^{15\text{min}} > \Sigma(\text{αφέψημα})^{2\text{min}} > \Sigma(\text{έγχυμα})^{15\text{min}} > \Sigma(\text{έγχυμα})^{10\text{min}} > \Sigma(\text{έγχυμα})^{5\text{min}} > \Sigma(\text{έγχυμα})^{2\text{min}}$. Φαίνεται

λοιπόν ότι τα αφεψήματα στο σύνολο τους ήταν πιο αποδοτικά από τα εγχύματα στον ίδιο χρόνο διαδικασίας.

- οι μέγιστες τιμές CA και CS ήταν στα 5 min αφεψήματος και κατόπιν στα 10 min αφεψήματος.

Η σύγκριση της απόδοσης μεταξύ των εγχυμάτων και των αφεψημάτων για τη *Salvia officinalis* L. δείχνει ότι:

- όσον αφορά το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου το αφέψημα στα 5 min είναι το αποδοτικότερο όλων. Πιο συγκεκριμένα κατά φθίνουσα σειρά είχαμε: $\Sigma(\text{αφέψημα})^{5\text{min}} > \Sigma(\text{αφέψημα})^{10\text{min}} > \Sigma(\text{αφέψημα})^{2\text{min}} > \Sigma(\text{αφέψημα})^{15\text{min}} > \Sigma(\text{έγχυμα})^{10\text{min}} > \Sigma(\text{έγχυμα})^{15\text{min}} > \Sigma(\text{έγχυμα})^{5\text{min}} > \Sigma(\text{έγχυμα})^{2\text{min}}$. Συνεπώς τα αφεψήματα στο σύνολο τους ήταν πιο αποδοτικά από τα εγχύματα στον ίδιο χρόνο διαδικασίας. Οι μέγιστες τιμές CA και CS ήταν στα 5 min αφεψήματος και κατόπιν στα 2 min αφεψήματος.

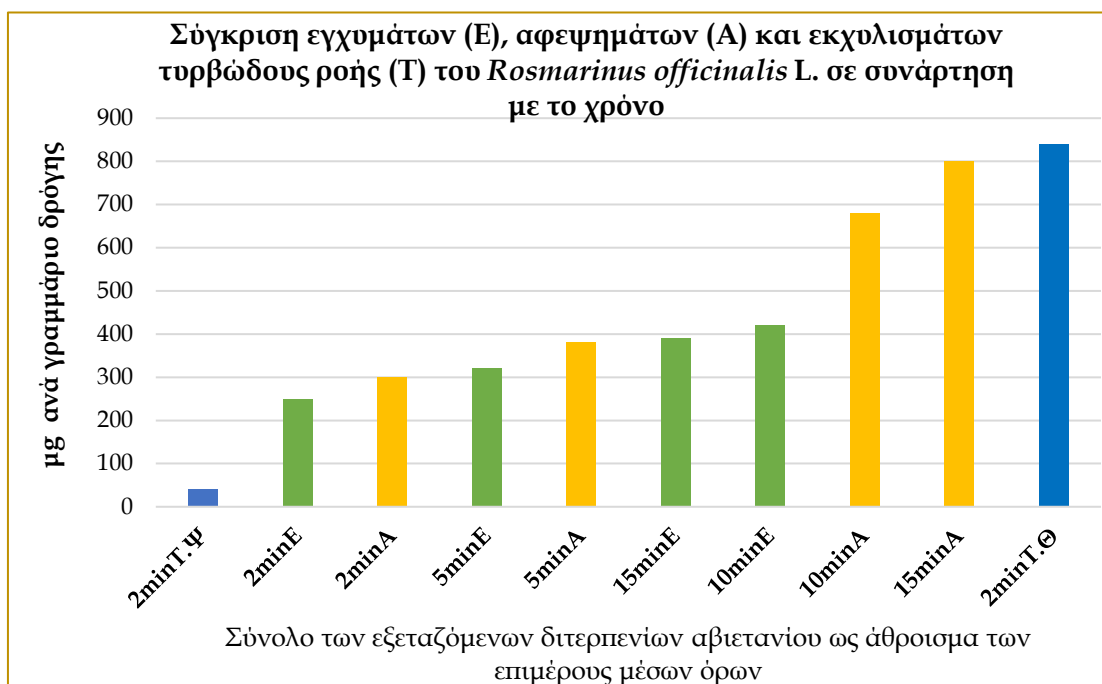
Η εκχύλιση με τυρβώδη ροή αποτελεί μια γρήγορη μέθοδος εκχύλισης που δεν χρειάζεται να τεμαχισθεί προηγούμενα η δρόγη.

Συγκρίνοντας την απόδοση μεταξύ της εκχύλισης με τυρβώδη ροή και των εγχυμάτων-αφεψημάτων για το *R. officinalis* L. παρατηρείται ότι (γράφημα 12):

- στην εκχύλιση με τυρβώδη εν θερμώ το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων, αλλά και η τιμή της κάθε εξεταζόμενης ουσίας (CA, CS, 12MCA και BA) ήταν μεγαλύτερες από αυτές που συναντώνται στο έγχυμα σε οποιαδήποτε χρόνο επαφής δρόγης-διαλύτη. Η τιμή της RO ήταν μικρότερη σε σχέση με τα εγχύματα των 2, 5, 10 min αλλά μεγαλύτερη από αυτή του εγχύματος στα 15 min.
- στην εκχύλιση με τυρβώδη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων ήταν μικρότερο από αυτό που συναντάται στα έγχυμα και στα αφεψήματα σε οποιαδήποτε χρόνο εκχύλισης.
- στην εκχύλιση με τυρβώδη ροή εν θερμώ το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων και η τιμή των CA, CS, και 12MCA ήταν μεγαλύτερες από τα αφεψήματα σε οποιαδήποτε χρόνο επαφής δρόγης-διαλύτη. Εξαιρέση αποτέλεσε η τιμή της RO η οποία ήταν μικρότερη από αυτές που συναντώνται στο αφέψημα σε οποιαδήποτε χρόνο επαφής δρόγης-διαλύτη, και του BA που ήταν χαμηλότερο από τα αφεψήματα των 10 και 15 min.

Γράφημα 12

Σύγκριση εγχυμάτων (E)-αφεψημάτων (A)-εκχυλισμάτων τυρβώδους ροής (T.Ψ: σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, T.Θ: εν θερμώ) *Rosmarinus officinalis* L. ΜΟ σε μg/g δρόγης.

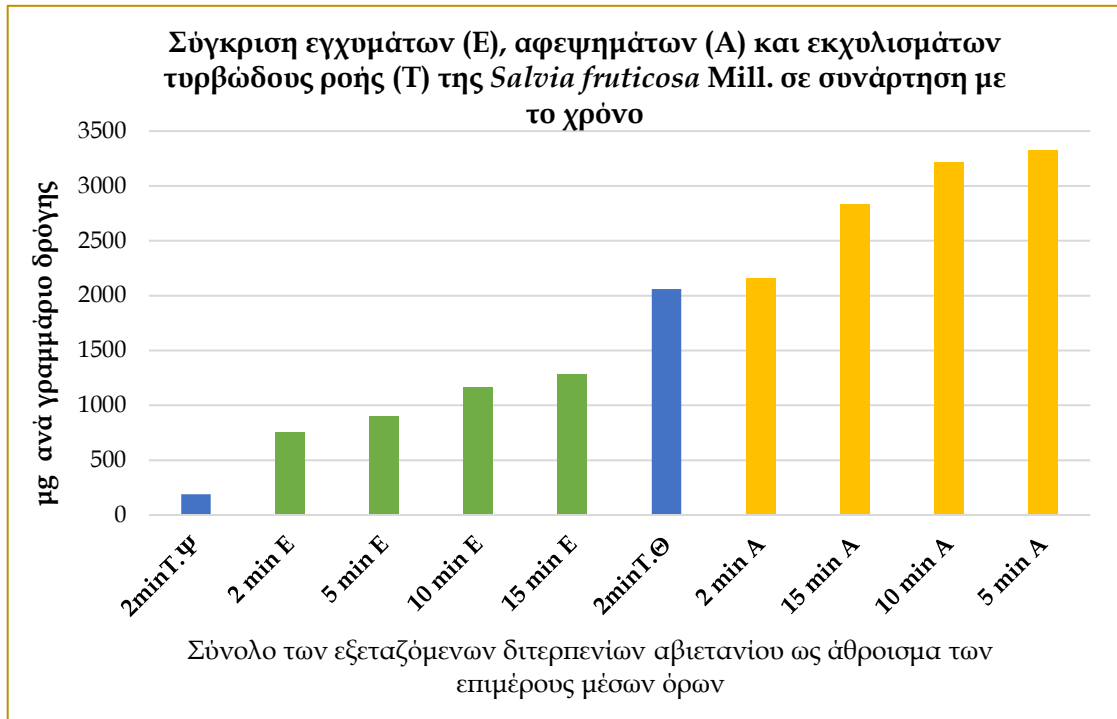


Συγκρίνοντας την απόδοση μεταξύ της εκχύλισης με τυρβώδη ροή και των εγχυμάτων-αφεψημάτων για τη *Salvia fruticosa* Mill. παρατηρείται ότι (γράφημα 13):

- στην εκχύλιση με τυρβώδη εν θερμώ το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων, αλλά και η τιμή της κάθε εξεταζόμενης ουσίας (CA, CS, RO και 12MCA) ήταν μεγαλύτερες από αυτές που συναντώνται στο έγχυμα σε οποιαδήποτε χρόνο επαφής δρόγης-διαλύτη.
- στην εκχύλιση με τυρβώδη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων ήταν μικρότερο από αυτό που συναντάται στα εγχύματα και αφεψήματα σε οποιαδήποτε χρόνο επαφής δρόγης-διαλύτη.
- στην εκχύλιση με τυρβώδη εν θερμώ το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων και η τιμή των RO και 12MCA ήταν μικρότερες από ότι στο αφέψημα σε οποιαδήποτε χρόνο επαφής δρόγης-διαλύτη. Η τιμή των CA, CS ήταν μεγαλύτερη μόνο από αυτή που συναντάται στο αφέψημα των 2 min.

Γράφημα 13

Σύγκριση εγχυμάτων (E)-αφεψημάτων (A)-εκχυλισμάτων τυρβώδους ροής (T.Ψ: σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, T.Θ: εν θερμώ) *Salvia fruticosa* Mill. MO σε $\mu\text{g/g}$ δρόγης.



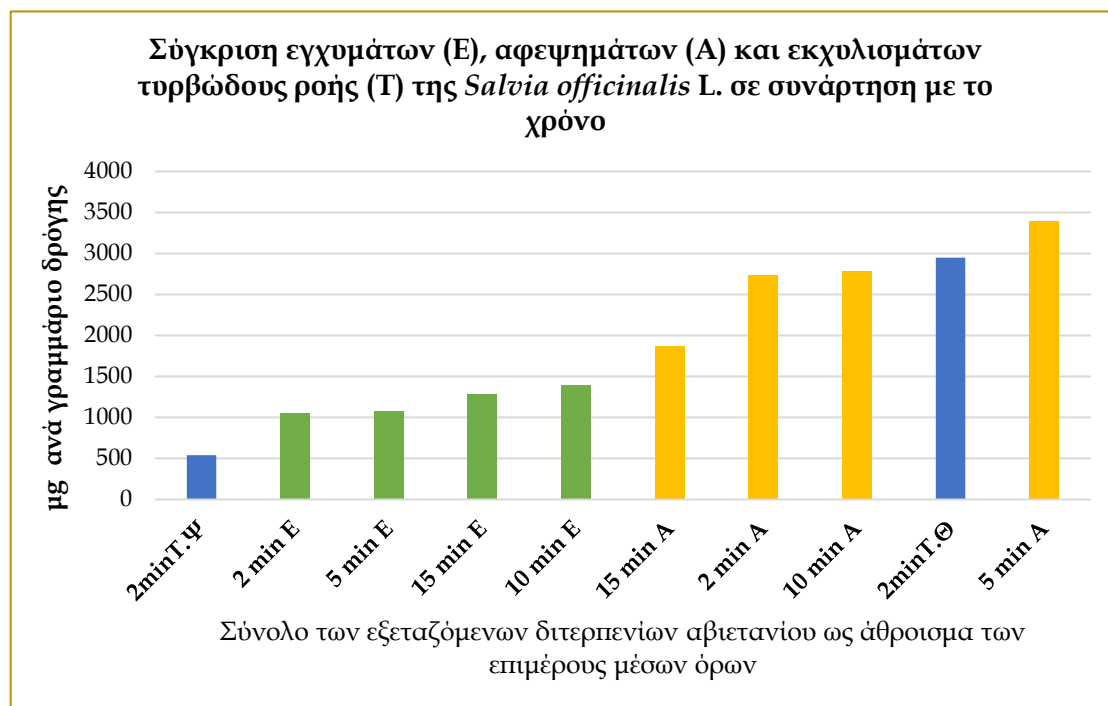
Συγκρίνοντας την απόδοση μεταξύ της εκχύλισης με τυρβώδη ροή και των εγχυμάτων-αφεψημάτων για τη *Salvia officinalis* L. παρατηρείται ότι (γράφημα 14):

- στην εκχύλιση με τυρβώδη εν θερμώ το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αλλά και η τιμή της κάθε εξεταζόμενης ουσίας (CA, CS, 12MCA) ήταν μεγαλύτερες από αυτές που συναντώνται στο έγχυμα σε οποιαδήποτε χρόνο επαφής δρόγης-διαλύτη. Εξαιρέση αποτέλεσε η RO, η τιμή της οποίας ήταν μικρότερη από αυτές που συναντώνται σε όλα τα εγχύματα.
- στην εκχύλιση με τυρβώδη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αλλά και η τιμή της κάθε εξεταζόμενης ουσίας (CA, 12MCA και RO) ήταν μικρότερες από αυτές που συναντώνται στο έγχυμα σε οποιαδήποτε χρόνο επαφής δρόγης-διαλύτη. Εξαιρέση αποτέλεσε η CS, η τιμή της οποίας ήταν μεγαλύτερη από αυτές που συναντώνται σε όλα τα εγχύματα.
- στην εκχύλιση με τυρβώδη ροή εν θερμώ το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων ήταν μεγαλύτερο από αυτό των αφεψημάτων στα 2, 10, 15 min και μικρότερο μόνο από το αφέψημα των 5 min. Ωστόσο, η τιμή των CA, CS και 12MCA ήταν μεγαλύτερη από ότι στο αφέψημα σε οποιαδήποτε χρόνο επαφής δρόγης-διαλύτη. Εξαιρέση αποτέλεσε η τιμή της RO η οποία ήταν μικρότερη από αυτές που συναντώνται σε όλα τα αφεψημάτα. Επίσης, η τιμή του 12MCA στο αφέψημα των 5 min ήταν μεγαλύτερη ενώ στο αφέψημα των 10 min ίση με αυτή που συναντάται στην εκχύλιση με τυρβώδη ροή εν θερμώ.
- στην εκχύλιση με τυρβώδη ροή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αλλά και η τιμή των CA, 12MCA και RO ήταν

μικρότερες από αυτές που συναντώνται στο αφέψημα σε οποιαδήποτε χρόνο επαφής δρόγης-διαλύτη. Εξαιρέση αποτέλεσε η τιμή της CS η οποία ήταν μεγαλύτερη από αυτές που συναντώνται σε όλα τα αφέψημα.

Γράφημα 14

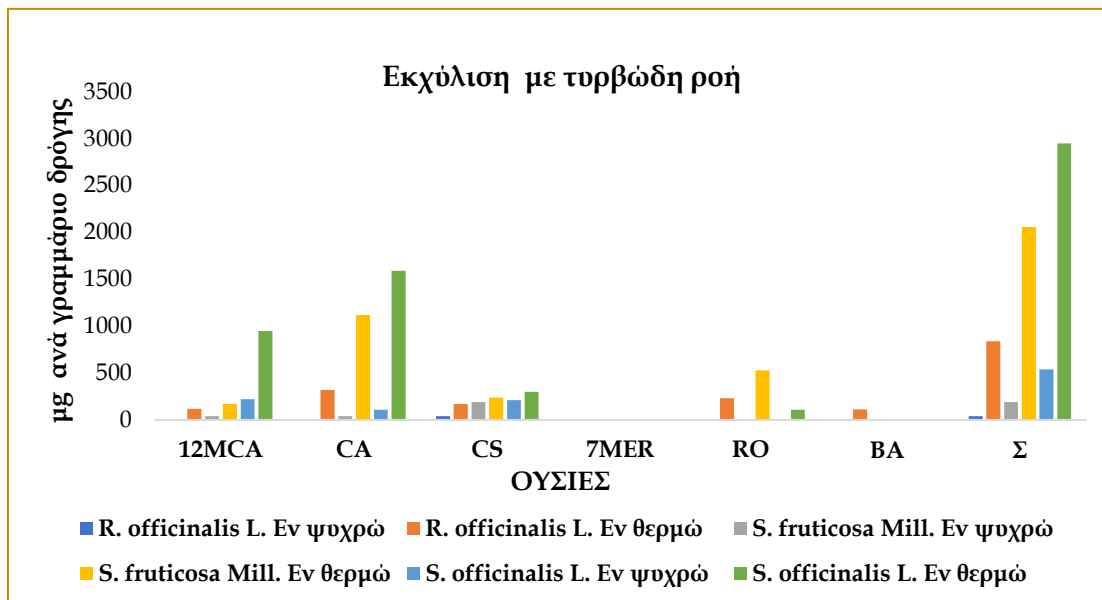
Σύγκριση εγχυμάτων (E)-αφεψημάτων (A)-εκχυλισμάτων τυρβώδους ροής (T.Ψ: σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, T.Θ: εν θερμώ) *Salvia officinalis* L. ΜΟ σε μg/g δρόγης.



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των εκχυλίσεων με τυρβώδη ροή, των εγχυμάτων και των αφεψημάτων των φυτών *R. officinalis* και *S. officinalis*, φαίνεται ότι τα αντίστοιχα παρασκευάσματα της *S. officinalis* είναι πιο πλούσια από αυτά του *R. officinalis* τόσο στο σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου όσο και στις επιμέρους ουσίες CA, CS και 12MCA, σε όλες τις συνθήκες των πειραμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (γράφημα 15). Η σύγκριση έγινε μόνο μεταξύ των δύο προαναφερόμενων φυτών, δεδομένου ότι συλλέχθηκαν από τον ίδιο χώρο (Βοτανικός κήπος ΕΚΠΑ), την ίδια μέρα και ώρα. Μάλιστα τα δύο αυτά φυτά είναι τοποθετημένα σε παρτέρια που γειτνιάζουν. Υπενθυμίζεται ότι η *S. fruticosa* που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αυτού του κεφαλαίου συλλέχθηκε στην Άνω Μέλπεια Μεσσηνίας. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σε πλήρη συμφωνία με τα όσα αναφέρθηκαν για τα μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *R. officinalis* και *S. officinalis* στο κεφάλαιο 3 του εργαστηριακού μέρους της παρούσας διατριβής.

Γράφημα 15

Σύγκριση μεταξύ των εκχυλισμάτων με τυρβώδη ροή των *R. officinalis* L., *Salvia officinalis* L., και *Salvia fruticosa* Mill. Τα αποτελέσματα είναι ΜΟ σε μg ανά γραμμάριο δρόγης (Σ: Σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιτανίου ως άθροισμα των ΜΟ).



4. Φαρμακευτικά βάμματα

Ο όρος φαρμακευτικό βάμμα χρησιμοποιείται για την αποφυγή παρεξηγήσεων με τον όρο μητρικό βάμμα. Η διαφορά τους είναι ότι στην πρώτη περίπτωση γίνεται χρήση αποξηραμένης δρόγης ενώ στη δεύτερη χλωρής δρόγης.

Τα βάμματα είναι προϊόντα φυτοθεραπείας με ευρεία διάδοση στον γενικό πληθυσμό και συνεπώς με μεγάλο πρακτικό ενδιαφέρον. Πρόκειται για υδατοαλκοολικά εκχυλίσματα, με ευρύ φάσμα αλκοολικού βαθμού. Είναι εύκολα στην παρασκευή τους, εύχρηστα και μεγάλης διάρκειας λόγω της ανθεκτικότητας τους στην μικροβιακή αλλοίωση, απότοκη της περιεκτικότητας τους σε αιθυλική αλκόολη.

Υπάρχουν δύο βασικοί τρόποι παρασκευής των βαμμάτων:

- Με εκχύλιση των φυτικών δρογών στο διαλύτη (νερό-αιθυλική αλκοόλη σε διάφορες αναλογίες). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την εμβροχή της δρόγης στο διαλύτη εν ηρεμία ή με την βοήθεια υπερήχων:
 - α) η εμβροχή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αποτελεί και την πιο συχνή μέθοδο. Ο χρόνος επαφής της δρόγης με το διαλύτη κυμαίνεται κατά κανόνα (δηλαδή αυτό που συναντάτε πιο συχνά στη βιβλιογραφία) από 7 έως 21 ημέρες. Το σύστημα ανακινείται 1 με 3 φορές την ημέρα
 - β) Όταν γίνεται χρήση υπερήχων ο χρόνος κυμαίνεται από λεπτά έως λίγες ώρες.
- Με διάλυση ενός ή περισσότερων ξηρών εκχυλισμάτων μιας ή περισσότερων δρογών στο διαλύτη

(Bettiol et al. 2009, Bettiol 2010, Firenzuoli 2009, Capasso et al. 2006).

Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή έγιναν πειράματα με αποξηραμένα φύλλα του *R. officinalis* που συλλέχθηκαν από τον βοτανικό κήπο του ΕΚΠΑ. Παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν μόνο φαρμακευτικά βάμματα. Ο στόχος των πειραμάτων ήταν η ανάλυση των βαμμάτων και κατ' επέκταση η ανεύρεση της καλύτερης μεθόδου έχοντας ως κριτήριο την ποσότητα των εξεταζόμενων ουσιών.

Έγιναν 3 διαφορετικά πειράματα:

- με αναλογία D: S= 1: 10 w/v και διαλύτη αιθυλική αλκοόλη 70°
- με αναλογία D: S= 1: 10 w/v και διαλύτη αιθυλική αλκοόλη 45°
- με αναλογία D: S= 1: 20 w/v και διαλύτη αιθυλική αλκοόλη 20°

Μια πολύ σημαντική παράμετρος είναι ο χρόνος διατήρησης της φαρμακολογικής αξίας των βαμμάτων, εννοώντας τη διάρκεια για την οποία ένα βάμμα είναι δραστικό. Με άλλα λόγια η χρονική περίοδος που οι δραστικές ουσίες ή οι ενεργοί μεταβολίτες τους παραμένουν σταθεροί στο βάμμα. Για το λόγω αυτό σχεδιάστηκε ένα πείραμα όπου μετρήθηκε το ποσοστό αποδόμησης των εξεταζόμενων ουσιών σε συνάρτηση με το χρόνο και πιο συγκεκριμένα από το χρόνο παρασκευής του φαρμακευτικού βάμματος μέχρι 14 μέρες μετά.

4.1 Διαδικασία παρασκευής και ανάλυσης των φαρμακευτικών βαμμάτων

10,0 g τεμαχισμένης δρόγης (αποξηραμένα φύλλα *R. officinalis*) τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη στην οποία προστέθηκαν 100 mL (ή 200mL) υδατοαλκοολικού διαλύματος. Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο υπερήχων για 1 ώρα. Με το πέρας της εκχύλισης το φυτικό υλικό διηθήθηκε σε ηθμό χάρτου. Κατόπιν, 10 mL διηθήματος μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη που περιείχε 0,50 mL διαλύματος συριγγαλδεύδης και συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού υπό κενό (Rotavapor V-200 και heating bath B-490 της εταιρίας Büchi). Το ξηρό υπόλειμμα υποβλήθηκε σε φασματοσκοπία 1D ¹H-NMR (CDCl₃)

Έγιναν:

- 2 διαφορετικά πειράματα με σταθερή αναλογία δρόγης: διαλύτη 1: 10 w/v και με 2 διαφορετικούς αλκοολικούς βαθμούς, 45° και 70°, του διαλύτη με σκοπό την σύγκριση ανάμεσα στους δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενους αλκοολικούς βαθμούς για την παρασκευή βαμμάτων
- ένα πείραμα με αναλογία δρόγης: διαλύτη 1: 20 w/v στους 20°. Δηλαδή με αλκοολικό βαθμό που προσεγγίζει αυτό των λικέρ και του κρασιού και αναλογία D: S όπως συνήθως αναφέρεται στην βιβλιογραφία έχοντας ως διαλύτη τα προαναφερόμενα ποτά. Σε αυτή την περίπτωση μετά την εκχύλιση της δρόγης και την διήθηση του συστήματος, 20 mL του διηθήματος τοποθετήθηκαν σε διαχωριστική χοάνη μαζί με ίσο όγκο CH₂Cl₂. Μετά από ανακίνηση, αφέθηκε σε ηρεμία για 20 λεπτά και ακολούθησε η συλλογή της οργανικής φάσης σε σφαιρική φιάλη που περιείχε 0,50 mL διαλύματος συριγγαλδεύδης. Το συλλεχθέν υγρό συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού και ακολούθησε φασματοσκοπία 1D ¹H-NMR (CDCl₃).

Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε εις τριπλούν για την εξαγωγή αποτελεσμάτων με τη μορφή μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (πίνακας 64).

4.2 Αποτελέσματα πειραμάτων φαρμακευτικών βαμμάτων

Πίνακας 64

Φαρμακευτικά βάμματα *R. officinalis* L. που παρασκευάστηκαν με μέθοδο της εμβροχής σε λουτρό υπερήχων για 1 h. Τα αποτελέσματα είναι σε mg±SD ουσιών σε 100 mL φαρμακευτικού βάμματος.

Φαρμακευτικά βάμματα <i>R. officinalis</i> L. (mg±SD/100 mL φαρμακευτικού βάμματος)			
ΟΥΣΙΕΣ	A. 1:10, (10: 100 w/v), 70°	B. 1:10, (10: 100 w/v), 45°	Γ. 1:20, (5: 100 w/v), 20°
12MCA	2,61±0,20	tr	tr
CA	11,16±1,03	tr	tr
CS	3,24±0,27	2,13±0,14	tr
7MER	nd	nd	nd
RO	tr	tr	2,36±0,11
BA	17,22±1,31	1,69±0,23	nd
DMA	nd	nd	nd
Σ ¹	17,01	2,13	2,36

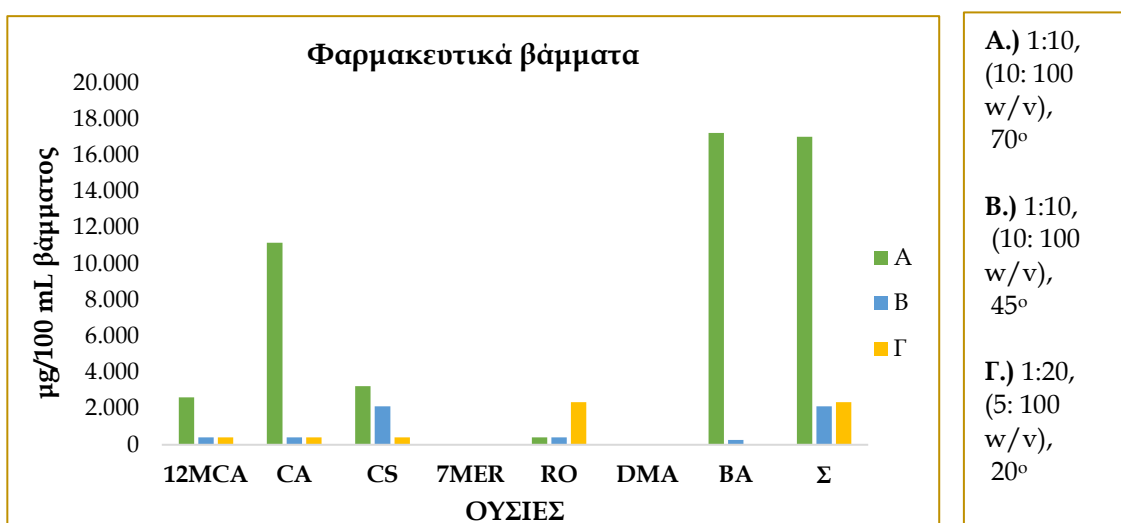
¹Σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιτανίου ως άθροισμα των επιμέρους ΜΟ

tr: trace

nd: not detected

Γράφημα 16

ΜΟ σε µg/100 mL βάμματος (400 µg/100 mL ≤ trace < 1000 µg/100 mL)



Στην περίπτωση που θέλουμε να φτιάξουμε ένα φαρμακευτικό βάμμα, ισχύει ότι:

- Η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται ευθέως ανάλογα με την αύξηση του αλκοολικού βαθμού από τους 45° στους 70° που εξετάστηκαν.

Στην περίπτωση παρασκευής ξηρού εκχυλίσματος από αποξηραμένα φύλλα *R. officinalis* L. χρησιμοποιώντας αιθανολικό διάλυμα, ο βέλτιστος αλκοολικός βαθμός είναι 70°.

Λόγω της γνωστής ευαισθησίας των CA και CS σε πολικούς διαλύτες, όπως οι μεθανόλη και αιθανόλη, έγινε πείραμα για την εκτίμηση του ποσοστού αποδόμησης των εξεταζόμενων ουσιών σε υδατοαλκοολικό διάλυμα (φαρμακευτικό βάμμα) σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης και πιο συγκεκριμένα από το χρόνο παρασκευής του φαρμακευτικού βάμματος μέχρι 14 μέρες μετά (t1=1 ημέρα, t2=7 ημέρες, t3=14 ημέρες). Παρασκευάστηκαν τρία φαρμακευτικά βάμματα 70° με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 4.1. Για τον κάθε χρόνο έγιναν 3 μετρήσεις (δείγματα των 10 mL από το κάθε φαρμακευτικό βάμμα). Τα αποτελέσματα αναγράφονται στον πίνακα 65 και στο γράφημα 17.

Φαίνεται ότι σε περίπτωση που η εκχύλιση για ένα ξηρό εκχύλισμα γίνεται μέσω εμβροχής, από τα χρονικά διαστήματα που εξετάστηκαν ο βέλτιστος χρόνος εκχύλισης είναι οι 24 ώρες.

Πίνακας 65

Οι ποσότητες των 12MCA, CA, CS, 7MER, RO, BA και DMA σε αιθανολικό διάλυμα 70° *R. officinalis* σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης του φαρμακευτικού βάμματος (1, 7 και 14 ημέρες). ΜΟ σε mg/100 mL αιθανολικού διαλύματος 70° *R. officinalis* L.

ΟΥΣΙΕΣ	1 day	7 days	14 days
12MCA	2,61±0,20	1,46±0,09	tr
CA	11,16±1,03	3,09±0,11	tr
CS	3,24±0,27	6,75±0,54	1,29±0,08
7MER	nd	nd	nd
RO	tr	tr	tr
BA	17,22±1,31	15,77±1,09	14,97±0,97
DMA	nd	nd	nd
Σ ¹	17,01	11,3	1,29

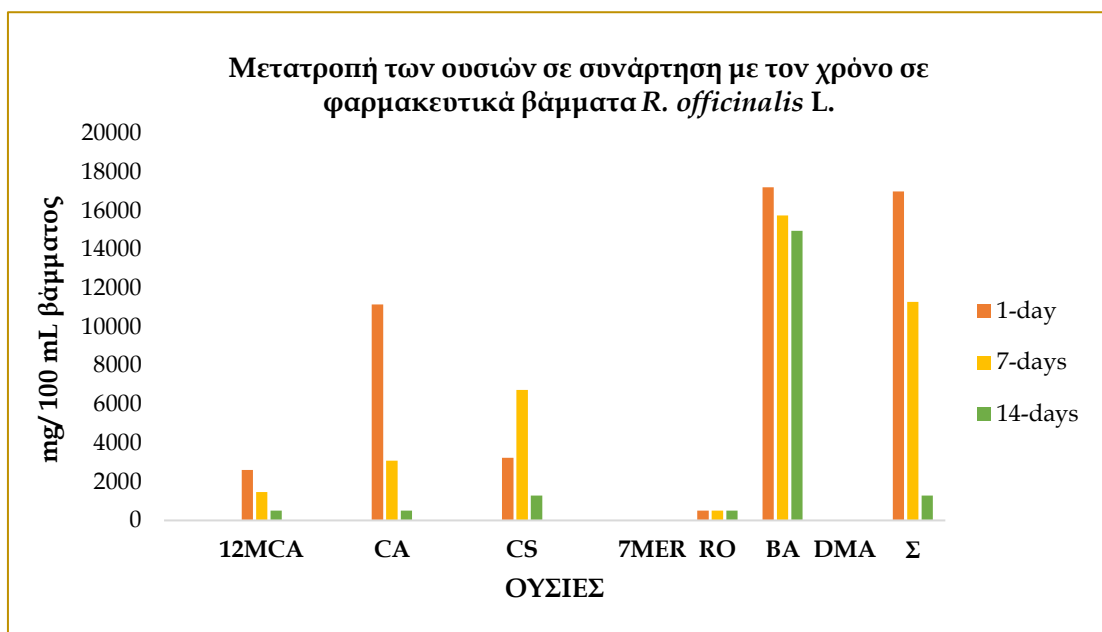
¹Σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου ως άθροισμα των επιμέρους ΜΟ

tr: trace

nd: not detected

Γράφημα 17

Τα αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος σε $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ αιθανολικού διαλύματος 70° R . *officinalis* L. ($400\ \mu\text{g}/100\text{ mL} \leq \text{trace} < 1000\ \mu\text{g}/100\text{ mL}$)



Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- μετά από μια ημέρα αποθήκευσης οι ποσότητες διτερπενίων αβιετανίου κατά φθίνουσα σειρά ήταν $CA > 12MCA > CS > RO$
- μετά από 7 ημέρες αποθήκευσης οι ποσότητες διτερπενίων αβιετανίου κατά φθίνουσα σειρά ήταν $CS > CA > 12MCA > RO$
- μετά από 14 ημέρες αποθήκευσης έγινε ποσοτικοποίηση μόνο της CS και του BA ενώ τα διτερπένια αβιετανίου 12MCA, CA, RO ήταν σε ίχνη.
- δεν ταυτοποιήθηκε οι 7MER και DMA σε κανένα πείραμα
- η μείωση των ουσιών CA, 12MCA και BA ήταν ευθέως ανάλογη με την αύξηση του χρόνου αποθήκευσης του φαρμακευτικού βάμματος.

Διαπιστώνουμε ότι την μεγαλύτερη μείωση την υφίσταται το CA ενώ το BA την μικρότερη. Το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου στις 14 ημέρες μειώθηκε κατά 92,42%.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι σε μόλις 14 ημέρες οι βασικές ομάδες των δραστικών συστατικών του *R. officinalis* εμφάνισαν ποσοτικά σημαντική μείωση και συνεπακόλουθα ελάττωση της βιοδραστικότητάς τους. Συμπεραίνουμε ότι το φαρμακευτικό βάμμα ως υδατοαλκοολικό διάλυμα δεν είναι η πιο κατάλληλη φαρμακευτική μορφή για το *R. officinalis*, εξαιτίας της αποδόμησης που υφίστανται κατά κύριο λόγο οι ουσίες CA, CS και 12MCA σε συνάρτηση με το χρόνο επαφής με τον διαλύτη.

5. Οινόλυτα

Τα οινόλυτα είναι παρασκευάσματα που προκύπτουν από την διάλυση φυσικών ουσιών στον οίνο, όπως ακριβώς ορίζεται και από την ετυμολογία της σύνθετης αυτής

λέξης (οινόλυτα= οίνος+ λύση, δηλαδή ότι λύεται-διαλύεται στον οίνο). Τα οινόλυτα είναι ευρέως γνωστά ως ιατρικοί ή φαρμακευτικοί οίνοι και διαδεδομένα ως θεραπευτικοί παράγοντες από την αρχαιότητα.

Στα οινόλυτα χρησιμοποιούμε κυρίως αποξηραμένες δρόγες, πολύ σπάνια δε χλωρές δρόγες διότι μπορούν να αλλοιώσουν τον αλκοολικό βαθμό του οίνου.

Οι συνήθεις αναλογίες είναι δρόγη: οίνος= 1: 20. Όσον αφορά τις μονάδες μέτρησης η δρόγη μετράται σε βάρος ενώ ο οίνος σε όγκο.

Τα οινόλυτα μπορούν να είναι:

- απλά, όπου μόνο μια δρόγη επεξεργάζεται με ένα συγκεκριμένο οίνο
- σύνθετα, στην περίπτωση που έχουμε περισσότερες από μια δρόγες.

Υπάρχουν δύο τρόποι παρασκευής οινόλυτων, ξεκινώντας από μια ή περισσότερες φυτικές δρόγες:

- με εκχύλιση των φυτικών δρογών στον οίνο. Η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει με εμβροχή της δρόγης στον οίνο: σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή εν θερμώ, εν ηρεμία ή με την βοήθεια υπερήχων. Η εμβροχή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αποτελεί και την πιο συχνή μέθοδος της Ελληνικής παραδοσιακής ιατρικής.
- με διάλυση ενός ή περισσότερων εκχυλισμάτων (ξηρό, ρωόδες, μητρικό ή φαρμακευτικό βάμμα κ.τ.λ.) μιας ή περισσότερων δρογών στον οίνο που χρησιμοποιούμε ως διαλύτη.

Στη συγκεκριμένη διατριβή έγιναν πειράματα με λευκό οίνο.

5.1 Διαδικασία παρασκευής οινόλυτου

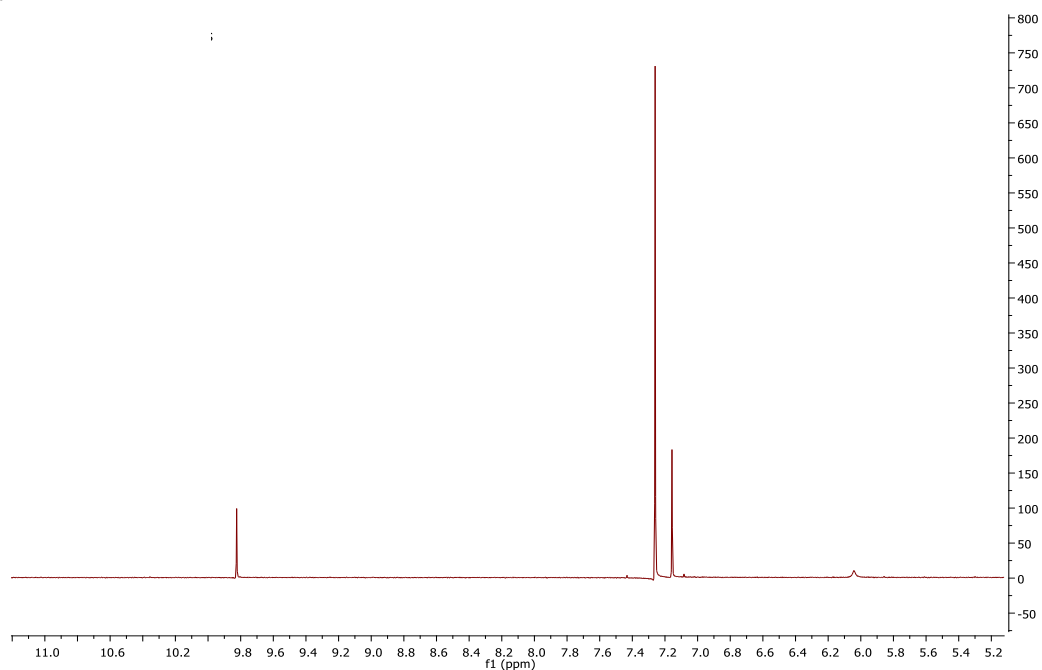
Για την παρασκευή του απλού οινόλυτου με τη μέθοδο της εμβροχής χρησιμοποιήθηκαν τα αποξηραμένα φύλλα του *Rosmarinus officinalis* L. Ωστόσο, δεν ακολουθήθηκε η μέθοδος εμβροχής της δρόγης στον κατάλληλο οίνο αλλά εφαρμόστηκε η διαδικασία παρασκευής των ιατρικών οίνων σύμφωνα με την μέθοδο του Διοσκουρίδη. Δηλαδή, η δρόγη τοποθετήθηκε στο μούστο μέχρι την τελική του ζύμωση σε οίνο, όπου και διαχωρίστηκε από αυτό με διήθηση επί χάρτου. Η αναλογία δρόγης: μούστος ήταν 10:135 w/v, σύμφωνα με τις αναλογίες του EMA. Η δρόγη ήταν τεμαχισμένη.

Για το σκοπό αυτό αγοράστηκαν 5L λευκού μούστου που περιείχε τα προβλεπόμενα θειώδη για την συντήρηση του οίνου. Για την πορεία της ζύμωσης του μούστου έγινε μέτρηση σε τακτά χρονικά διαστήματα του αλκοολικού βαθμού και του βαθμού των σακχάρων (βαθμοί Baume) με τα κατάλληλα όργανα. Οι αρχικοί βαθμοί Baume ήταν 12, Στα 2700 mL μούστου τοποθετήθηκαν 200 g τεμαχισμένων αποξηραμένων φύλλων του *R. officinalis*, ενώ τα υπόλοιπα 2300 mL χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς. Ο μούστος με ή χωρίς τη δρόγη τοποθετήθηκε σε γυάλινη φαιόχρωμη φιάλη χωρίς να κλείσουμε το καπάκι. Η φιάλη αποθηκεύτηκε σε δροσερό μέρος προστατευμένο από το φως. Υπήρξε μέριμνα έτσι ώστε η θερμοκρασία του μούστου να μην υπερβεί τους 30 °C για την αποφυγή της διακοπής της αλκοολικής ζύμωσης. Ο μούστος με ή χωρίς τη δρόγη μετατρέπεται σε κρασί όταν βυθίζοντας το μουστόμετρο σε αυτόν δείχνει ότι οι βαθμοί Baume είναι μηδέν. Αυτό σημαίνει ότι όλα τα ζάχαρα έχουν μετατραπεί σε αλκοόλη και συνεπώς σφραγίζεται η φιάλη και αφήνεται το κρασί να ωριμάσει.

5.2 Μέθοδος ανάλυσης οινόλυτου και αποτελέσματα

Ακολουθήθηκε η παρακάτω μέθοδος: 2700 mL μούστου τοποθετήθηκαν σε γυάλινο περιέκτη των 4 L που κλείνει αεροστεγώς. Στον περιέκτη προστέθηκαν 200 g τεμαχισμένων αποξηραμένων φύλλων του *R. officinalis*, ενώ τα υπόλοιπα 2300 mL χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς. Μετά την παρασκευή του οινόλυτου (τελικός αλκοολικός βαθμός 11), 10 mL τοποθετήθηκαν σε ειδική γυάλινη διαχωριστική χοάνη και προστέθηκαν 10 mL CH₂Cl₂. Η χοάνη κλείστηκε ερμητικά και το όλο ανακινήθηκε. Στη συνέχεια λήφθηκαν η πολική (αιθανόλη/νερό) και η μη πολική φάση (διχλωρομεθάνιο). Κάθε φάση συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού (40 °C) υπό κενό. Το ξηρό εκχύλισμα της πολικής φάσης διαλύθηκε σε 750 μL CD₃OD ενώ το υπόλειμμα της μη πολικής φάσης σε 750 μL CDCl₃ προς τη λήψη φασμάτων 1D ¹H-NMR. Για το κάθε δείγμα έγιναν 2 μετρήσεις.

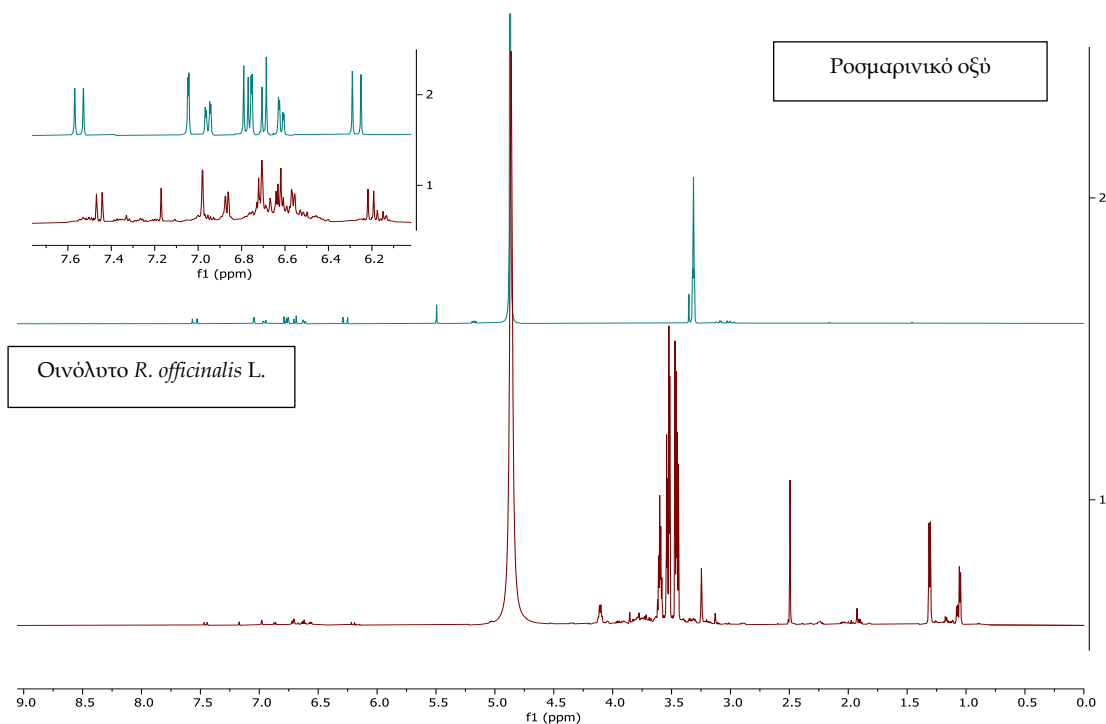
Τα αποτελέσματα της μη πολικής φάσης έδειξαν ότι το συγκεκριμένο οινόλυτο του *R. officinalis* L. δεν περιείχε διτερπένια αβιετανίου (εικόνα 78).



Εικόνα 78

Φάσμα 1D ¹H-NMR (CDCl₃) του οινόλυτου *R. officinalis* L.

Τα αποτελέσματα της πολικής φάσης έδειξαν ότι το συγκεκριμένο οινόλυτο του *R. officinalis* περιείχε ροσμαρινικό οξύ (εικόνα 80).



Εικόνα 80

Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) οινόλυτου *R. officinalis* σε σύγκριση με το αντίστοιχο φάσμα ροσμαρινικού οξέος.

Το παραγόμενο οινόλυτο είχε ευχάριστη, αρωματική οσμή και γεύση ανώτερη του οίνου αναφοράς που δεν περιείχε την δρόγη.

6. Ελαιόλυτα

Η λέξη ελαιόλυτο αναφέρεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή για πρώτη φορά στην Ελληνική βιβλιογραφία. Με τον όρο αυτό εννοούμε το προϊόν που προκύπτει όταν διαλύσουμε οποιαδήποτε ουσία σε ένα έλαιο (κατά κανόνα φυτικής προέλευσης). Το έλαιο δηλαδή παίζει το ρόλο του διαλύτη (ελαιόλυτο= έλαιο + λύση, δηλαδή ότι λύεται-διαλύεται στο έλαιο).

Τα ελαιόλυτα μπορούν να παρασκευαστούν είτε με τη χρήση νωπής είτε αποξηραμένης δρόγης. Επίσης στα ελαιόλυτα υπάγονται και αυτά που προκύπτουν από τη χρήση αιθερίων ελαίων και άλλων λιπόφιλων ουσιών που μπορούν να διαλυθούν σε κάποιο έλαιο.

Οι συνήθεις αναλογίες είναι δρόγη: έλαιο= 1:5, 1:10 και 1:20, Συνήθως, η αναλογία Δ: Ε= 1:5 χρησιμοποιείται όταν έχουμε χλωρή δρόγη, ενώ η αναλογία 1:10 και 1:20 με αποξηραμένη δρόγη. Όσον αφορά τις μονάδες μέτρησης η δρόγη μετράται πάντα σε βάρος ενώ το έλαιο σε βάρος ή όγκο. Στην παρούσα διατριβή οι μονάδες μέτρησης ήταν το βάρος τόσο για τη δρόγη όσο και για το έλαιο.

Τα ελαιόλυτα συνεπώς μπορούν να είναι:

- απλά, όπου μόνο μια δρόγη επεξεργάζεται με ένα συγκεκριμένο έλαιο
- σύνθετα, στην περίπτωση που έχουμε περισσότερες από μια δρόγες ή/και έλαια.

Το πιο σύνθηθες έλαιο που χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ιατρική στον Ελλαδικό χώρο είναι το έλαιο ελιάς (*Olea europaea* L.). Λιγότερο συχνά γίνεται χρήση του ελαίου αμυγδαλού, αλλά και άλλων ελαίων, όπως το ηλιέλαιο και το σησαμέλαιο.

Υπάρχουν δύο τρόποι παρασκευής ελαιολύτων, ξεκινώντας από μια ή περισσότερες φυτικές δρόγες:

- με εκχύλιση των φυτικών δρογών σε έλαιο. Η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει με εμβροχή της δρόγης στο έλαιο: σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή εν θερμώ, εν ηρεμία ή με την βοήθεια υπερήχων. Η εμβροχή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αποτελεί και την πιο συχνή μέθοδο της Ελληνικής παραδοσιακής ιατρικής.
- με διάλυση ενός ή περισσότερων ξηρών εκχυλισμάτων μιας ή περισσότερων δρογών στο έλαιο που χρησιμοποιούμε ως διαλύτη.

Στη συγκεκριμένη διατριβή έγιναν πειράματα με έλαιο ελιάς. Επίσης, για την παρασκευή απλού ελαιολύτου με τη μέθοδο της εμβροχής χρησιμοποιήθηκαν τα αποξηραμένα φύλλα του *R. officinalis*, ενώ για την παρασκευή ελαιολύτου με τη μέθοδο της διάλυσης του φυτικού εκχυλίσματος στο έλαιο χρησιμοποιήθηκαν τα ξηρά εκχυλίσματα των *R. officinalis* και *S. fruticosa*.

Τα φύλλα *R. officinalis* συλλέχθηκαν από τον βοτανικό κήπο ΕΚΠΑ ενώ της *S. fruticosa* από την Άνω Μέλπεια Μεσσηνίας. Το έξιτρα παρθένο ελαιόλαδο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το “ΑΛΤΙΣ απαλό” της εταιρείας Ελαΐς.

6.1 Διαδικασία παρασκευής ελαιολύτων

6.1.1 Εμβροχή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Τα αποξηραμένα φύλλα *Rosmarinus officinalis* L. τεμαχίστηκαν. Η αναλογία δρόγης: διαλύτη ήταν 1:20 w/w. Ζυγίστηκαν 5 gr τεμαχισμένης δρόγης και τοποθετήθηκαν σε γυάλινο περιέκτη που περιείχε 100 gr έξιτρα παρθένου ελαιόλαδο. Ο περιέκτης κλείστηκε αεροστεγώς και το όλο σύστημα τοποθετήθηκε σε σκιερό μέρος για 21 ημέρες έχοντας μέριμνα να ανακινείται κάθε 24 ώρες. Με το πέρας του χρόνου εκχύλισης των ημερών το στερεό μέρος διαχωρίστηκε από το υπερκείμενο με απόχυση και μετάγγιση. Ύστερα πραγματοποιήθηκε διήθηση μέσω χάρτινου ηθμού. Το διήθημα αποτέλεσε το ελαιόλυτο προς εξέταση.

6.1.2 Εμβροχή εν θερμώ (“Digestion, χώνευση”)

Έγιναν 2 διαφορετικά πειράματα σε συνάρτηση με την αναλογία δρόγης-ελαίου, δηλαδή 1:20 και 1:10, διατηρώντας σταθερές τις υπόλοιπες συνθήκες του πειράματος. Αναλυτικότερα: η ποσότητα της αποξηραμένης τεμαχισμένης δρόγης τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη που περιείχε 100 gr έξιτρα παρθένου ελαιόλαδο. Το όλο σύστημα εφαρμόστηκε σε θερμαινόμενη εστία όπου η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 65 °C για 6 ώρες. Υπήρξε ανάδευση του συστήματος κάθε 2 ώρες. Με το πέρας του χρόνου ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την προηγούμενη μέθοδο. Το στερεό μέρος διαχωρίστηκε από το υπερκείμενο με απόχυση και μετάγγιση. Ύστερα ακολούθησε διήθηση μέσω χάρτινου ηθμού. Το διήθημα αποτέλεσε το ελαιόλυτο προς εξέταση.

6.1.3 Διάλυση εκχυλισμάτων στο έλαιο

Στην περίπτωση αυτή στο έλαιο βάσης προστίθεται η ποσότητα ενός ξηρού εκχυλισματος ή ενός αιθερίου ελαίου για τη παρασκευή του ελαιολύτου.

Ο χρόνος επαφής μεταξύ του ελαίου και του ξηρού εκχυλισματος εξαρτάται από το αν η διάλυση των ουσιών στο έλαιο θα γίνει εν θερμώ (1 έως 6 ώρες) ή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (συνήθως από 24 ώρες έως μια εβδομάδα). Στην περίπτωση που γίνει χρήση υπερήχων ο απαιτούμενος χρόνος ελαττώνεται.

6.2 Μέθοδος ανάλυσης των ελαιολύτων

Δοκιμάστηκαν δύο μέθοδοι:

- 1) 5 gr ελαιολύτου τοποθετήθηκαν σε ειδικό πλαστικό περιέκτη των 50 mL και προστέθηκαν 20 mL CH_x. Ο περιέκτης κλείστηκε ερμητικά με πώμα ασφαλείας και ανακινήθηκε ενεργητικά για 1 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν στον περιέκτη 25 mL ακετονιτριλίου (ACN) με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των φάσεων (πολική με το ACN και μη πολική με CH_x και ελαιόλαδο). Το τελικό σύστημα τοποθετήθηκε στη φυγόκεντρο στα 4000 rad για 5 min. Στη συνέχεια μεταγγίστηκαν 25 mL διαλύματος ACN σε σφαιρική φιάλη, που περιείχε 1 mL διαλύματος συριγγαλδεϋδης, και κατόπιν συμπυκνώθηκε υπό κενό (40 °C), προς εξάτμιση του διαλύτη. Το υπόλειμμα που προέκυψε υποβλήθηκε σε φασματοσκοπία 1D ¹H-NMR (CDCl₃) (Karkoula et al. 2012)
- 2) δοκιμάστηκε και μια δεύτερη μέθοδος όπου στο ελαιόλυτο προστέθηκε μεθανόλη. Πιο αναλυτικά, 5 gr ελαιολύτου τοποθετήθηκαν σε ειδικό πλαστικό περιέκτη των 50 mL και προστέθηκαν 25 mL μεθανόλης. Ο περιέκτης κλείστηκε ερμητικά, ανακινήθηκε ενεργητικά και τοποθετήθηκε στη φυγόκεντρο στα 4000 rad για 5 min. Στη συνέχεια μεταγγίστηκαν 25 mL διαλύματος μεθανόλης σε σφαιρική φιάλη, που περιείχε 1 mL διαλύματος συριγγαλδεϋδης, και κατόπιν συμπυκνώθηκε υπό κενό (40 °C), προς εξάτμιση του διαλύτη. Το υπόλειμμα που προέκυψε υποβλήθηκε σε φασματοσκοπία 1D ¹H-NMR (CDCl₃).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρώτη μέθοδος ήταν πιο ακριβής από την δεύτερη. Οι δύο μέθοδοι διέφεραν μόνο στα ποσοτικά αποτελέσματα ενώ υπήρχε ταύτιση στα ποιοτικά. Η δεύτερη μέθοδος θα μπορούσε να βρει εφαρμογή σε περιπτώσεις γρήγορης σύγκρισης μεταξύ δύο ή περισσότερων ελαιολύτων.

Για το κάθε ελαιόλυτο έγιναν 3 μετρήσεις.

6.2.1 Ελαιόλυτα με τη μέθοδο της εμβροχής

Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 66.

Πίνακας 66

Ελαιόλυτα που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της εμβροχής, εν θερμώ και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ως δρόγη χρησιμοποιήθηκαν τα φύλλα *R. officinalis* L. Τα αποτελέσματα είναι σε mg ± SD ουσιών σε 100 g ελαιολύτου.

- A) Αναλογία δρόγη: ελαιόλαδο (Δ:Ε)= 1:20 w/w (5: 100 w/w), θέρμανση στους 65 °C για 6 ώρες
- B) Αναλογία δρόγη: ελαιόλαδο= 1:10 w/w (5: 100 w/w), θέρμανση στους 65 °C για 6 ώρες

Γ) Αναλογία δρόγη: ελαιόλαδο= 1:20 w/w (5: 100 w/w), θερμοκρασία περιβάλλοντος, 21 μέρες εμβροχής σε προστασία από το φως.

ΟΥΣΙΕΣ	A. 1:20, (5: 100 w/w), 65 °C για 6 ώρες	B. 1:10, (10: 100 w/w), 65 °C για 6 ώρες	Γ. 1:20, (5: 100 w/w), εμβροχή 21 ημέρες
12MCA	tr	tr	tr
CA	tr	5,37±0,60	2,55±0,23
CS	tr	tr	tr
7MER	nd	nd	nd
RO	nd	nd	nd
DMA	nd	nd	nd
BA	4,13±0,32	6,8±0,48	2,13±0,32
Σ ¹	tr	5,37	2,55

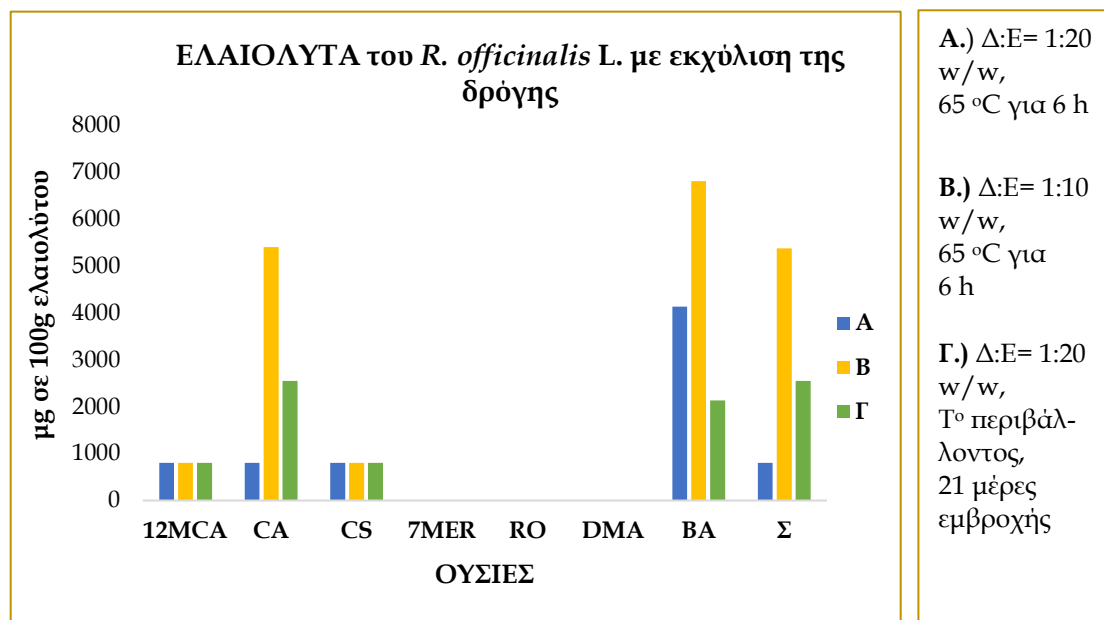
¹Σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου ως άθροισμα των επιμέρους ΜΟ

tr: trace

nd: not detected

Γράφημα 18

Τα αποτελέσματα είναι σε μg /100 g ελαιολύτου (800 μg/100g ≤ trace< 2000 μg/100g).



Από τα αποτελέσματα των ελαιολύτων φύλλων *R. officinalis* L. που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο εμβροχής, εν θερμώ και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, φαίνεται ότι:

- με την ίδια αναλογία δρόγης/διαλύτη:
 - α) όσον αφορά το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου η εμβροχή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 21 μέρες με απουσία φωτός, ήταν πιο αποδοτική από την θέρμανση στους 65 °C για 6 ώρες
 - β) η εν θερμώ διαδικασία ήταν αποδοτικότερη για την εκχύλιση του ΒΑ.
- με την ίδια μέθοδο, εμβροχή στους 65° για 6 ώρες, αλλά με διαφορετικές αναλογίες δρόγης διαλύτη 1:10 και 1:20 w/w:
 - α) όσον αφορά το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου η αναλογία 1:10 w/w (=2:20 w/w) ήταν πιο αποδοτική από την αναλογία 1:20 w/w.
 - β) το CA και το ΒΑ παρουσίασαν μεγαλύτερες ποσότητες με την αναλογία 1:10

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η αποδοτικότερη μέθοδος από αυτές που ελέγχθηκαν είναι η θέρμανση στους 65 °C για 6 ώρες και καταλληλότερη αναλογία δρόγης διαλύτη είναι η αναλογία 1:10 w/w.

Η ανάλυση των δειγμάτων έδειξε ότι δεν υπήρξε ταυτοποίηση των μεταβολιτών RO, 7MER και DMA με όποια μέθοδο και αν χρησιμοποιήθηκε.

Προκειμένου να γίνει σύγκριση μεταξύ της εκχυλιστικής ικανότητας του ελαιόλαδου, της αιθανόλης και της μεθανόλης παρασκευάστηκαν ένα ελαιόλυτο, ένα αιθανολικό και ένα μεθανολικό διάλυμα των φύλλων του *R. officinalis* με τις ίδιες συνθήκες μεθόδου.

Για αναλυτικά: 10,0 g τεμαχισμένων αποξηραμένων φύλλων του *R. officinalis* τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη των 200 mL, στην οποία προστέθηκαν 100 mL διαλύτη (αιθανόλη 96° ή μεθανόλη ή ελαιόλαδο). Η εκχύλιση διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου σε λουτρό με υπερήχους (ultrasonic bath) για 60 λεπτά. Κατόπιν το φυτικό υλικό διαχωρίστηκε από το υγρό μέρος δια διηθήσεως. Το υγρό μέρος συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη των 100 mL και έγινε επαναφορά στον αρχικό όγκο των 100 mL με την προσθήκη διαλύτη. Στη συνέχεια 10 mL διαλύματος (αιθανολικό και μεθανολικό) συμπυκνώθηκαν υπό κενό (40°C), για να ληφθεί σκόνη που υποβλήθηκε σε φασματοσκοπία 1D ¹H-NMR (CDCl₃). Όσον αφορά το ελαιόλυτο αναλύθηκε με την μέθοδο που περιγράφηκε προηγουμένως στην παράγραφο 7.2. Έγιναν 3 μετρήσεις για κάθε διαλύτη.

Πίνακας 67

Σύγκριση της εκχυλιστικής απόδοσης των διαλυτών ελαιόλαδου, αιθανόλης και μεθανόλης με πρώτη ύλη τα φύλλα *R. officinalis*. Τα αποτελέσματα είναι σε mg±SD ουσιών σε 100 mL παρασκευάσματος και αντιστοιχούν σε 3 μετρήσεις.

ΟΥΣΙΕΣ	<u>Ελαιόλυτο</u>	<u>Αιθανολικό διάλυμα</u>	<u>Μεθανολικό διάλυμα</u>
12MCA	tr	16,11±2,35	20,3±6,645
CA	tr	46,81±5,43	69,93±8,14
CS	tr	8,60±1,00	10,68±1,34
BA	tr	62,57±8,89	75,52±10,62

Τα αποτελέσματα του πίνακα 67 δείχνουν ότι η φθίνουσα σειρά της εκχυλιστικής ικανότητας των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την εμβροχή των φύλλων του *R. officinalis* L. είναι: MeOH>EtOH>έξτρα παρθένο ελαιόλαδο.

6.2.2 Διάλυση εκχυλισμάτων στο έλαιο

Για την παρασκευή του ελαιολύτου με τη μέθοδο της διάλυσης ξηρού εκχυλίσματος στο ελαιόλαδο, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χρησιμοποιήθηκαν τα ξηρά εκχυλίσματα *R. officinalis* (συλλογή στο βοτανικό κήπο ΕΚΠΑ) και *S. fruticosa* (συλλογή από Άνω Μέλπεια Μεσοσηνίας).

Παρασκευή ξηρού εκχυλίσματος: ακολουθήθηκε η ίδια μέθοδος με αυτή που χρησιμοποιήθηκε στο κεφάλαιο 1 του πειραματικού μέρους της παρούσας διατριβής, με χρόνο εμβροχής της δρόγης στο διαλύτη τις 12 ώρες, όπως δηλαδή το ξηρό εκχύλισμα [ROS-12h].

Μέθοδος παρασκευής ελαιολύτου με απευθείας διάλυση των ουσιών στο έλαιο: Για την παρασκευή του ελαιολύτου, 1,0 g ξηρού εκχυλίσματος μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη που περιείχε 100 g ελαιόλαδο. Το σύστημα μεταφέρθηκε στο υδατόλουτρο υπερήχων για 30 min. Ακολούθως έγινε διήθηση σε χάρτινο ηθμό και στη συνέχεια ακολούθησε η ανάλυση του ελαιολύτου που παρασκευάστηκε.

Έγιναν δύο μετρήσεις για κάθε παρασκευάσμα.

Αναλύθηκαν ως προς τις εξεταζόμενες ουσίες τα ελαιόλυτα που προέκυψαν με τη μέθοδο της διάλυσης ξηρού εκχυλίσματος στο ελαιόλαδο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στον πίνακα 68 υπάρχουν και οι αρχικές τιμές των μεταβολιτών που υπήρχαν στο 1 g ξηρού εκχυλίσματος του εκάστοτε φυτού, προκειμένου να υπολογιστεί το ποσοστό των ουσιών που διαλύθηκαν στο ελαιόλαδο.

Πίνακας 68

Ελαιόλυτα με τη μέθοδο της διάλυσης ξηρού εκχυλίσματος στο ελαιόλαδο. Χρησιμοποιήθηκαν τα ξηρά εκχυλίσματα των *R. officinalis* και *S. fruticosa*. Τα αποτελέσματα είναι σε:

- μέσο όρο σε mg ουσιών σε 100 g ελαιολύτου
- μέσο όρο σε mg ουσιών σε 1,0 g του εκάστοτε ξηρού εκχυλίσματος.

ΟΥΣΙΕΣ	Μεθανολικό ξηρό εκχύλισμα <i>R. officinalis</i> L.	Ελαιόλυτο <i>R. officinalis</i> L.	Μεθανολικό ξηρό εκχύλισμα <i>S. fruticosa</i> Mill.	Ελαιόλυτο <i>S. fruticosa</i> Mill.
12MCA	15,51	tr	7,13	nd
CA	59,07	7,18	55,43	6,97
CS	21,51	tr	19,82	tr
7MER	nd	nd	nd	nd
RO	nd	nd	nd	nd
BA	113,37	13,76	nd	nd
DMA	2,02	nd	nd	nd
Σ ¹	96,09	7,18	82,38	6,97

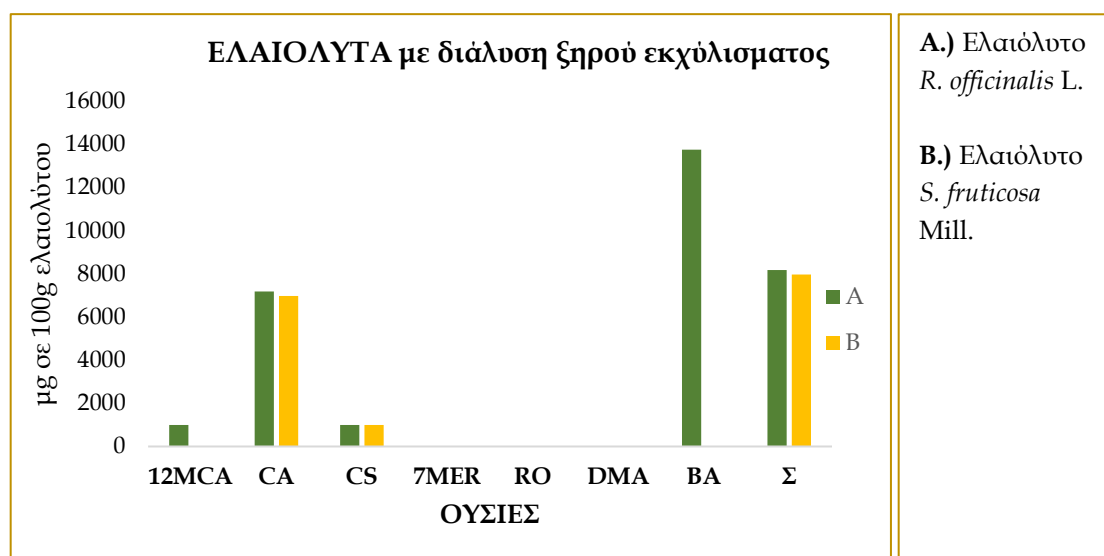
¹ Σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου ως άθροισμα των επιμέρους ΜΟ

tr: trace

nd: not detected

Γράφημα 19

ΜΟ σε μg/100 g ελαιολύτου (800 μg/100g ≤ trace < 2000 μg/100g).



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα βλέπουμε ότι:

- στο ελαιόλυτο *R. officinalis*
 - α) δεν ανιχνεύθηκε η DMA
 - β) το BA ανιχνεύθηκε ως το 12,14% της ποσότητας που υπήρχε στο μεθανολικό εκχύλισμα.
 - γ) το CA ανιχνεύθηκε ως το 12,16% της ποσότητας που υπήρχε στο μεθανολικό εκχύλισμα.
 - δ) η CS και το 12MCA ανιχνεύθηκαν στο ελαιόλυτο
 - ε) το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου στο ελαιόλυτο ήταν το 7,47% της ποσότητας που υπήρχε στο μεθανολικό εκχύλισμα.
- στο ελαιόλυτο *S. fruticosa*
 - α) το CA ανιχνεύθηκε ως το 12,57% της ποσότητας που υπήρχε στο μεθανολικό εκχύλισμα.
 - β) η CS ανιχνεύθηκε στο ελαιόλυτο
 - γ) το 12MCA δεν ανιχνεύθηκε
 - δ) το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου στο ελαιόλυτο ήταν το 8,46% της ποσότητας που υπήρχε στο μεθανολικό εκχύλισμα.

Τα ποσοστά σύγκρισης μεταξύ ελαιολύτου και μεθανολικού εκχυλίσματος που αφορούν το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου, είναι σχεδόν ίδια στα ελαιόλυτα *R. officinalis* και *S. fruticosa* με τιμές 7,47% και 8,46% αντίστοιχα.

6.3 Σταθερότητα των εξεταζόμενων ουσιών στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο

Ακολούθως σχεδιάστηκε ένα πείραμα με σκοπό να ερευνηθεί η σταθερότητα των εξεταζόμενων ουσιών στο ελαιόλαδο σε συνάρτηση με το χρόνο παραμονής σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για το λόγω αυτό, το ελαιόλυτο που παράχθηκε προηγουμένως με τη μέθοδο της εμβροχής, (21 μέρες εμβροχής σε προστασία από το φως, αναλογία δρόγη: ελαιόλαδο= 1:20 w/w, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος) αφέθηκε εν ηρεμία για 60 μέρες σε φαιόχρωμη φιάλη και σε μέρος προστατευόμενο από το φως. Με το πέρας του καθορισμένου χρόνου έλαβε χώρα η ανάλυση του ελαιολύτου με τη μέθοδο 1D-¹H-NMR (πίνακας 69).

Πίνακας 69

Μεταβολή των εξεταζόμενων ουσιών στο ελαιόλυτο σε συνάρτηση με το χρόνο. Τα αποτελέσματα είναι σε mg±SD ουσιών σε 100 g ελαιολύτου.

ΟΥΣΙΕΣ	A. Ελαιόλυτο <i>R. officinalis</i> L. Χρόνος: 0	B. Ελαιόλυτο <i>R. officinalis</i> L. Χρόνος : 2 μήνες
12MCA	tr	tr
CA	2,55±0,23	2,44±0,31
CS	tr	tr
7MER	nd	nd
RO	nd	nd
DMA	nd	nd
BA	2,13±0,11	2,08±0,07
Σ ¹	2,55	2,44

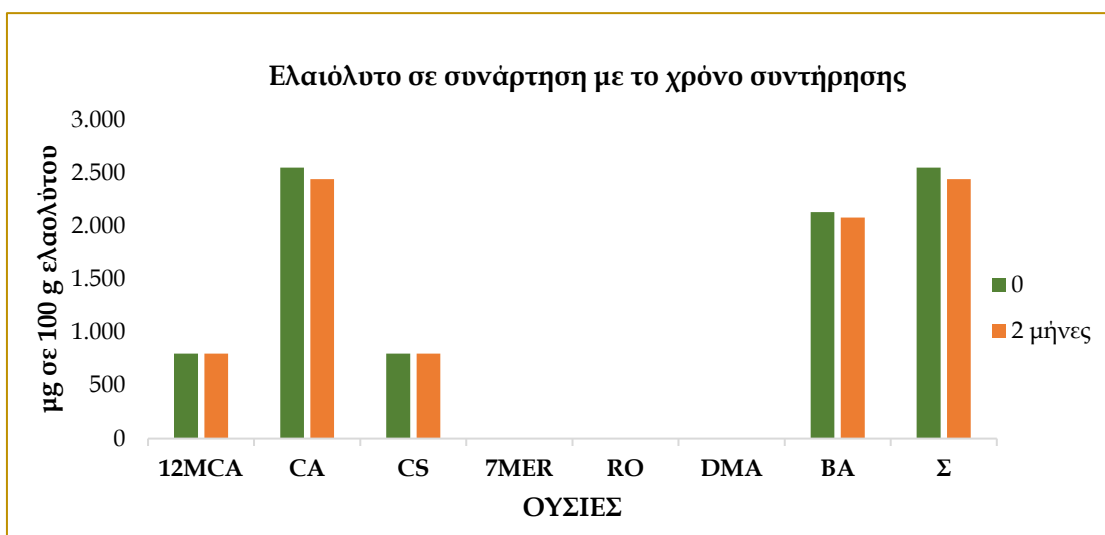
¹Σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου ως άθροισμα των επιμέρους ΜΟ

tr: trace

nd: not detected

Γράφημα 20

ΜΟ σε μg / 100 g ελαιολύτου ($800 \mu\text{g}/100\text{g} \leq \text{trace} < 2000 \mu\text{g}/100\text{g}$).



Στο πείραμα διερεύνησης της σταθερότητας των εξεταζόμενων ουσιών στο ελαιόλαδο σε συνάρτηση με το χρόνο παραμονής (2 μήνες), που έγινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε μέρος προστατευόμενο από το φως, διαπιστώθηκε ότι:

- το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου μειώθηκε κατά 4,31%

- το ΒΑ μειώθηκε κατά 2,35%

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι το ελαιόλαδο, ως μη πολικός διαλύτης, είναι ένα καλό μέσο για τη διατήρηση των διτερπενίων αβιετανίου και του ΒΑ, σε σύγκριση με τους πολικούς διαλύτες MeOH και EtOH.

7. Μελέτη της επίδρασης του χρόνου αποθήκευσης της δρόγης (φύλλα της *Salvia fruticosa*) στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των διτερπενίων αβιετανίου

Το φυτό *S. fruticosa* (άγρια) συλλέχθηκε από την Άνω Μέλπεια Μεσσηνίας σε υψόμετρο 600m. Ύστερα λήφθηκαν φάσματα ¹H-NMR, δύο μετρήσεις κάθε φορά, σε τέσσερις διαφορετικές χρονικές στιγμές (χρόνος 0 η πρώτη ανάλυση, 12, 24 και 36 μήνες μετά η δεύτερη, η τρίτη και η τέταρτη ανάλυση αντίστοιχα). Ο στόχος ήταν να ερευνηθεί η διακόμανση των ουσιών CA, CS, 12MCA και RO σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης της δρόγης. Η αποξηραμένη, ατεμάχιστη δρόγη αποθηκεύτηκε σε διάφανο γυάλινο δοχείο με αεροστεγές κλείσιμο σε χώρο χωρίς φως και υγρασία, έτσι ώστε να προσεγγιστούν οι οικιακές συνθήκες φύλαξης.

Η μέθοδος εκχύλισης ήταν η ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των φυτών της οικογένειας των Χειλανθών, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3 της παρούσας διατριβής.

Τα αποτελέσματα της ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης των φασμάτων ¹H-NMR έδειξαν ότι οι ταυτοποιημένες ουσίες CA, 12MCA και CS, παρουσίασαν μια ευθέως ανάλογη μείωση των ποσοτήτων τους σε συνάρτηση με το χρόνο. Η RO δεν ανιχνεύθηκε στο πείραμα σε χρόνο 0, έκανε την εμφάνισή της στους 12 μήνες φύλαξης και έπειτα μειώθηκε σε συνάρτηση με το χρόνο στις δυο μετρήσεις που ακολούθησαν. Η 7MER δεν ταυτοποιήθηκε σε καμία από τις τέσσερις μετρήσεις. Τα αναλυτικά αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 70 και στο γράφημα 21.

Πίνακας 70

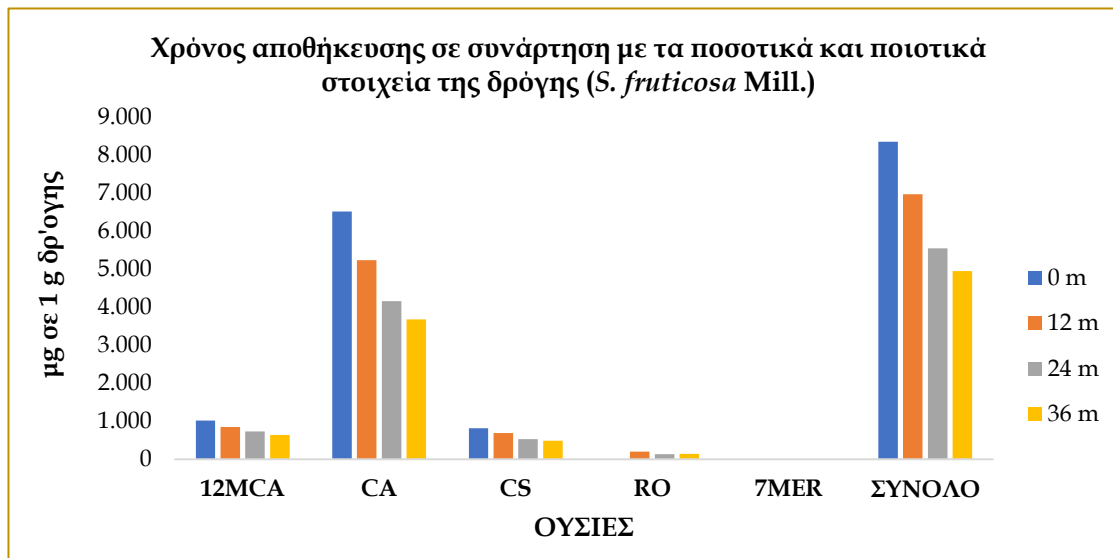
Ο μέσος όρος δύο μετρήσεων (mg/g δρόγης) των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου σε συνάρτηση με τον χρόνο φύλαξης της δρόγης του φυτού *Salvia fruticosa* Mill.

ΟΥΣΙΕΣ	Έναρξη	12 μήνες	24 μήνες	36 μήνες
12MCA	1,02	0,85	0,73	0,64
CA	6,52	5,24	4,16	3,68
CS	0,82	0,69	0,53	0,49
7MER	nd	nd	nd	nd
RO	nd	0,20	0,13	0,14
Σ ¹	8,36	6,98	5,55	4,95

¹Σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου ως άθροισμα των επιμέρους ΜΟ
nd: not detected

Γράφημα 21

ΜΟ σε µg/g δρόγης.



Όσον αφορά την μελέτη της επίδρασης του χρόνου αποθήκευσης στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου στα φύλλα *S. fruticosa* Mill., από τον πίνακα 70 φαίνεται ότι για όλες τις ουσίες η μεγαλύτερη ποσοστιαία μείωση συμβαίνει στους πρώτους 12 μήνες φύλαξης της δρόγης, εκτός της RO που αυξήθηκε, δεδομένου όπως προαναφέρθηκε σε χρόνο 0 δεν είχε ταυτοποιηθεί. Επίσης παρατηρείται ότι στους 12 μήνες η συνολική ποσότητα έχει μειωθεί κατά 16,51%, στους 24 μήνες κατά 33,61% ενώ στους 36 μήνες έχει σχεδόν υποδιπλασιαστεί (μείωση κατά 40,79%). Το καρνοσικό οξύ παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ποσοστιαία μείωση από τα υπόλοιπα διτερπένια που μελετήθηκαν κατά τους πρώτους 12 μήνες αποθήκευσης. Αυτό οφείλεται στην μεγαλύτερη ευαισθησία του καρνοσικού στην οξειδωση, και στο γεγονός ότι μέρος του καρνοσικού οξέος που χάνεται μετατρέπεται σε καρνοσόλη συγκρατώντας με αυτό τον τρόπο μείωση της τελευταίας.

Πρακτικά, όσον αφορά τα εξεταζόμενα διτερπένια αβιετανίου, μια δρόγη που είναι σε φύλαξη για περίπου 1,5 χρόνια θα μπορούσε κατά προσέγγιση να χρησιμοποιηθεί βάζοντας σχεδόν την διπλάσια ποσότητα σε σχέση με την ποσότητα της δρόγης που μόλις συλλέχθηκε και αποξηράθηκε.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση του εγχύματος των 10 min με αναλογία δρόγης/ διαλύτη 3: 150 g/mL και 4: 200 g/mL, των αποξηραμένων φύλλων *Salvia fruticosa* Mill., χρησιμοποιώντας δρόγη που είχε συλλεχθεί και αποξηραθεί πρόσφατα και δρόγη που ήταν σε αποθήκευση για 24 μήνες (πίνακας 71).

Πίνακας 71

Εγχύματα 10 min αποξηραμένων φύλλων *S. fruticosa* Mill. Η αναλογία δρόγης/διαλύτη ήταν 3: 150 w/v (ESCOP). Τα αποτελέσματα είναι σε mg±SD ανά γραμμάριο δρόγης.

ΕΓΧΥΜΑΤΑ <i>Salvia fruticosa</i> Mill. σε συνάρτηση με το χρόνο διατήρησης της δρόγης		
ΟΥΣΙΕΣ	t= 0	t= 24 μήνες
12MCA	tr	nd
CA	0,83±0,02	0,31±0,07
CS	tr	0,14±0,04
7MER	-	-
RO	tr	tr
DMA	nd	nd
BA	nd	nd
Σ ¹	0,83	0,45

¹Σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου ως άθροισμα των επιμέρους ΜΟ

tr: trace

nd: not detected

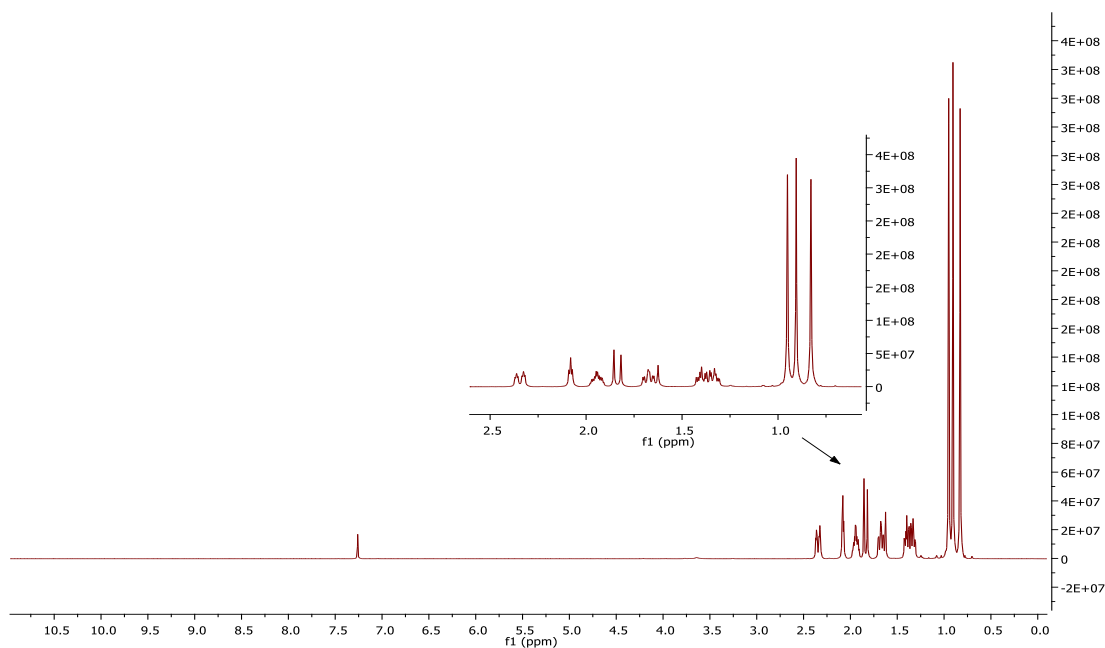
8. Πτητικές ενώσεις: κάμφορα και θουγιόνη

Οι Monakhova et al., (2011) ταυτοποίησαν και ποσοτικοποίησαν την ολική θουγιόνη σε εκχύλισμα της *Artemisia absinthium* L. με 1D ¹H-NMR φασματοσκοπία. Τα φάσματα λήφθηκαν σε D₂O με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος (pH= 7,4, 1,5 M KH₂PO₄).

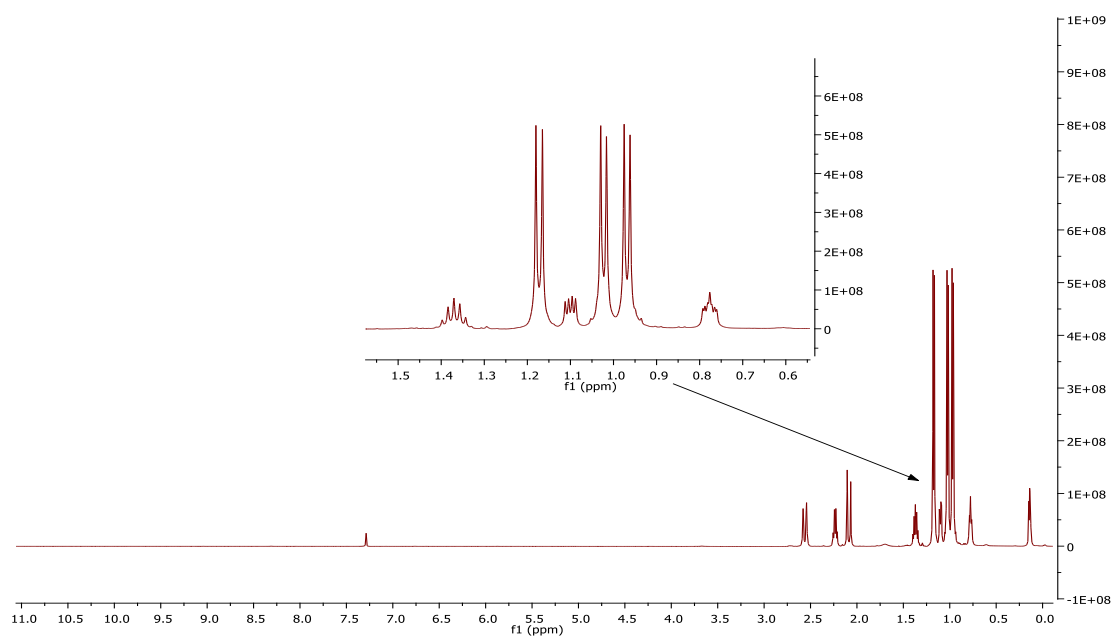
Στην παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια για την απευθείας, χωρίς περαιτέρω κατεργασία του δείγματος, ταυτοποίηση των πτητικών ουσιών κάμφορα και θουγιόνη στα φυτικά δείγματα. Για το σκοπό αυτό αγοράστηκαν οι προαναφερόμενες ουσίες (από την Sigma-Aldrich Germany) και λήφθηκαν τα 1D-¹H-NMR φάσματα τους σε CDCl₃, για την παραβολή τους με τα φάσματα των δειγμάτων προς ανάλυση.

Ωστόσο, η πυκνότητα των κορυφών των προς εξέταση φασμάτων στην αλειφατική ζώνη ήταν τέτοια που δεν επέτρεψε την ταυτοποίηση και την μετέπειτα ποσοτικοποίηση της κάμφορας και της θουγιόνης.

Σε αυτό το σημείο μπορούμε να πούμε ότι η φασματοσκοπία NMR δεν είναι η καταλληλότερη μέθοδος για την ανάλυση των δυο προαναφερόμενων ουσιών χωρίς την περαιτέρω κατεργασία του δείγματος.



Εικόνα 81
 1D-¹H-NMR (CDCl₃) φάσμα της κάμφορας.



Εικόνα 82
 1D-¹H-NMR (CDCl₃) φάσμα της α-,β-, θουγιόνης.

9. Συζήτηση-συμπεράσματα

Στο θεωρητικό μέρος της παρούσας διατριβής αναφέρθηκαν διάφοροι πίνακες στους οποίους περιγράφονται τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τη χρήση των *R. officinalis*, *S. officinalis* L. και *S. fruticososa* Mill. Ωστόσο, μελετώντας τις πληροφορίες αυτές γεννιούνται πολλά ερωτήματα:

- για ένα συγκεκριμένο φυτό είναι αποδοτικότερο να χρησιμοποιούμε το αφέψημα ή το έγχυμα;
- για πόσο χρόνο πρέπει να μείνει σε επαφή η δρόγη με τον διαλύτη;

- πια είναι η βέλτιστη αναλογία δρόγης-διαλύτη;
- σε ποια περίπτωση έχουμε κυρίαρχη ουσία τον ένα ή τον άλλο μεταβολίτη, τουλάχιστον όσον αφορά τα διτερπένια αβιετανίου, που σύμφωνα με την βιβλιογραφία των τελευταίων ετών θεωρούνται οι πιο δραστικές ουσίες των εν λόγω φυτών;
- για πόση χρονική διάρκεια διατηρούνται τα δραστικά συστατικά κατά την αποθήκευση μιας δρόγης σε οικιακές συνθήκες;
- είναι τα φαρμακευτικά βάμματα κατάλληλη φαρμακευτική μορφή;
- πως μπορούμε να αυξήσουμε τη διατήρηση των δραστικών συστατικών με τη χρήση απλών φαρμακευτικών μορφών;

Αυτά τα ερωτήματα και πολλά άλλα απαντήθηκαν μέσα από τα αποτελέσματα των πειραμάτων του συγκεκριμένου κεφαλαίου.

Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα αποτελέσματα μπορούμε να ισχυριστούμε ότι στην περίπτωση που μας ενδιαφέρουν τα διτερπένια αβιετανίου και το τριτερπένιο ΒΑ ο βέλτιστος χρόνος:

- **έγχυσης** των αποξηραμένων φύλλων του *R. officinalis* είναι 10-15 min.
- **έγχυσης** των αποξηραμένων φύλλων της *Salvia fruticosa* είναι τα 15 min. Στην περίπτωση που θα θέλαμε να αποκομίσουμε από το έγχυμα μας την μεγαλύτερη ποσότητα των CA και CS τότε το έγχυμα πρέπει να γίνει στα 15 min.
- **έγχυσης** των αποξηραμένων φύλλων της *Salvia officinalis* είναι τα 10-15 min. Στην περίπτωση που θα θέλαμε να αποκομίσουμε από το έγχυμα μας την μεγαλύτερη ποσότητα των CA και CS τότε το έγχυμα πρέπει να γίνει στα 15 min.
- **αφέψησης** των αποξηραμένων φύλλων του *R. officinalis* είναι τα 15 min. Στην περίπτωση που θα θέλαμε να αποκομίσουμε από το έγχυμα μας την μεγαλύτερη ποσότητα των CA και CS τότε το αφέψημα πρέπει να γίνει επίσης στα 15 min.
- **αφέψησης** των αποξηραμένων φύλλων της *Salvia fruticosa* είναι τα 5 min. Στην περίπτωση που θα θέλαμε να αποκομίσουμε από το έγχυμα μας την μεγαλύτερη ποσότητα των CA και CS τότε το αφέψημα πρέπει να γίνει επίσης στα 5 min.
- **αφέψησης** των αποξηραμένων φύλλων της *Salvia officinalis* είναι τα 5 min. Στην περίπτωση που θα θέλαμε να αποκομίσουμε από το έγχυμα μας την μεγαλύτερη ποσότητα των CA και CS τότε αφέψημα πρέπει να γίνει στα 5 min.
- όσον αφορά τα υδατικά εκχυλίσματα (εκχύλιση με τυρβώδη ροή-έγχυση-αφέψηση) των προαναφερόμενων φυτών που εξετάστηκαν ισχύει ότι:
 - α) στην περίπτωση των αποξηραμένων φύλλων του *R. officinalis* η αποδοτικότερη διαδικασία εκχύλισης είναι: **τυρβώδη ροή εν θερμώ > αφέψηση > έγχυμα**
 - β) στην περίπτωση των αποξηραμένων φύλλων της *Salvia fruticosa* η αποδοτικότερη διαδικασία εκχύλισης είναι: **αφέψηση > τυρβώδη ροή εν θερμώ > έγχυμα**
 - γ) στην περίπτωση των αποξηραμένων φύλλων της *Salvia officinalis* η αποδοτικότερη διαδικασία εκχύλισης είναι: **αφέψηση > τυρβώδη ροή εν θερμώ > έγχυμα**

Η εκχύλιση με **τυρβώδη ροή**, που ερευνήθηκε για πρώτη φορά στην εν λόγω διατριβή, ήταν πιο αποδοτική εν θερμώ σε σύγκριση με τη διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και για τα 3 φυτά που εξετάστηκαν. Επίσης, η απόδοση της εκχύλισης με τυρβώδη ροή εν θερμώ ήταν μεγαλύτερη από τα εγχύματα όλων των εξεταζόμενων φυτών και σε όλους τους χρόνους έγχυσης. Η σημασία της τυρβώδους ροής φαίνεται και από το γεγονός ότι τόσο στο πείραμα της έγχυσης όσο και της τυρβώδους ροής εν θερμώ συντελέστηκαν στην ίδια θερμοκρασία.

Το **φαρμακευτικό βάμμα** ως υδατοαλκοολικό διάλυμα δεν είναι κατάλληλη φαρμακευτική μορφή για το *R. officinalis* λόγω της γρήγορης αποδόμησης των ουσιών CA, CS, 12MCA και BA σε συνάρτηση με το χρόνο.

Στην περίπτωση που θέλουμε να φτιάξουμε **ξηρό εκχύλισμα** από φύλλα του *R. officinalis* L. χρησιμοποιώντας αιθανολικό διάλυμα, θα πρέπει να έχουμε υπόψη ότι η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται περνώντας από τους 45 αλκοολικούς βαθμούς στους 70°. Συνεπώς για την παρασκευή ξηρού εκχυλίσματος από τα αποξηραμένα φύλλα του *R. officinalis* L. χρησιμοποιώντας αιθανολικό διάλυμα, θα πρέπει ο διαλύτης να είναι 70°. Επίσης, σε περίπτωση που η εκχύλιση γίνεται μέσω εμβροχής, ο χρόνος επαφής της δρόγης με το διαλύτη δεν πρέπει να ξεπερνά τις 24 ώρες.

Όσον αφορά το **οινόλυτο** του *R. officinalis* εφαρμόστηκε μια μέθοδος η οποία δεν έχει ερευνηθεί στη σύγχρονη βιβλιογραφία. Ο Διοσκουρίδης στο έργο του Περί ύλης ιατρικής περιγράφει αναλυτικά τον τρόπο παρασκευής των ιατρικών οίνων. Σε αντίθεση με ότι συναντούμε στη σύγχρονη βιβλιογραφία όπου η δρόγη εμβαπτίζεται σε έτοιμο οίνο προς εκχύλιση, στο βιβλίο του Διοσκουρίδη η φυτική δρόγη τοποθετείται στον μούστο και συνυπάρχει με αυτόν για όλη τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης που θα τον μετατρέψει σε οίνο. Είναι η μέθοδος που ακολουθούσε ο Διοσκουρίδης για τους ιατρικούς του οίνους και η ίδια ακολουθήθηκε στην συγκεκριμένη διατριβή. Ωστόσο, ο Διοσκουρίδης στα φαρμακοτεχνικά παραδείγματα του δεν είχε αναφερθεί σε οίνο με δεντρολίβανο και συνεπώς δεν υπήρχαν δεδομένα για την αναλογία δρόγης-διαλύτη. Για το λόγω αυτό ως αναλογία αποξηραμένης δρόγης/μούστου χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα του EMA. Η παρασκευή του οινόλυτου ξεκινώντας από μούστο έγινε από τον γράφοντα στο εργαστήριο του κοινοτικού φαρμακείου (Φαρμακείο Παναγιώτης Καλλιμάνης). Τα αποτελέσματα της ποιοτικής ανάλυσης του οινόλυτου που προέκυψε έδειξε ότι δεν υπάρχουν διτερπένια αβιετανίου ή μπετουλινικό οξύ, αλλά ταυτοποιήθηκε το ροσμαρινικό οξύ που ασκεί έντονη αντιοξειδωτική δράση.

Συμπερασματικά, για το οινόλυτο δεντρολίβανου που παράχθηκε με την προαναφερόμενη μέθοδο:

- δεν ανιχνεύθηκαν οι ουσίες CA, CS, BA και 12MCA
- ταυτοποιήθηκε το ροσμαρινικό οξύ. Η παρουσία του στο οινόλυτο προσδίδει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση από ότι ο αντίστοιχος οίνος μόνος του.

Τα **ελαιόλυτα** είναι κατ' ουσία φαρμακευτικά έλαια, εξαιρετικά χρήσιμα διότι συνδυάζουν τις ευεργετικές δράσεις του φυτικού ελαίου με αυτά των φυτικών δρογών που εκχυλίζονται στο έλαιο.

Από πειράματα που έχουν γίνει σε πειραματόζωα αλλά και από επιδημιολογικές μελέτες φαίνεται ότι το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο μπορεί να προφυλάξει από την

εμφάνιση της νόσου Alzheimer. Από την άλλη μεριά, τόσο το *R. officinalis* όσο και η *S. officinalis* έδειξαν σε κλινικές μελέτες ότι ασκούν ευεργετική δράση στη νόσο Alzheimer και ότι οι κύριοι υπεύθυνοι για το αποτέλεσμα αυτό είναι τα διτερπένια αβιετανίου (Ghasemzadeh et al. 2020, Miroddi et al. 2014, Habtemariam 2016, Roman et al. 2019). Θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι ένα ελαιόλυτο των προαναφερόμενων φυτών σε έξτρα παρθένο ελαιόλαδο θα είναι πιο αποτελεσματικό από ότι το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο μόνο του.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί οι έρευνες για την ανεύρεση φυσικών αντιοξειδωτικών ουσιών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην βιομηχανία τροφίμων. Πράγματι, στα λίπη και τα λιπαρά τρόφιμα η χρήση φυτικών πρώτων υλών, που περιέχουν φαινολικές ουσίες, έχει μεγάλη σημασία διότι:

- ελαχιστοποιούν την οξύτητα
- επιβραδύνουν το σχηματισμό της τοξικής οξείδωσης στα προϊόντων
- διατηρούν τη θρεπτική αξία
- και αυξάνουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων (Maisuthisakul et al. 2007).

Ένα συχνό πρόβλημα των φυτικών ελαίων είναι η οξείδωση των λιπαρών τους συστατικών, ένα φαινόμενο που αναφέρεται ως τάγγισμα. Τα πιο επιρρεπή έλαια είναι αυτά που έχουν:

- οργανικά οξέα μακράς αλύσου με διπλούς δεσμούς, όσο πιο πολλούς τόσο μεγαλύτερη η ευαισθησία τους στο τάγγισμα
- μικρή περιεκτικότητα σε λιπαρές αντιοξειδωτικές ουσίες όπως είναι η τοκοφερόλη κ.α. Για παράδειγμα το ελαιόλαδο είναι από τα έλαια που παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή στην οξείδωση αφενός μεν γιατί περιέχει κυρίως μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, αφετέρου δε δια της υψηλής του ποσότητας σε τοκοφερόλη αλλά και σε πολυφαινόλες.

Είναι γνωστό ότι οι φυτικές φαινολικές ενώσεις είναι εξαιρετικά αποτελεσματικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες. Οι Cuvelier et al., (1994) και οι Kamatou et al., (2010) απέδειξαν ότι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της *S. officinalis* και των άλλων φυτών του ίδιου γένους αποδίδονται ουσιαστικά στα διτερπένια αβιετανίου (καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη) και στα παράγωγα του καφεϊκού οξέος (ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, κλπ.). Επιπλέον, οι Chen et al., (1997) διευκρίνισαν ότι η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των πολυφαινολών σχετίζεται με τις χημικές τους δομές, ιδιαίτερα με την υδροξυλομάδα τους (Jaberian et al., 2013) και το ότι η παρουσία μιας δεύτερης ομάδας υδροξυλίου στην θέση όρθο ή πάρα αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως συμβαίνει στο ροσμαρινικό οξύ, στην καρνοσόλη και το καρνοσικό οξύ.

Συμπερασματικά, όσον αφορά τα ελαιόλυτα των *R. officinalis* και *S. fruticosa*:

- οι ουσίες CA, CS, BA και 12MCA εκχυλίζονται (ξεκινώντας από αποξηραμένα φύλλα) και διαλύονται (ξεκινώντας με ξηρό εκχύλισμα) στο ελαιόλαδο
- οι προαναφερόμενες ουσίες παρουσιάζονται αρκετά σταθερές στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, έχει σαν αποτέλεσμα που συμπεριφέρεται ως λιπόφιλος, μη πολικός διαλύτης. Πρόκειται για ένα πολύ σημαντικό εύρημα αν αναλογιστεί κανείς την εύκολη και γρήγορη μετατροπή των ουσιών CA, CS και 12MCA (ιδιαίτερα των CA, CS) σε πολικούς διαλύτες όπως είναι το νερό, η αιθανόλη και

η μεθανόλη. Με τη χρήση του ελαιόλαδου για την παρασκευή ενός ελαιολύτου που περιέχει τις ουσίες CA, CS και 12MCA μπορούμε να έχουμε μια φαρμακευτική μορφή όπου οι ουσίες ενδιαφέροντος δεν αλλοιώνονται εύκολα, τουλάχιστον όσον αφορά τους 2 πρώτους μήνες από την παρασκευή του, όπως φάνηκε και από το πείραμα που περιγράφηκε στην παράγραφο 8.2.3 των ελαιολύτων.

- η πιθανή προστασία του ελαιόλαδου από την οξείδωση του (τάγγισμα) λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης των CA, CS, BA και 12MCA
- τον συνδυασμό των ευεργετικών δράσεων των διαλυμένων ουσιών και του φυτικού ελαίου με πιθανό αποτέλεσμα να έχουμε αθροιστικό ή συνεργικό φαρμακολογικό αποτέλεσμα.
- οι αντιοξειδωτικές ενώσεις παίζουν καθοριστικό ρόλο στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών που σχετίζονται με εκφυλιστικές διαταραχές ενεργώντας ως συλλέκτες ελεύθερων ριζών, μειώνοντας έτσι την έκταση της οξειδωτικής βλάβης (Rauter et al. 2012).

Η μελέτη της **επίδρασης του χρόνου αποθήκευσης** σε 0, 12, 24 και 36 μήνες, των φύλλων της *Salvia fruticosa* Mill. στα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά των διτερπενίων αβιετανίου, έδειξε ότι για όλες τις ουσίες η μεγαλύτερη ποσοστιαία μείωση συμβαίνει στους πρώτους 12 μήνες φύλαξης της δρόγης, εκτός της RO που αυξήθηκε, δεδομένου ότι σε χρόνο 0 δεν είχε ταυτοποιηθεί. Επίσης παρατηρήθηκε ότι στους 36 μήνες η συνολική ποσότητα έχει σχεδόν υποδιπλασιαστεί (μείωση κατά 40,79%).

Έγινε προσπάθεια για την άμεση ταυτοποίηση της κάμφορας και θουγιόνης στα φυτικά εκχυλίσματα με την μέθοδο ¹H-NMR χωρίς θετικό αποτέλεσμα λόγω τις επικάλυψης των κορυφών στην αλειφατική ζώνη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

1. Φλεγμονώδεις παθήσεις του δέρματος και AhR

Όσον αφορά την εμπλοκή του AhR στην παθογένεια ορισμένων δερματικών παθήσεων, τα διαθέσιμα δεδομένα είναι αντιφατικά: υπάρχουν μελέτες που έδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ενεργοποίησης του AhR και των φλεγμονωδών παθήσεων του δέρματος (Panteleyev et al. 2006, Tauchi et al. 2005, Gaitanis et al. 2008, Krämer et al. 2009, Magiatis et al. 2013) ενώ σύμφωνα με άλλες αναφορές η ενεργοποίηση του AhR φαίνεται να είναι επωφελής για τη θεραπεία τέτοιων παθήσεων (Di Meglio et al. 2014, Smith et al. 2017, Napolitano et al. 2018).

Είναι πολύ γνωστό ότι η 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-ρ-διοξίνη (TCDD) προκαλεί πολλές από τις επιζήμιες επιδράσεις της μέσω της **επίμονης-παρατεταμένης** ενεργοποίησης του AhR (Sorg et al. 2014). Μελέτες που χρησιμοποιούν knockout ποντίκια (δηλαδή με απουσία του AhR) έδειξαν ότι η τοξικότητα της TCDD εξαρτάται σχεδόν αποκλειστικά από την παρουσία λειτουργικού AhR (Fernandez-Salguero et al. 1995, Mimura et al. 1997).

Η εμφάνιση της χλωρακμής, μιας χαρακτηριστικής δερματοπάθειας που ομοιάζει με ακμή, είναι ένα χαρακτηριστικό κλινικό σημείο της δηλητηρίασης από TCDD στους ανθρώπους (Panteleyev et al. 2006).

Η ενεργοποίηση του AhR παίζει σημαντικό ρόλο στη μεσολάβηση των βιολογικών-τοξικολογικών επιπτώσεων μιας ποικιλίας περιβαλλοντικών ξеноβιοτικών στο ανοσοποιητικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένων της ιντιρουμπίνης και της ινδολο [3,2-b] καρβαζόλης (ICZ) που παράγονται από το γένος *Malassezia* (Esser et al. 2009, Vlachos et al. 2012).

Στη σημηγατορροϊκή δερματίτιδα (SD), μια χρόνια φλεγμονώδης δερματίτιδα στην οποία τα είδη *Malassezia* φαίνεται πως παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της, αποδείχθηκε ότι η FICZ, η IND και η PZ:

- 1) στους ασθενείς με SD παράγονται από τη *Malassezia furfur* σε υψηλότερες ποσότητες από ό,τι στους υγιείς ανθρώπους
- 2) συμπεριφέρονται ως αγωνιστές του AhR (Gaitanis et al. 2008, Magiatis et al. 2013, Mexia et al. 2015)

Πράγματι οι Gaitanis et al., (2008) ανακάλυψαν ότι στους ασθενείς με SD, οι φολίδες που προέρχονταν από την πάσχουσα δερματική περιοχή, περιείχαν υψηλότερες ποσότητες ινδολο[3,2-b]καρβαζόλης (ICZ) και μαλασεζίνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου των υγιών ατόμων. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η ποσότητα αυτών των ενώσεων ήταν ευθέως ανάλογη με τη σοβαρότητα της νόσου (Gaitanis et al. 2008). Πρόκειται για ένα πολύ σημαντικό στοιχείο δεδομένου ότι στην SD, αυτά τα λιπόφιλα προσδέματα θα μπορούσαν να διασχίσουν την ελαττωματική επιδερμίδα (De Angelis et al. 2005) και να φθάσουν στην κοκκώδη και στην ακανθωτή στοιβάδα και εν συνεχεία να ενεργοποιήσουν τον AhR (Swanson et al. 2004).

Εκτός από την ICZ και την μαλασεζίνη, 4 ακόμη ενώσεις οι: IND, FICZ, τρυπαθρίνη και πιτυριασιτρίνη αναγνωρίστηκαν ως μεταβολίτες των *Malassezia spp.* Εκχυλίσματα φολιδών από δέρμα ασθενών, με ασθένειες που σχετίζονται με της

Malassezia spp., κατέδειξαν 10-1000 φορές υψηλότερη ικανότητα ενεργοποίησης του AhR από ό,τι τα δερματικά εκχυλισμάτα ελέγχου. Η ανάλυση των εκχυλισμάτων των ασθενών έδειξε την παρουσία της IND, της FICZ, της ICZ, της μαλασεζίνης και της πιτυριασιτρίνης (Magiatis et al. 2013). Η σύνθεση αυτών των εξαιρετικά ισχυρών αγωνιστών του AhR από μέρους των ζυμομυκήτων του γένους *Malassezia*, θα μπορούσε να έχει σημαντικό αντίκτυπο στους μηχανισμούς ομοιόστασης του δέρματος, αλλά και στην ανάπτυξη ασθενειών. Οι ζυμομύκητες του γένους *Malassezia* εμπλέκονται στις εξάρσεις ορισμένων φλεγμονωδών δερματοπαθειών, όπως η ατοπική δερματίτιδα (AD) και η σημηματοροοϊκή δερματίτιδα (SD) (Gupta et al. 2004). Κατά την τελευταία δεκαετία εντοπίστηκε μια σειρά ινδολικών ουσιών που συντέθηκαν *in vitro* από τον μύκητα *M. furfur*. Αυτές οι ουσίες έχουν συσχετιστεί με το παθογόνο δυναμικό αυτού του είδους μύκητα (Mayer et al. 2010)

Οι Tauchi et al., (2005) απέδειξαν ότι η βασική ενεργοποίηση της οδού του AhR σε γενετικά τροποποιημένους ποντικούς, που εκφράζουν την δομικά ενεργή μορφή του AhR στα κερατινοκύτταρα, είναι αρκετή για να προκαλέσει φλεγμονώδεις δερματικές αλλοιώσεις και υποδηλώνει τη συμμετοχή της εξαρτώμενης από τον AhR γονιδιακής μεταγραφής στις φλεγμονώδεις ασθένειες μετά από έκθεση σε επαγγελματικά και περιβαλλοντικά ξενοβιοτικά.

Επιπλέον, επιδημιολογικά στοιχεία έδειξαν ότι η περιβαλλοντική ρύπανση, που περιέχει πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH) οι οποίοι ενεργοποιούν τον AhR, οδηγεί σε περισσότερα περιστατικά εκζέματος (Krämer et al. 2009).

Σε ένα μοντέλο ποντικών που παρουσιάζει υπερέκφραση του AhR στο επίπεδο των κερατινοκυττάρων, εμφανίστηκε αυθόρμητα φλεγμονή στο δέρμα τους που έμοιαζε με ατοπική δερματίτιδα (Hidaka et al. 2017). Επίσης, διάφορες μελέτες αναφέρουν ότι σε ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα ο AhR παρουσιάζει μια ρύθμιση προς τα άνω (up-regulation) σε σύγκριση με τους υγιείς ανθρώπους (Kim et al. 2014, Hidaka et al. 2017).

Ως εκ τούτου, έγινε η υπόθεση ότι στην περίπτωση της SD, οι ινδολικές ενώσεις που παράγονται από την *Malassezia furfur* και ενεργοποιούν τον AhR, κατέχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου (Gaitanis et al. 2008, Magiatis et al. 2013).

Αναφέρθηκαν παραδείγματα με βάση τα οποία φαίνεται ότι η ενεργοποίηση του AhR μπορεί να προάγει ή να επιδεινώσει μια δερματοπάθεια, ωστόσο, από την άλλη πλευρά, υπάρχουν μελέτες με ευρήματα που δείχνουν ότι ένας αγωνιστής του AhR παρουσιάζει ευεργετικά αποτελέσματα στη περίπτωση φλεγμονωδών δερματικών παθήσεων που χαρακτηρίζονται από ανοσολογική μεσολάβηση. Για παράδειγμα, από βιοψίες δέρματος που ελήφθησαν από το πάσχον δέρμα ψωριασικών ασθενών, διαπιστώθηκε ότι η ενεργοποίηση του AhR από τη FICZ είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της φλεγμονής, ενώ οι ανταγωνιστές του AhR αύξησαν τη φλεγμονή. Παρομοίως, η ενεργοποίηση του AhR μέσω του ενδογενούς προσδέματος FICZ, μείωσε την φλεγμονώδη απόκριση στο μοντέλο φλεγμονής του δέρματος που προκλήθηκε με τη μέθοδο της ιμικιμόδης (imiquimod), ενώ αντιθέτως, knock-out ποντίκια με έλλειψη του AhR παρουσίασαν σημαντική επιδείνωση της νόσου, σε σύγκριση με τους μάρτυρες με επαρκή επίπεδα του AhR. Στην περίπτωση αυτή φάνηκε ότι τα κερατινοκύτταρα ήταν υπεύθυνα για αυτή την υπερφλεγμονώδη απόκριση και

παρατηρήθηκε προς τα άνω ρύθμιση (up-regulation) των μεταγραφικών παραγόντων που είναι μέλη της οικογένειας AP-1 (Di Meglio et al. 2014).

Το Tapinarof (GSK2894512), ένα προϊόν ημισύνθεσης με πρόδρομη ένωση φυσικής προέλευσης, απέδειξε ότι αποτελεί μια αποτελεσματική τοπική θεραπεία για ασθενείς με ψωρίαση κατά πλάκας ή με ατοπική δερματίτιδα. Το Tapinarof έχει αναγνωριστεί ότι ασκεί τη φαρμακολογική του δράση ως αγωνιστής του AhR. Πράγματι, οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν επιβεβαίωσαν ότι η αποτελεσματικότητά του Tapinarof εξαρτάται από ένα λειτουργικό AhR. Το Tapinarof δεσμεύει και ενεργοποιεί το AhR σε πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του ανθρώπινου δέρματος (Bissonnette et al. 2011, Smith et al. 2017). Πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι το tapinarof ενεργοποιεί τον Nrf2 και μειώνει το οξειδωτικό στρες (Smith et al. 2017).

Η τοπική εφαρμογή της πίσσας λιθανθράκων είναι μια παλιά και αποτελεσματική θεραπεία της ψωρίασης και του εκζέματος, γνωστή πολύ πριν από την ανακάλυψη του AhR. Η πίσσα λιθανθράκων είναι πηγή πολλών δυνητικά τοξικών PAH (Paghdal et al. 2009). Παρά τη μακροχρόνια κλινική χρήση και αποτελεσματικότητά της, ο μοριακός μηχανισμός της θεραπείας με πίσσα άνθρακα είναι άγνωστος. Οι Van den Bogaard et al., (2013), μελετώντας κερατινοκύτταρα από ασθενείς με AD και από υγιείς μάρτυρες, απέδειξαν ότι η πίσσα λιθανθράκων ενεργοποιεί τον AhR, με αποτέλεσμα την επαγωγή της επιδερμικής διαφοροποίησης και την αποκατάσταση του επιδερμικού φραγμού στους ασθενείς με AD. Μετά από καταστολή του AhR, μέσω της τεχνικής του siRNA (Small interfering RNA), ακυρώθηκε πλήρως αυτό το αποτέλεσμα από μέρους της πίσσας λιθανθράκων. Οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η πίσσα λιθανθράκων αποκατέστησε πλήρως την έκφραση των κύριων πρωτεϊνών του δερματικού φραγμού, συμπεριλαμβανομένης της φιλαγκρίνης, σε ασθενείς με AD. Οι συγγραφείς καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση του AhR ανοίγει μια νέα οδό για την επανεξέταση του AhR ως φαρμακολογικού στόχου και συνεπώς στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων για την αντιμετώπιση της AD (Van den Bogaard et al. 2013).

Το *Indigo naturalis*, μια σκόνη που παρασκευάζεται από το φυτό *Strobilanthes formosanus Moore (Acanthaceae)*, έχει ερευνηθεί εκτενώς και έχει αποδειχθεί από αρκετές μελέτες ότι η τοπική της εφαρμογή της με τη μορφή αλοιφής είναι αποτελεσματική στη θεραπεία της ψωρίασης κατά πλάκας. Το *Indigo naturalis* που χρησιμοποιήθηκε στις περισσότερες μελέτες περιείχε 1,4% σε ίντιγκο (indigo) και 0,16% σε ιντιρουμπίνη. Η αλοιφή indigo naturalis ήταν ένα μείγμα σκόνης indigo naturalis και φορέα (βαζελίνη, κίτρινο κερί και ελαιόλαδο) σε αναλογία (1:10). Σε άλλη μελέτη έγινε δοκιμή με 4 διαφορετικές περιεκτικότητες της ιντιρουμπίνης στην αλοιφή: 200, 100, 50 και 10 μg/g κρέμας. Σύμφωνα με τους ερευνητές των μελετών η θεραπεία της ψωρίασης επιτυγχάνεται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων στην επιδερμίδα, καθώς και μέσω της αναστολής της διήθησης των T λεμφοκυττάρων και των επακόλουθων φλεγμονωδών διεργασιών στις ψωριασικές βλάβες (Lin et al. 2007, Lin et al 2008, Lin et al 2012, Lin et al 2018). Η ιντιρουμπίνη και η ίντιγκο, τα δραστικά συστατικά του *Indigo naturalis* (Lin et al. 2018), συμπεριφέρονται ως ισχυροί αγωνιστές του AhR (Adachi et al. 2001).

Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση της σχέσης του AhR και των δερματοπαθειών. Ειδικές ιστολογικές μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση των AhR και ARNT ρυθμίζεται προς τα πάνω στο ψωριασικό δέρμα, ενώ η έκφραση του CYP1A1 μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες (Kim et al. 2014). Αντίθετα, τα επίπεδα στον ορό τόσο του AhR όσο και του CYP1A1 ήταν αυξημένα στους ασθενείς με ψωρίαση σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες (Beranek et al. 2018). Επιπλέον, είναι ακόμα άγνωστο γιατί οι τοπικοί και συστηματικοί αγωνιστές του AhR μειώνουν την ψωριασική φλεγμονή αναστέλλοντας τις IL-17 και IL-22 *in vivo*, ενώ οι ίδιοι παράγοντες ρυθμίζουν προς τα άνω την έκφραση των IL-17 και IL-22 *in vitro* (Furue et al. 2019).

Τα ευρήματα των Tsuji et al., (2012) αποκάλυψαν έναν αντιφλεγμονώδη ρόλο του AhR στο δέρμα που οφείλεται στην ενεργοποίηση του προστατευτικού συστήματος Nrf2 η οποία είναι εξαρτώμενη από την **φύση του προσδέματος**. Για παράδειγμα η TCDD ενεργοποιεί τον AhR αλλά όχι το σύστημα Nrf2, ενώ η κετοκοναζόλη ενεργοποιεί τον AhR και το σύστημα Nrf2. Είναι άξιο λόγου ότι η ικανότητα της κετοκοναζόλης να αναστείλει την παραγωγή ελευθέρων ριζών μειώνεται στα κύτταρα που δεν διαθέτουν λειτουργικό σύστημα AhR ή Nrf2. Σε αντίθεση με τις προφλεγμονώδεις συνέπειες μετά την επαγωγή AhR-CYP1A1-ROS, ο άξονας AhR-Nrf2 έχει αντιφλεγμονώδη δράση μειώνοντας την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυτοκινών (Takei et al. 2015, Tsuji et al. 2012, Wang et al. 2018)

Πράγματι, ορισμένοι αγωνιστές του AhR ασκούν αντιοξειδωτική δράση διότι ενεργοποιούν ταυτόχρονα τον Nrf2, ο οποίος είναι ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας που μέσω του βιοχημικού καταρράκτη οδηγεί στην εξουδετέρωση του οξειδωτικού στρες (Furue et al. 2017, Takei et al. 2015).

Η φαρμακευτική λιθανθρακόπισσα ενεργοποιεί τόσο το AhR όσο και το Nrf2 και έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία φλεγμονωδών δερματικών παθήσεων, όπως η ατοπική δερματίτιδα (AD) και η ψωρίαση (Takei et al. 2015, Van den Bogaard et al. 2013).

Η 6-φορμυλινδολο[3,2-b]καρβαζόλη (FICZ), είναι το ενδογενές πρόσδεμα που συνδέεται με τον AhR με την υψηλότερη συγγένεια που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα. Η FICZ σε χαμηλά επίπεδα δρα ως προφλεγμονώδης παράγοντας, παρέχοντας αντίσταση στα παθογόνα βακτήρια, διεγείροντας τις αντικαρκινικές λειτουργίες και προάγοντας τη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων μέσω των κατασταλτικών γονιδίων στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Αντίθετα, σε υψηλές συγκεντρώσεις η FICZ συμπεριφέρεται με τρόπο παρόμοιο με τη TCDD, παρουσιάζοντας τοξικότητα στα έμβρυα ψαριών και πτηνών, ανοσοκαταστολή και ενεργοποίηση της εξέλιξης του καρκίνου. Οι διαφορές μεταξύ της FICZ και της TCDD φαίνεται ότι έγκειται στον ταχύ μεταβολισμό της FICZ από τον οργανισμό (Rannug et al. 2018).

Μέχρι σήμερα, μόνο η FICZ έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα αποτελεσματικό ενδογενές υπόστρωμα για το CYP1A1 συμμετέχοντας έτσι στον προτεινόμενο μηχανισμό άμεσου ελέγχου ανατροφοδότησης που εξαρτάται από το CYP1A1, την CYP1A1-εξαρτώμενη κάθαρση της FICZ (Wincent et al. 2009, Wei et al. 1998). Από όσα γνωρίζουμε, κανένας άλλος προσδέτης του AhR υψηλής συγγένειας δεν έχει ακόμη αποδειχθεί ως εξαιρετικό υπόστρωμα του CYP1A1 όπως η FICZ. Φαίνεται ότι η FICZ

σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενεργοποιεί το CYP1A1 και την CYP1A1-εξαρτώμενη κάθαρση της. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις η FICZ μπορεί να αναστέλλει αποτελεσματικά το ένζυμο CYP1A1 (Wei et al. 1998, Wincent et al. 2009, Smirnova et al. 2016).

Συλλογικά, σε υψηλές συγκεντρώσεις, διάφοροι προσδέτες του AhR συμπεριφέρονται παρόμοια, δηλαδή η παρατεταμένη ενεργοποίηση του AhR από υψηλές δόσεις του ενδογενούς προσδέματος FICZ μοιάζει με αυτό που προκαλείται από τοξικά προσδέματα όπως η TCDD.

Τόσο οι ενδογενείς όσο και οι εξωγενείς ενώσεις που αναστέλλουν το CYP1A1 ενδέχεται να οδηγήσουν σε συσσώρευση τοξικών επιπέδων της FICZ.

Η FICZ μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία συγκεκριμένων ασθενειών αλλά μπορεί επίσης να επιδεινώσει ασθένειες όπως φάνηκε σε ζωικά μοντέλα αυτών των ασθενειών υπογραμμίζοντας τη σημασία της κατάλληλης δόσης (Rannug et al. 2018).

Έχει ήδη γίνει κατανοητό ότι η ενεργοποίηση του AhR δεν είναι συνώνυμο με την τοξικότητα. Αρκετά φάρμακα που διατίθενται στο εμπόριο (π.χ. λεφλουνομίδη, πρεδνιζολόνη, ομεπραζόλη και αρκετά άλλα) έχουν αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν την οδό AhR, αν και η ενεργοποίηση του AhR δεν θεωρείται ο πρωταρχικός μηχανισμός δράσης τους (Hu et al. 2007).

Επομένως, ορισμένες ενώσεις που διατίθενται στο εμπόριο αλλά και χρόνιοι ρύποι, όπως η TCDD, μοιράζονται το AhR ως στόχο, ωστόσο τα αποτελέσματά τους διαφέρουν (Farmahin et al. 2016).

Στην περίπτωση που η ενεργοποίηση του AhR είναι θεραπευτικά θεμιτή, δεν μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι ένας ανταγωνιστής του AhR θα μπορούσε να επιδεινώσει ή να αναπτύξει δερματικές παθήσεις. Πρόσφατα, ο ανταγωνιστής του AhR E/Z-2-βενζυλιδενο-5,6-διμεθοξυ-3,3-διμεθυλινδαν-1-όνη (BDDI), έχει εγκριθεί για την τοπική εφαρμογή στο ανθρώπινο δέρμα ως καλλυντικό συστατικό (Tigges et al. 2014).

2. Καρκίνος του δέρματος και AhR

2.1 Καρκίνος του δέρματος

Το δέρμα εκτίθεται συνεχώς σε διάφορες ουσίες, άλλες με προκαρκινική και άλλες με αντικαρκινική δράση. Η ρύπανση του περιβάλλοντος, τα προϊόντα περιποίησης του δέρματος και η υπεριώδης ακτινοβολία μπορούν να επηρεάσουν διάφορες διαδικασίες στο δέρμα.

Τα τελευταία χρόνια, το ποσοστό εμφάνισης καρκίνου του δέρματος αυξάνεται σημαντικά. Ο αριθμός των ασθενών υπό θεραπεία για τον καρκίνο του δέρματος έχει αυξηθεί κατά 44% τα τελευταία 5 χρόνια. Πράγματι, ο καρκίνος του δέρματος έχει γίνει ο πιο κοινός τύπος καρκίνου στους Καυκάσιους. Αν και στην καρκινογένεση συμβάλλουν τόσο οι γενετικοί όσο και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η ταχεία αύξηση του καρκίνου του δέρματος φαίνεται να οφείλεται κυρίως στους δεύτερους (Guy et al. 2015, Leiter et al. 2014).

Η περιβαλλοντική έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, το ανοιχτόχρωμο χρώμα του δέρματος και των μαλλιών, το οικογενειακό ιστορικό μελανώματος, ένας μεγάλος αριθμός μελανοκυτταρικών σπύλων, είναι καλά χαρακτηρισμένοι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη μελανώματος (Miller et al. 2016). Το μελάνωμα είναι

αρκετά σπάνιο σε σχέση με τους υπόλοιπους τύπους καρκίνου του δέρματος (λιγότερο από 5%), αλλά το πιο επιθετικό. Το μέσο ποσοστό επιβίωσης των ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα είναι περίπου 6 μήνες. Η κακή πρόγνωση για ασθενείς με προχωρημένο μελάνωμα είναι αποτέλεσμα της ταχείας μετάστασης, της ανοχής στις αντικαρκινικές θεραπείες και της ανοσολογικής ανοχής των καρκινικών κυττάρων (Mabeta et al. 2020, Bertolotto et al. 2013).

2.2 Ο ρόλος του AhR στον καρκίνο του δέρματος

Όσον αφορά τον AhR, η κατάσταση φαίνεται να είναι λιγότερο περίπλοκη στην περίπτωση των νεοπλασιών του δέρματος, είτε κακοηθών είτε καλοηθών, σε σχέση με ότι ειπώθηκε προηγουμένως για τις φλεγμονώδεις δερματικές παθήσεις. Πράγματι, πολλές είναι οι αναφορές που δείχνουν ότι ο AhR παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και τη διατήρηση διαφόρων τύπων καρκίνων του δέρματος και ότι ο αποκλεισμός της σηματοδότησης του AhR θα μπορούσε να αποτρέψει ή να θεραπεύσει τον καρκίνο του δέρματος (Rao et al. 1988, Shimizu et al. 2000, Herrmann et al. 2002, Rannug et al. 2006, Fritsche et al. 2007, Matsumoto et al. 2007, Gaitanis et al. 2011, Magiatis et al. 2013, Haarmann-Stemmann et al. 2015, Merches et al. 2017, Pollet et al. 2018, Hidaka et al. 2019)

Από το 1973 έως το 1992 υπήρξε αύξηση 34% στη θνησιμότητα που σχετίζεται με το μελάνωμα στις ΗΠΑ. Είναι γνωστό ότι η γενετική ευαισθησία και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες συμβάλλουν στην έναρξη και την εξέλιξη του μελανώματος. Η υπερβολική έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία θεωρείται ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας στην έναρξη του μελανώματος, ωστόσο, τα επιδημιολογικά και πειραματικά στοιχεία δείχνουν ότι σημαντικό ρόλο κατέχει και η έκθεση σε περιβαλλοντικές καρκινογόνες ουσίες. Πράγματι, η έκθεση σε περιβαλλοντικές χημικές ουσίες που ενεργοποιούν την οδό του AhR συμβάλλει στην εξέλιξη του μελανώματος, ειδικά μέσω διέγερσης της έκφρασης και της δραστηριότητας των *μεταλλοπρωτεϊνών* της εξωκυττάριας ουσίας (MMPs). Η ενεργοποίηση του AhR από την TCDD στα A2058 κύτταρα του μελανώματος είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων των MMP-1, MMP-2, MMP-9 και της διήθησης της νεοπλασίας (Villano et al. 2006).

Το καρκίνωμα των δερματικών πλακωδών κυττάρων (SCC, cutaneous squamous cell carcinoma ή πλακώδες καρκίνωμα ή ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα) αντιπροσωπεύει τη δεύτερη πιο συχνή κακοήθη νεοπλασία του δέρματος, προσβάλλοντας το 7-11% των Καυκάσιων στις ΗΠΑ. Σε μια μελέτη συσχέτισης, που αφορούσε ολόκληρο το γονιδίωμα, στην περίπτωση του SCC διαπιστώθηκε ότι ο AhR είναι ένας νέος γενετικός τόπος ευπάθειας (Chahal et al. 2016).

2.2.1 AhR και καρκινογένεση στο δέρμα

2.2.1.1 AhR και καρκίνος του δέρματος από την ηλιακή ακτινοβολία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η FICZ λειτουργεί ως ισχυρός αγωνιστής υψηλής συγγένειας για τον AhR. Η UVR (συγκεκριμένα η UVB) διεγείρει τα επιδερμικά κερατινοκύτταρα ώστε να παράγουν ενδοκυτταρικά τη FICZ με πρόδρομη ουσία την τρυπτοφάνη (Fritsche et al. 2007, Haarmann-Stemmann et al. 2015). Κατ' αυτόν τον

τρόπο η FICZ μεσολαβεί στην ενεργοποίηση του AhR με αρχικό ερέθισμα την UVR και συνεπώς σχετίζεται με την καρκινογένεση του δέρματος που προκαλείται από την υπερϊώδη ακτινοβολία (Gaitanis et al. 2011, Pollet et al. 2018, Rannug et al. 2006).

Ο AhR είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της απόπτωσης στα κερατινοκύτταρα, με αποτέλεσμα τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη από την UVR να μην υφίστανται απόπτωση, τουναντίον μπορούν να επιβιώσουν και εν δυνάμει να μεταλλαχθούν σε καρκινικά. Ως απόδειξη αυτών ποντικοί με ανεπάρκεια του AhR προστατεύονται καλύτερα από τέτοιου είδους καρκίνους (Merches et al. 2017).

Επίσης, άλλη μελέτη έδειξε ότι η ενεργοποίηση του AhR προάγει την καρκινογένεση του δέρματος που προκαλείται από την UVR μέσω εξασθένησης του μηχανισμού απόπτωσης και του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA, αλλά και μέσω της ενίσχυσης της απόκρισης του δέρματος στην UVR (Hidaka et al. 2019)

Η υπερϊώδη ακτινοβολία Β (UVB) προκαλεί φωτοπροϊόντα με μεταλλαξιγόνο δράση στο DNA των επιδερμικών κερατινοκυττάρων. Για να αποφευχθεί η δημιουργία καρκίνου στο δέρμα, πρέπει να επιτευχθεί η διόρθωση της βλάβης του DNA ή η απόπτωση του κυττάρου. Ο AhR καταστέλλει την διαδικασία της επισκευής του DNA και της απόπτωσης και συμβάλλει στην καρκινογένεση του δέρματος που προκαλείται από την υπερϊώδη ακτινοβολία. Πράγματι, σε μια χρόνια μελέτη φωτοκαρκινογένεσης, τα ποντίκια με AhR -/- ανέπτυξαν 50% λιγότερα δερματικά καρκινώματα πλακωδών κυττάρων επαγόμενα από το UVB, από ότι τα AhR +/+ ποντίκια. Φαίνεται συνεπώς ότι ο AhR συμβάλλει στη φωτοκαρκινογένεση του δέρματος στα ποντίκια (Pollet et al. 2018).

Η τοπική εφαρμογή ορισμένων φυτικών πολυφαινόλων, όπως για παράδειγμα η ρεσβερατρόλη και γαλλικού εστέρα επιγαλλοκατεχίνη (EGCG), έδειξε ότι προστατεύουν τους ποντικούς από τον καρκίνο του δέρματος που προκαλείται από την ακτινοβολία UVB. Τόσο η ρεσβερατρόλη όπως και η επιγαλλοκατεχίνη γαλλικού εστέρα, ανταγωνίστηκαν τη σηματοδότηση του AhR (Lu et al. 2002, Palermo et al. 2003, Aziz et al. 2005)

Είναι λογικό και επόμενο, η χημική αναστολή της σηματοδότησης του AhR στο ανθρώπινο δέρμα να προτείνεται ως προληπτικό μέτρο κατά του καρκίνου του δέρματος επειδή αποτρέπει τη βλάβη που προκαλείται από την UVB (Tigges et al. 2014).

2.2.1.2 AhR και καρκίνος του δέρματος από μεταβολίτες του γένους *Malassezia*

Η FICZ και η IND που παράγονται από το γένος *Malassezia* μπορούν επίσης να εμπλακούν στην καρκινογένεση του δέρματος μέσω της ενεργοποίησης του AhR (Gaitanis et al. 2011).

Η *Malassezia* μέσω των μεταβολιτών της που συμπεριφέρονται ως αγωνιστές του AhR, φαίνεται πως εμπλέκεται στην εξωμαστική νόσο Paget (EMPD, extramammary Paget's disease) (Sato et al. 2019).

Οι μεσολαβούμενες από τον AhR τοπικές μεταβολικές και ανοσολογικές παρεκκλίσεις έχουν προταθεί ως ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός με το οποίο οι μεταβολίτες της *Malassezia* εμπλέκονται στο βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (BCC) του δέρματος (Gaitanis et al. 2011).

Αξιζει να σημειωθεί ότι η ICZ, όπως η TCDD, έχει θεωρηθεί ως προαγωγός του καρκίνου (Herrmann et al. 2002).

2.2.1.3 AhR και καρκίνος του δέρματος από ατμοσφαιρικούς ρύπους

Ο AhR σχετίζεται με τον καρκίνου του δέρματος σε ποντικούς που προκαλείται από τους ατμοσφαιρικούς ρύπους. Πράγματι, ύστερα από χρόνια τοπική εφαρμογή οργανικών εκχυλισμάτων αερομεταφερόμενων σωματιδίων, το 47% των AhR +/+ ποντικών εμφάνισε SCC ενώ στους AhR -/- ποντικούς δεν υπήρχαν περιστατικά καρκίνου του δέρματος. Επίσης, στους AhR +/+ ποντικούς παρατηρήθηκε επαγωγή του CYP1A1, αλλά όχι στους AhR -/-. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο AhR παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση που προκαλείται από τους ατμοσφαιρικούς ρύπους. Επιπλέον, η επαγωγή του CYP1A1 *in vitro* μπορεί να είναι χρήσιμη για την αξιολόγηση της καρκινογόνου δράσης των συστατικών των ατμοσφαιρικών ρύπων (Matsumoto et al. 2007).

Η ικανότητα του B[a]P (βένζο[α]πυρένιο) να προκαλεί καρκίνο του δέρματος τύπου SCC μετά από υποδόρια χορήγηση ή τοπική εφαρμογή σε ποντίκια (AhR +/+), χάνεται όταν υπάρχει έλλειψη του AhR (AhR -/-), υποδηλώνοντας ότι η επαγωγή του CYP1A1 με τη μεσολάβηση του AhR είναι σημαντική για την εκδήλωση καρκίνου του δέρματος (Shimizu et al. 2000). Το ίδιο αποτέλεσμα, δηλαδή ανυπαρξία της καρκινογόνου δράσης του B[a]P σε AhR -/- ποντίκια, είχε και η μελέτη των Nakatsuru et al., (2004). Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η επαγωγή των P450, συμπεριλαμβανομένου του CYP1A1, με μεσολάβηση του AhR είναι σημαντική για την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος που προκαλείται από τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH) σε ποντικούς (Matsumoto et al. 2007).

Το 21% των Syrian golden χάμστερ που έλαβαν TCDD σε συνολική ποσότητα 600 μg/kg σωματικού βάρους, είτε με υποδόρια είτε με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση, ανέπτυξε εντός 12-13 μηνών από την έναρξη του πειράματος, καρκίνο πλακωδών κυττάρων του δέρματος στην περιοχή του προσώπου. Δεν παρατηρήθηκαν νεοπλασίες σε κανένα άλλο όργανο. Αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι η TCDD μπορεί να είναι μια ισχυρή καρκινογόνος ουσία στα χάμστερ, δηλαδή στο πιο ανθεκτικό είδος στην τοξική επίδραση αυτής της ένωσης (Rao et al. 1988).

Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα αποτελέσματα φαίνεται ότι ανάπτυξη καρκίνου στο δέρμα των πειραματόζωων που προκαλείται από τους PAHs και την TCDD επιτελείται μέσω της ενεργοποίησης του AhR.

2.2.2 AhR και διατήρηση του καρκίνου του δέρματος

2.2.2.1 AhR και PD-1, PD-L1

Η αποκάλυψη του μηχανισμού με το οποίο τα καρκινικά κύτταρα αποφεύγουν, ανθίστανται στην ανοσολογική απάντηση του οργανισμού, ήταν η αιτία για την ανάπτυξη μιας καινούργιας φαρμακολογικής προσέγγισης που έφερε μια νέα εποχή για τη θεραπεία των νεοπλασιών: **την ανοσοθεραπεία του καρκίνου.**

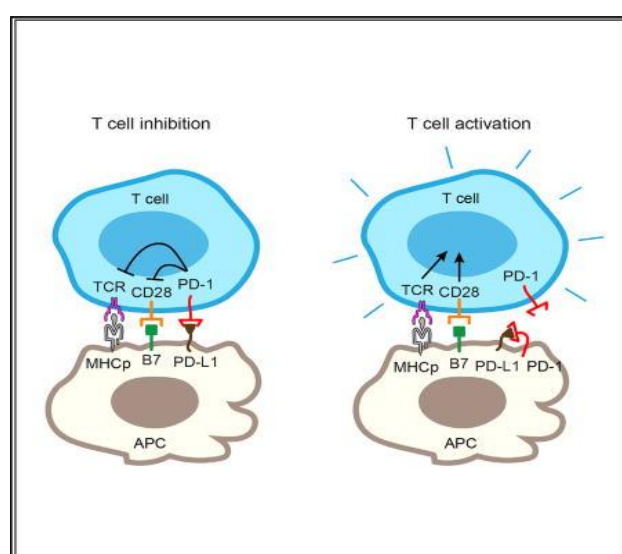
Αυτός ο νέος τρόπος αντιμετώπισης του καρκίνου οφείλεται στους καθηγητές-ερευνητές James Allison (ΗΠΑ) και Tasuku Honjo (Ιαπωνία) οι οποίοι τιμήθηκαν το 2018 με το Νόμπελ Ιατρικής και Φυσιολογίας για την «ανακάλυψη της θεραπείας του

καρκίνου μέσω της αναστολής της αρνητικής ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος». Η ανακάλυψη αυτή έφερε επαναστατικές μεταβολές στη θεραπευτική μεθοδολογία του καρκίνου και οδήγησε σε νέα αντικαρκινικά φάρμακα, τα οποία ξεκλειδώνουν τον ανασταλτικό μηχανισμό, και ενεργοποιούν τα ανοσοποιητικά κύτταρα (τα Τ-λεμφοκύτταρα) έτσι ώστε να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα. Τα φάρμακα αυτά παρουσίασαν ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα, συμπεριλαμβανομένων των περιπτώσεων καρκίνων τελικού-σταδίου, που θεωρούνται αθεράπευτοι. Είναι γνωστό ότι καρκίνοι σε προχωρημένο στάδιο είναι προβληματικοί και απαιτούν νέες θεραπευτικές μεθοδολογίες.

Αποδείχθηκε ότι τα καρκινικά κύτταρα και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) εμφανίζουν στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής τους μεμβράνης την διαμεμβρανική πρωτεΐνη PD-L1 (Programmed death-ligand 1), η οποία συνδέεται με την διαμεμβρανική πρωτεΐνη PD-1 (Programmed death 1) που υπάρχει στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης των Τ λεμφοκυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα Τ λεμφοκύτταρα να περνούν σε μια λανθάνουσα κατάσταση μη μπορώντας με αυτό τον τρόπο να επιτελέσουν το έργο τους που στην προκειμένη περίπτωση είναι η καταστροφή του καρκινικού κυττάρου (εικόνα 83). Συνεπώς, αν ένας φαρμακευτικός παράγοντας είναι σε θέση να επιδράσει με κάποιο τρόπο στην σύνδεση της PD-1 με την PD-L1, τότε τα καρκινικά κύτταρα δεν θα μπορούν να ξεφύγουν της ανοσολογικής απάντησης, βελτιώνοντας με αυτό τον τρόπο την πρόγνωση της νόσου. Αυτή η ανακάλυψη οδήγησε στην δημιουργία νέων φαρμάκων που προσδένονται στην PD-1 ή στην PD-L1 με αποτέλεσμα να εμποδίζουν με τον ένα ή τον άλλο τρόπο την άμεση σύνδεση της PD-1 με την PD-L1 (Valavanidis 2019).

Με το πέρασμα των ετών ανακαλύφθηκαν αρκετές από τις βιοχημικές λεπτομέρειες που αφορούν τον τρόπο με τον οποίο οι βιολογικοί παράγοντες του οργανισμού, αλλά και διάφορα ξενοβιοτικά, ρυθμίζουν τα επίπεδα των PD-1 και PD-L1 (Zhao et al. 2018).

Η ανοσοθεραπεία του καρκίνου, δηλαδή η αναστολή της ανοσολογικής ανοχής, έφερε επανάσταση στην αντιμετώπιση του προχωρημένου μελανώματος, μιας μορφής καρκίνου ιδιαίτερα δύσκολης στην αντιμετώπιση της (Thiem et al. 2019).



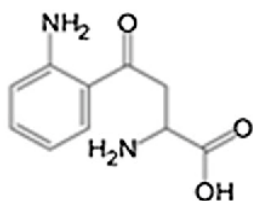
Εικόνα 83

Φαινόμενο ανοσολογικής ανοχής. Όταν η PD-1 του κυτταροτοξικού T κυττάρου συνδεθεί με την PD-L1 που εκφράζεται στα APC που διεισδύουν στον όγκο, προκαλείται καταστολή των κυτταροτοξικών T κυττάρων και προαγωγή των ρυθμιστικών T κυττάρων (Tregs), προωθώντας έτσι την ανοσολογική ανοχή (Zhao et al. 2018).

Σε δείγματα των κυττάρων μελανώματος διαπιστώθηκε ότι περίπου το 40% εκφράζει την PD-L1. Όπως προαναφέρθηκε η σύνδεση της PD-L1 με τον υποδοχέα PD-1 που εκφράζεται στα κυτταροτοξικά T κύτταρα (CTLs), έχει ως αποτέλεσμα τα CTL να καθίστανται δυσλειτουργικά και τα κύτταρα του μελανώματος να διαφεύγουν της κυτταρικής λύσης που προκαλείται από το ανοσοποιητικό σύστημα (Hidaka et al. 2019).

Περίπου το 75% των ασθενών με μελάνωμα παρουσιάζει θετική ανταπόκριση στην αντι-PD-1 θεραπεία, η οποία διαρκεί για χρόνια. Ωστόσο, έχουν σημειωθεί καθυστερημένες υποτροπές πολύ μετά την αρχική αντικειμενική υποχώρηση του όγκου και παρά τη συνεχή θεραπεία (Zaretsky et al. 2016).

Οι Liu et al., (2018) διαπίστωσαν ότι τα κύτταρα επαναδημιουργίας-επαναπλήρωσης του όγκου (tumor-repopulating cells), που είναι ένας υποπληθυσμός καρκινικών κυττάρων, παράγουν την **κνουρενίνη** η οποία είναι ένα προϊόν του μεταβολισμού της τρυπτοφάνης (εικόνα 84). Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση μετατροπής της τρυπτοφάνης σε κνουρενίνη είναι η 2,3-διοξυγενάση της ινδολαμίνης (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO). Η κνουρενίνη συμπεριφέρεται ως αγωνιστής του AhR. Η κνουρενίνη που παράγεται στο εσωτερικό του κυττάρου εξέρχεται με παθητική διάχυση και μέσω ειδικών πρωτεϊνών μεταφοράς εισέρχεται στο εσωτερικό των γειτονικών *κυτταροτοξικών* T κυττάρων (CTLs) και ενεργοποιεί τον AhR, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της PD-1 και κατ' επέκταση της συγκέντρωσης της στην μεμβράνη των CTLs.

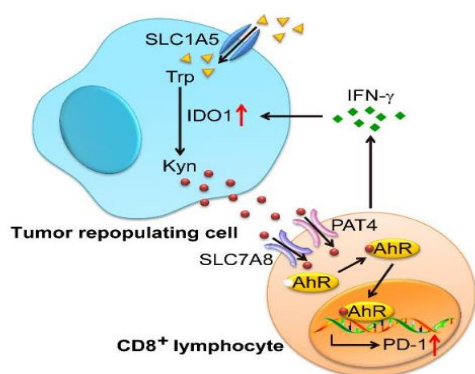


Εικόνα 82

Χημική δομή της κνουρενίνης

Το αρχικό ερέθισμα για την παραγωγή της κυνουρενίνης από τα κύτταρα επαναπλήρωσης του όγκου δίνεται από την IFN- γ , που προέρχεται από τα κυτταροτοξικά T κύτταρα. Επιπλέον, η IFN- γ διεγείρει την έκφραση για την PD-L1 στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Η IFN- γ επιφέρει αυτά τα αποτελέσματα ενεργοποιώντας των μεταβιοτροπικό υποδοχέα των ιντερφερόνων τύπου II (εικόνα 85) (Thiem et al. 2019, Liu et al. 2018). Ωστόσο η IFN- γ δεν είναι ο μόνος παράγοντας ρύθμισης της PD-L1 στα κύτταρα του μελανώματος. Υπάρχουν και διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται σε αυτό, όπως ο NF- κ B, το STAT3, MYC και HIF-1 α /2 α (Sun et al. 2018)

Υπό την επίδραση της IFN- γ τα APCs παράγουν κυνουρενίνη η οποία μεταφέρεται στα ρυθμιστικά T κύτταρα (Treg cells), ενεργοποιεί τον AhR και προκαλεί μέσω αυτού επαγωγή των Treg και ανοσολογική ανοχή (Liu et al. 2017).



Εικόνα 85

Η IFN- γ που απελευθερώνεται από τα CTLs, επιδρά στον μεταβιοτροπικό της υποδοχέα στα κύτταρα επαναπλήρωσης του όγκου και αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης μεταφοράς (SLC1A5) της τρυπτοφάνης στο εσωτερικό του κυττάρου και την έκφραση του IDO1 με αποτέλεσμα να αυξάνει η ταχύτητα μεταβολισμού της τρυπτοφάνης σε κυνουρενίνη. Κατόπιν η κυνουρενίνη βγαίνει από το κύτταρο με παθητική διάχυση και μέσω ειδικών πρωτεϊνών μεταφοράς εισέρχεται στο εσωτερικό των γειτονικών κυτταροτοξικών T κυττάρων (CTLs) και ενεργοποιεί τον AhR με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της γονιδιακής έκφρασης της PD-1 στην μεμβράνη των CTLs (Liu et al. 2018, Thiem et al. 2019, www.124.17.100.213/research/715.html).

Συνεπώς η ρύθμιση της PD-1 στα CTLs και της PD-L1 στα APCs και στα κύτταρα επαναπλήρωσης του όγκου, είναι ένα φαινόμενο που μεσολαβείται με την ενεργοποίηση του AhR από την κυνουρενίνη και οδηγεί στην ανοσολογική ανοχή της νεοπλασίας. Αυτό το εύρημα μας λέει ότι το σύστημα AhR μπορεί να είναι ένας σημαντικός διαμορφωτής της ανοσολογικής ανοχής που αναπτύσσεται στην περίπτωση του μελανώματος λόγω της έκφρασης των PD-1 και PD-L1.

2.2.2.2 AhR και iBRAFI

Οι αναστολείς BRAF (BRAFi, BRAF inhibitors) στοχεύουν την μεταλλαγμένη κινάση BRAF-V600E/K, η οποία συναντάται στο 50% των περιπτώσεων μελανώματος. Οι BRAFi δίνουν άνευ προηγουμένου αντικαρκινικές αποκρίσεις, αλλά η ανάπτυξη

αντίστασης στην δράση τους περιορίζουν το κλινικό τους όφελος. Οι κύριοι ρυθμιστές που οδηγούν στην έκφραση των γονιδίων αντίστασης παραμένουν ελάχιστα κατανοητοί. Ωστόσο, οι Corre et al., (2018) διαπίστωσαν ότι ο AhR ενεργοποιείται δομικά σε ένα υποσύνολο κυττάρων του μελανώματος, προωθώντας την έκφραση των γονιδίων ανθεκτικότητας στους BRAFi. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ότι υπό τη δράση των BRAFi, ο θάνατος των ευαίσθητων στο BRAFi κυττάρων οδηγεί συνήθως στην αύξηση ενός μικρού υποπληθυσμού κυττάρων, που λόγω της ενεργοποίησης του AhR, είναι ανθεκτικά στους BRAFi. Αυτός ο κυτταρικός υποπληθυσμός είναι υπεύθυνος για την **υποτροπή** της νεοπλασίας. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι τα κύτταρα που είναι ευαίσθητα στους BRAFi μπορούν να μετατραπούν σε ανθεκτικά χρησιμοποιώντας αγωνιστές AhR. Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα ένας ανταγωνιστής του AhR θα μπορούσε να βελτιώσει την έκβαση του μελανώματος. Πράγματι, όταν οι Corre et al., (2018) χρησιμοποίησαν τη ρεσβερατρόλη, έναν κλινικά συμβατό ανταγωνιστή του AhR που καταργεί την επιβλαβή **παρατεταμένη** ενεργοποίηση του, σε συνδυασμό με BRAFi, αποδείχθηκε ότι η ρεσβερατρόλη μειώνει τον αριθμό των ανθεκτικών στο BRAFi κυττάρων και καθυστερεί την ανάπτυξη του όγκου. Εν κατακλείδι, ο AhR κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη αντοχής στους BRAFi από τα νεοπλασματικά κύτταρα του μελανώματος. Συνεπώς οι συγγραφείς πρότειναν την εξασθένιση της δράσης του AhR ως στρατηγική για την αντιμετώπιση της αντίστασης των BRAFi και της υποτροπής στο μελάνωμα (Corre et al. 2018). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στην ίδια μελέτη η Vemurafenib, ένας BRAFi, συνδέεται άμεσα με τον AhR και διεγείρει την μετατόπιση του στον πυρήνα δρώντας ως αγωνιστής του AhR (Corre et al. 2018), ενώ αντιθέτως, σε μια άλλη έρευνα αποδείχθηκε ότι η Vemurafenib ενεργεί ως ανταγωνιστής του AhR και ότι λόγω αυτής της ενέργειας της προκαλεί σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες στο δέρμα των ασθενών με μελάνωμα, όπως φλεγμονώδεις δερματοπάθειες αλλά και καρκίνο του δέρματος (Hawerkamp et al. 2019).

Π Α Ρ Α Ρ Τ Η Μ Α Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο Υ 2

1. Δυνητική εφαρμογή του *Rosmarinus officinalis* L. και σε άλλες μορφές καρκίνου

Το επίπεδο έκφρασης του AhR συσχετίστηκε με την έκφραση της PD-L1 σε ανθρώπινα κύτταρα με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLCs). Η PD-L1 παίζει σημαντικό ρόλο στον NSCLC που προκαλείται από το Β[α]Ρ. Πράγματι ο αποκλεισμός της PD-L1 με ειδικά αντισώματα είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της καρκινογένεσης των πνευμόνων που προκαλείται από το Β[α]Ρ. Η ανεπάρκεια του AhR ακύρωσε τον καρκίνο του πνεύμονα που προκαλείται από το ΒαΡ. Επίσης φαίνεται ότι για την ρύθμιση προς τα άνω του PD-L1, που προκαλείται από την κυνουρενίνη στα Τ κύτταρα, απαιτείται λειτουργικός AhR (Liu et al. 2018).

Ο AhR στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα μπορεί να δράσει μέσω της αύξησης της PD-L1 αλλά και μέσω άλλων ανεξάρτητων μηχανισμών. Ως εκ τούτου, ο AhR έχει κεντρικό ρόλο στην καρκινογένεση των πνευμόνων και μπορεί να χρησιμεύσει ως στόχος για την πρόληψη αλλά και αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα (Wang et al. 2019).

Μόνο ένα ποσοστό (20-30%) των ασθενών επωφελείται από την θεραπεία με αντισώματα anti-PD-L1. Επίσης στην περίπτωση του μελανώματος έχει παρατηρηθεί η ανάπτυξη αντοχής στα φάρμακα αυτά που προκαλείται κυρίως από μεταλλάξεις των JAK1 / JAK2 (Zaretsky et al. 2016) και από την χρόνια διέγερση των καρκινικών κυττάρων από μέρους των ιντερφερόνων τύπου I και II (Benci et al. 2016).

Επίσης, παρατηρήθηκε ότι ο AhR εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα και είναι χρόνια ενεργός σε όγκους του αίματος (Di Natale et al. 2011, Gramatzki et al. 2009), όπως λευχαιμία των Τ-κυττάρων (Hayashibara et al. 2003) και το λέμφωμα (Sherr et al. 2013), καθώς και σε συμπαγείς όγκους όπως το γλοιοβλάστωμα (Opitz et al. 2011), τον καρκίνο των ωοθηκών (Wang et al. 2013), του πνεύμονα (Chang et al. 2007), του ήπατος (Liu et al. 2013), της κεφαλής και του τραχήλου της μήτρας (Di Natale et al. 2011). Οι Murray et al. (2014) ισχυρίστηκαν ότι η ανίχνευση της δραστηριότητας του AhR στο μικροπεριβάλλον μπορεί να χρησιμεύσει ως ισχυρός διαγνωστικός δείκτης για την επιθετικότητα του όγκου.

Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αναστολή του AhR και κατ' επέκταση του άξονα AhR-PD-L1 στα κύτταρα του ανοσοποιητικού, ανοίγουν τον δρόμο για την χρήση ανταγωνιστών του AhR κατά του καρκίνου του πνεύμονα. Πράγματι ο συνδυασμός αντισωμάτων anti-PD-L1 και ANF αντιπροσωπεύει μια νέα στρατηγική ανοσοθεραπείας του καρκίνου, και συνεπώς οι ανταγωνιστές του AhR όπως το συγκεκριμένο μεθανολικό εκχύλισμα του *Rosmarinus officinalis* L. αλλά και οι ουσίες του CA, CS και BA, θέτουν σημαντική υποψηφιότητα ως φαρμακευτικοί παράγοντες οι οποίοι θα μπορούσαν να βρουν επικουρική εφαρμογή και στην περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα.

2. Εκχύλισμα φύλλων *Rosmarinus officinalis* L.: δυνητική δράση επί των PAHs

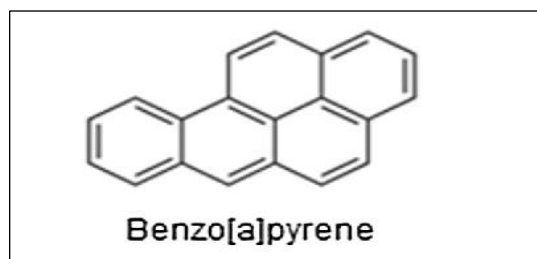
Στην παρούσα εργασία δεν διερευνήθηκε το κατά πόσο το εκχύλισμα φύλλων του *R.officinalis* L. ανταγωνίζεται την δράση των PAHs στον AhR. Στα πειράματα

σύνδεσης και ανταγωνισμού που έγιναν με το *R.officinalis* L. και τις απομονωμένες ουσίες του, δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιος από τους βασικούς αντιπροσώπους των PAHs όπως το B[a]P. Όπως έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως η καρνοσόλη ανταγωνίζεται τη δράση του B[a]P με ένα μη συναγωνιστικό τρόπο, δεδομένου ότι συνδέεται στο σύμπλεγμα του AhR, συγκεκριμένα στην Hsp90 που αποτελεί μια θέση διαφορετική από αυτή που συνδέονται οι αγωνιστές του AhR όπως η TCDD, η FICZ, η IND και η PZ (Mohebaty et al. 2012).

Οι Tagliabue et al., (2019), διερεύνησαν μέσω υπολογιστικών μοντέλων την περιοχή του AhR στην οποία συνδέονται οι αγωνιστές του. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι στη περιοχή αυτή υπάρχουν **δύο θέσεις σύνδεσης** του προσδέματος. Τους αγωνιστές του χώρισαν σε **3 ομάδες** ανάλογα με τη θέση σύνδεσης και τη φύση των χημικών δεσμών-αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται. Σύμφωνα με την ταξινόμηση τους:

- στην πρώτη ομάδα ανήκουν ουσίες όπως η TCDD και το B[a]P που συνδέονται στη θέση 1
- στη δεύτερη ομάδα ανήκει το DBA το οποίο σχηματίζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τον υποδοχέα στη θέση 2
- στη τρίτη ομάδα ανήκει η FICZ που συνδέεται στον υποδοχέα με δεσμούς υδρογόνου και πολικές αλληλεπιδράσεις στη θέση 2

Οι Offord et al., (1995) έδειξαν ότι μετά από συν-επίθεση του B[a]P με εκχύλισμα δεντρολίβανου ή ισοδύναμη συγκέντρωση της καρνοσόλης ή του καρνοσικού οξέος, η έκφραση του mRNA του κυτοχρώματος P450 CYP 1A1 ήταν 50% χαμηλότερη.



Εικόνα 86

Χημική δομή του B[a]P.

Οι Shimizu et al., (2000), απέδειξαν ότι η καρκινογόνος δράση του B[a]P παύει να υφίσταται στα πειραματόζωα στα οποία έλειπε ο AhR.

Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα των Tagliabue et al., (2019), των Offord et al., (1995), των Shimizu et al., (2000), των Seok et al., (2018), και τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, θα μπορούσαμε να πούμε **θεωρητικά** ότι το μεθανολικό εκχύλισμα *R.officinalis* L.:

- ανταγωνίζεται τη δράση των αγωνιστών και στις δυο διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης με τον υποδοχέα (δεδομένου ότι ανταγωνίζεται τόσο την TCDD όσο και την FICZ)
- αφού ανταγωνίζεται τη δράση της TCDD στη θέση 1 τότε θα μπορούσε να ανταγωνιστεί και την πρόσδεση του B[a]P στη θέση 1 του AhR. Αυτός ο συλλογισμός μπορεί να επεκταθεί και για τις ουσίες CA, CS, και BA δεδομένου

ότι στην παρούσα έρευνα οι συγκεκριμένες ουσίες έδειξαν ότι είναι συναγωνιστικοί ανταγωνιστές της TCDD.

- οφείλει την προφυλακτική και αντικαρκινική δράση του έναντι του B[a]P λόγω της ικανότητας του να ανταγωνίζεται της πρόσδεση αυτής της τοξικής ουσίας στον AhR.
- μπορεί να ανταγωνιστεί τη δράση της κνουρενίνης στον AhR, δεδομένου ότι η κνουρενίνη συνδέεται με αυτόν τον υποδοχέα στην ίδια θέση με την FICZ.

3. Το *Rosmarinus officinalis* L. και οι ενώσεις του CA, CS, BA ως αναστολεις της TCDD έναντι του AhR και ως ενεργοποιητές του Nrf2: δυνητικά οφέλη στις δερματικές παθήσεις

Ένα εκχύλισμα *R. officinalis* L., 23,2% σε καρνοσικό οξύ και 12,4% σε καρνοσόλη, έδειξε ότι ασκεί έντονη προστατευτική δράση έναντι της βλάβης που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες τόσο σε χάμστερς, μετά από διατροφή πλούσια σε λιπαρά, όσο και στα κύτταρα ηπατώματος HepG2 που επωάζονται με ελαϊκό οξύ. Η θεραπεία με εκχύλισμα δεντρολίβανου ανακούφισε τη στεάτωση του ήπατος και μείωσε τα επίπεδα των TG στο πλάσμα και το ήπαρ, καθώς και την συγκέντρωση των AST και ALT στο πλάσμα. Το εκχύλισμα δεντρολίβανου αύξησε τη δραστηριότητα των SOD, GSH-Px, CAT και μείωσε το περιεχόμενο MDA. Το φυτικό εκχύλισμα αύξησε σημαντικά την έκφραση του Nrf2 mRNA (Wanga 2020).

Ένα εκχύλισμα *R. officinalis* L., 23,2% σε καρνοσικό οξύ και 12,4% σε καρνοσόλη, αύξησε την έκφραση του Nrf2 mRNA στα κύτταρα ηπατώματος HepG2. Η αύξηση των επιπέδων της Nrf2 επιτεύχθηκε και με τις καθарές ουσίες καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη. Σύμφωνα με τα αριθμητικά αποτελέσματα το καρνοσικό οξύ αύξησε σε μεγαλύτερο βαθμό την Nrf2 από ότι το συνολικό εκχύλισμα του δεντρολίβανου, το οποίο ωστόσο ήταν πιο δραστικό από την καθάρη καρνοσόλη (Tong et al. 2017).

Επειδή ο ψωριασικός ιστός περιλαμβάνει τη διήθηση των ουδετερόφιλων και την παρακεράτωση, θεωρείται ότι το Nrf2 όχι μόνο ρυθμίζει τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις αλλά επίσης διατηρεί την επιδερμική διαφοροποίηση, χαρακτηριστικό της επιδερμικής ομοιόστασης. Οι Ogawa et al., (2020) χρησιμοποιώντας το μοντέλο της δερματικής φλεγμονής που προκαλείται από το imiquimod, ανιχνεύθηκε υπερβολική φλεγμονώδης απόκριση και μειωμένη επιδερμική διαφοροποίηση σε ποντικούς Nrf2 -/-. Η θεραπεία με φουμαρικό διμεθύλιο σε ποντίκια Nrf2 +/+ μείωσε τον σχηματισμό του ψωριασικού ιστού και επιτεύχθηκε επιδερμική διαφοροποίηση, η οποία δεν παρατηρήθηκε σε ποντικούς Nrf2 -/-. Το ψωριασικό δέρμα έδειξε μειωμένα επίπεδα έκφρασης του Nrf2 και των γονιδίων στόχων του σε σύγκριση με το μη παθολογικό δέρμα. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το Nrf2 παίζει σημαντικό ρόλο στην ψωρίαση τονίζοντας την θεραπευτική προσέγγιση για την διαχείριση της ψωρίασης που βασίζεται σε ηλεκτρόφιλα μόρια (Ogawa et al. 2020). Ίσως στη δράση του *Rosmarinus officinalis* L. στην ψωρίαση να παίζει ρόλο και η ικανότητα του να ενεργοποιεί τον Nrf2.

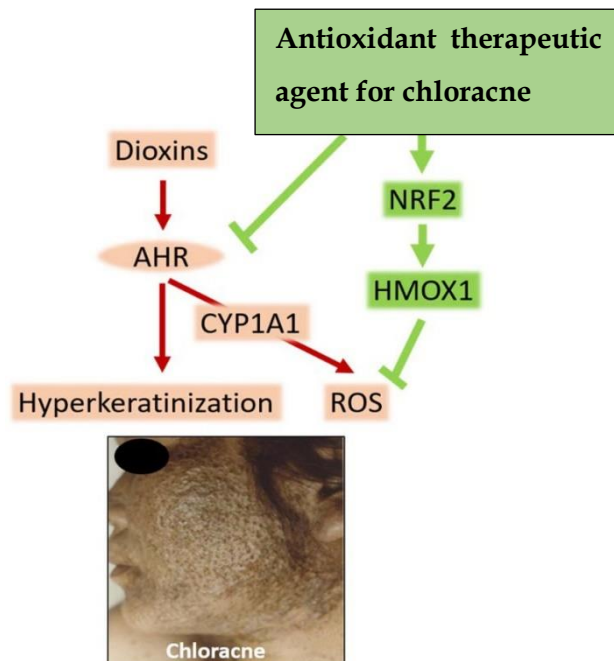
Αντιοξειδωτικοί παράγοντες που αναστέλλουν την ενεργοποίηση του AhR και προάγουν την διέγερση του Nrf2 μπορεί να είναι χρήσιμοι για τη διαχείριση των υγειονομικών κινδύνων που σχετίζονται με τις διοξίνες. Η κινναμαλδεΰδη είναι

ισχυρός αναστολέας του άξονα AHR-CYP1A1 ενώ ενεργοποιεί με ανεξάρτητο τρόπο τον αντιοξειδωτικό άξονα του NRF2 (Uchi et al. 2017).

Πραγματοποιήθηκε κλινική δοκιμή με την από του στόματος χορήγηση του προϊόντος Keishibukuryogan, που διεγείρει τον Nrf2, για τη θεραπεία ασθενών που είχαν μολυνθεί με υψηλές συγκεντρώσεις πολυχλωριωμένων διβενζοφουρανίων μετά από την κατάποση μολυσμένου ελαίου από πίτουρο ρυζιού το 1968. 30 με 40 χρόνια μετά το ατύχημα οι μέσες συγκεντρώσεις των πολυχλωριωμένων διβενζοφουρανίων στο αίμα τους παρέμειναν περισσότερο από 10 φορές υψηλότερες από εκείνες των υγιών απόμων. Οι ασθενείς υπέφεραν από χλωρακμή, γενική κόπωση, μούδιασμα και παραισθησία των άκρων, βήχα και αποχρωματισμός των πτυέλων. Μετά από 3 μήνες από του στόματος χορήγηση του προϊόντος Keishibukuryogan (πρόκειται για μια παραδοσιακή σύνθεση Kamro που περιέχει εκχύλισμα *C. Cassia*) εξασθένησε σημαντικά τα συμπτώματα της χλωρακμής, της γενικής κόπωσης, του βήχα και τον αποχρωματισμό των πτυέλων. Έτεινε επίσης να μειώσει το μούδιασμα και την παραισθησία των άκρων. Αυτά τα αποτελέσματα επισημαίνουν ότι οι εξωγενείς αγωνιστές του Nrf2 μπορούν να ανταγωνιστούν τα αποτελέσματα της δράσης της διοξίνης στον AhR και την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Furue et al. 2108).

Δεδομένου ότι η *C. cassia* είναι ένα φθινό και δημοφιλές φυτό στην Ασία, η καθημερινή του κατάποση μπορεί να είναι μια κατάλληλη προσέγγιση για την άμυνα από τους κινδύνους για την υγεία των ανθρώπων που ζουν σε περιοχές μολυσμένες με υψηλά επίπεδα διοξινών (Furue et al. 2018).

Οι Uchi et al., (2017) προτείνουν τη χρήση της κινναμαλδεΐδης και σε άλλες περιπτώσεις παθήσεων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες όπως η ακμή και η λεύκη.



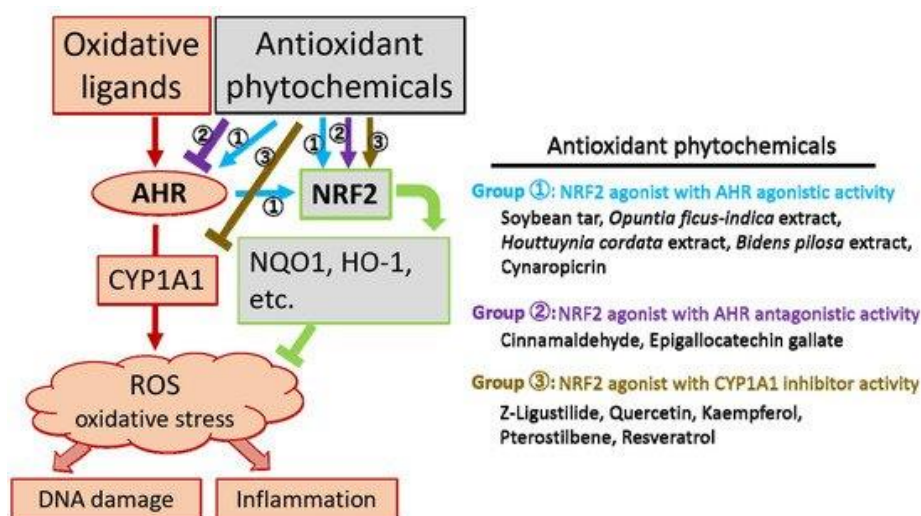
Εικόνα 87

Οξειδωτικοί παράγοντες όπως η υπερϊώδης ακτινοβολία, οι διοξίνες και οι περιβαλλοντικοί πολυκυκλικοί ρύποι, ενεργοποιούν το σύστημα AhR και CYP1A1, το οποίο δημιουργεί ελεύθερες ρίζες (ROS), με τελικό αποτέλεσμα την βλάβη στο DNA και την φλεγμονή. Τα

αντιοξειδωτικά φυτοχημικά ασκούν την αντιοξειδωτική τους ικανότητα ενεργοποιώντας τον Nrf2, βασικό μεταγραφικό παράγοντα για την επαγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως είναι το NAD (P) H: οξειδοοδουκτάση 1 της κινόνης (NQO1) και την οξυγενάση της αίμης (heme oxygenase-1, HO-1). Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα με την σειρά τους εξουδετερώνουν ή ελαχιστοποιούν την παραγωγή ROS (Furue et al. 2108).

Τα αντιοξειδωτικά φυτοχημικά ταξινομούνται σε τουλάχιστον τρεις ομάδες με βάση την συμπεριφορά τους έναντι των AhR, CYP1A1, και Nrf2:

- Η ομάδα 1 περιέχει Nrf2 αγωνιστές με αγωνιστική δραστηριότητα AhR
- Η ομάδα 2 περιέχει αγωνιστές Nrf2 με ανταγωνιστική δράση AhR
- Η ομάδα 3 περιέχει αγωνιστές Nrf2 με δραστικότητα αναστολέα CYP1A1



Εικόνα 88

Ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών φυτοχημικών με βάση την συμπεριφορά τους έναντι των AhR, CYP1A1, και Nrf2 (Furue et al. 2017)

Όπως προαναφέρθηκε η κετοκοναζόλη ενεργοποιεί τον AhR και μέσω αυτού τον Nrf2 με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από το πρόσδεμα. Κάτι τέτοιο δεν μπορούμε να το ισχυριστούμε για το *Rosmarinus officinalis* L. ή για τις ενώσεις του CA, CS και BA, διότι όπως είδαμε δρουν ως ανταγωνιστές του AhR, τουλάχιστον όσον αφορά την canonical pathway. Ωστόσο, θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να διερευνηθεί αν η 7MER και η DMA, ως μερικοί αγωνιστές του AhR, θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν τον Nrf2 με τον ίδιο τρόπο που το κάνει η κετοκοναζόλη.

Π Α Ρ Α Ρ Τ Η Μ Α Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ο Υ 4

1. Ποσοτική σύγκριση μεταξύ των φαρμακευτικών παρασκευασμάτων (εκχυλίσματα με τυρβώδη ροή-εγχύματα-αφεψήματα-φαρμακευτικά βάρματα)

Η συνήθης δοσολογία (Bettiol et al. 2009, Bettiol 2010, Firenzuoli 2009, Capasso et al. 2006) των φαρμακευτικών βαμμάτων (φ.β) είναι 5 mL, 2-3 φορές την ημέρα. Βάσει του πίνακα 64 για το *Rosmarinus officinalis* L. στα 5 mL φαρμακευτικού βάρματος με αναλογία δρόγη: διαλύτης (D: S)= 1: 10 w/v και διαλύτη αιθυλική αλκοόλη 70°, που έχει μόλις παρασκευαστεί, αντιστοιχούν σε σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου ίσο με 0,87 mg (τα 10 mL περιέχουν 1,74 mg διτερπενίων).

- i. η αντίστοιχη δόση (150 mL) με αφέψηση στα 15 min είναι $0,8 \times 2 = 1,6$ mg, στα 10 min είναι $0,68 \times 2 = 1,36$ mg, στα 5 min είναι $0,38 \times 2 = 0,76$ mg και στα 2 min είναι $0,3 \times 2 = 0,6$ mg. Φαίνεται λοιπόν ότι η πόση ενός ποτηριού 150 mL που περιέχει το αφέψημα των αποξηραμένων φύλλων *Rosmarinus officinalis* L. (2:150 w/v) στα:
 - α) 15 min αντιστοιχεί, κατά προσέγγιση, σε 9,2 mL φ.β
 - β) 10 min αντιστοιχεί περίπου σε 7,8 mL φ.β
 - γ) 5 min αντιστοιχεί περίπου σε 6,3 mL φ.β
 - δ) 2 min αντιστοιχεί περίπου σε 3,4 mL φ.β
- ii. η αντίστοιχη δόση (150 mL) με έγχυση στα 2 min είναι $0,25 \times 2 = 0,5$, στα 5 min είναι $0,32 \times 2 = 0,64$ mg, στα 10 min είναι $0,42 \times 2 = 0,84$ mg και στα 15 min είναι $0,39 \times 2 = 0,78$ mg. Φαίνεται λοιπόν ότι η πόση ενός ποτηριού 150 mL που περιέχει το έγχυμα των αποξηραμένων φύλλων *Rosmarinus officinalis* L. (2:150 w/v) στα:
 - α) 15 min αντιστοιχεί, κατά προσέγγιση, σε 4,5 mL φ.β
 - β) 10 min αντιστοιχεί περίπου σε 4,8 mL φ.β
 - γ) 5 min αντιστοιχεί περίπου σε 3,7 mL φ.β
 - δ) 2 min αντιστοιχεί περίπου σε 2,9 mL φ.β
- iii. η αντίστοιχη δόση με εκχύλιση με τυρβώδη ροή εν θερμώ (150 mL) *Rosmarinus officinalis* L. (2:150 w/v) περιέχει 1,68 mg διτερπενίων και αντιστοιχεί σε 9,6 mL φ.β

Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα, μια δόση φαρμακευτικού βάρματος θα μπορούσε κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να αντικατασταθεί από ένα έγχυμα ή αφέψημα, τουλάχιστον όσον αφορά τις εξεταζόμενες ουσίες.

Εμβαθύνοντας στην σύγκριση μεταξύ των εκχυλίσεων με τυρβώδη ροή, των εγχυμάτων και αφεψημάτων των *Rosmarinus officinalis* L. και *Salvia officinalis* L. και λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου μπορεί να αναφερθεί ότι:

- Ένα ποτήρι (150 mL) με εκχύλιση *Salvia officinalis* L. (δρόγη/διαλύτης=1,5/150 g/mL) παρασκευασμένο με τυρβώδη ροή εν θερμώ περιέχει 4,42 mg και αντιστοιχεί κατά προσέγγιση σε 2,6 ποτήρια *Rosmarinus officinalis* L. (δρόγη/διαλύτης=2/150 g/mL) αντίστοιχου εκχυλίσματος (1,68 mg)

- Ένα ποτήρι (150 mL) αφεψήματος *Salvia officinalis* L. των 5 min (δρόγη/διαλύτης=1,5/150 g/mL) περιέχει 5,1 mg και αντιστοιχεί κατά προσέγγιση σε 3 ποτήρια *Rosmarinus officinalis* L. (δρόγη/διαλύτης=2/150 g/mL) αφεψήματος των 15 min (1,6 mg)
- Ένα ποτήρι (150 mL) εγχύματος *Salvia officinalis* L. των 10 min (δρόγη/διαλύτης=1,5/150 g/mL) περιέχει 2,1 mg και αντιστοιχεί κατά προσέγγιση σε 1,5 ποτήρια *Rosmarinus officinalis* L. (δρόγη/διαλύτης=2/150 g/mL) αφεψήματος των 10 min (1,36 mg)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη φυτών της οικογένειας *Lamiaceae* ως προς την παραγωγή μεταβολιτών που αναστέλλουν τη δράση του υποδοχέα AhR, με εφαρμογή στις δερματικές παθήσεις

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να μελετηθεί η δραστικότητα συγκεκριμένων δευτερογενών μεταβολιτών, που προέρχονται από φυτά της οικογένειας των Χειλανθών, ως προς τον υποδοχέα των αρυλοϋδρογονανθράκων (AhR).

Η ενεργοποίηση του (AhR) από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, ιδιαίτερα δε από μικροβιακούς μεταβολίτες που βρίσκονται στο ανθρώπινο δέρμα, εμπλέκεται σε μια σειρά φλεγμονωδών δερματοπαθειών, όπως η σμηγματορροϊκή δερματίτιδα (SD), αλλά και στην ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος. Ως εκ τούτου, θα ήταν πολύ σημαντικό να εντοπιστούν φυσικές ενώσεις που θα μπορούσαν να αναστείλουν την ενεργοποίηση του AhR από προσδέματα μικροβιακής προέλευσης όπως η 6-φορμυλινδολο[3,2-b]καρβαζόλη (FICZ), η ιντιρουμπίνη (IND) και η πιτυριαζεπίνη (PZ) ή από το πρωτότυπο πρόσδεμα 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-*p*-διοξίνη (TCDD). Δεδομένα από ασθενείς έδειξαν ότι η τοπική εφαρμογή κρέμας που περιέχει ξηρό εκχύλισμα φύλλων *Rosmarinus officinalis* L. είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση της SD.

Συνεπώς παρασκευάστηκαν με συγκεκριμένη μέθοδο 5 εκχυλίσματα *Rosmarinus officinalis* L. που διέφεραν μεταξύ τους ως προς το διαλύτη ή το χρόνο εμβροχής. Τα εν λόγω εκχυλίσματα αναλύθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά με την μέθοδο της φασματοσκοπίας ¹H-NMR και ύστερα ελέγχθηκαν *in vitro*, σε κύτταρα ινδικού χοιριδίου, σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος (HG2L7.5c1) και σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (SK 28), ως προς την συμπεριφορά τους έναντι του AhR, απουσίας και παρουσίας της TCDD (2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-*p*-α-διοξίνη) ή των παραγόμενων ουσιών από την *Malassezia* (FICZ, IND, PZ). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι:

- όλα τα εκχυλίσματα του *Rosmarinus officinalis* L. που ερευνήθηκαν:
 - i. δεν εμφάνισαν αγωνιστική δράση
 - ii. ήταν σε θέση να ανταγωνίζονται τη δράση της TCDD στον AhR, με το μεθανολικό εκχύλισμα των 7 ημερών εμβροχής [ROS-7d] να εμφανίζει την μεγαλύτερη δραστικότητα.
 - iii. ο ανταγωνισμός ήταν συναγωνιστικού τύπου.
- το εκχύλισμα [ROS-7d] (10 μg/mL) έδειξε *in vitro* σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα ότι ανταγωνίζεται την δράση των TCDD, FICZ, PZ και IND στον AhR κατά 97,65%, 44,96%, 82,09% και 90,09% αντίστοιχα.

Στην πορεία λήφθηκαν σε καθαρή μορφή τα βασικά δραστικά συστατικά του μεθανολικού εκχυλίσματος [ROS-7d], ήτοι το καρνοσικό οξύ (CA), η καρνοσόλη (CS), η 7-Ο-μεθυλ-*epi*-ροομανόλη (7MER), η 4',7-Ο-διμεθυλαπιγενίνη (DMA) και το

μπετουλινικό οξύ (BA). Κατόπιν οι απομονωμένες ουσίες ελέγχθηκαν αν είναι σε θέση να ανταγωνίζονται τη δράση της TCDD στον AhR. Το πείραμα που ακολούθησε έδειξε ότι οι μεταβολίτες CA, CS, BA, DMA και 7MER (100 μM έκαστο), μείωσαν τη δράση της TCDD κατά 81,93%, 78,41%, 82,96%, 70,18% και 66,59% αντίστοιχα. Στο ίδιο πείραμα το [ROS-7d] προκάλεσε μείωση της τάξης του 101,07%.

Το ότι βρέθηκαν παράγοντες που συμπεριφέρονται ως ανταγωνιστές του AhR είναι κάτι πολύ σημαντικό γιατί μπορεί να βρει εφαρμογή στην πρόληψη της τοξικότητας των διοξινών ή στην αντιμετώπιση της εγκατεστημένης τοξικότητας τους, όπως για π.χ. συμβαίνει στην περίπτωση της χλωρακμής, στην πρόληψη-θεραπεία διάφορων μορφών του καρκίνου του δέρματος και των φλεγμονωδών δερματοπαθειών.

Κατόπιν ερευνήθηκαν ποσοτικά και ποιοτικά με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας $^1\text{H-qNMR}$, ως προς τους μεταβολίτες CA, CS, 7MER, BA, DMA, ροσμανόλη (RO, απομονωμένη από *Rosmarinus officinalis* L. και *Salvia fruticosa* Mill.) και 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ (12MCA, απομονωμένο από *Rosmarinus officinalis* L. και *Salvia microphylla* Kunth) τα μεθανολικά εκχυλίσματα 61 φυτών που φύονται-καλλιεργούνται στην Ελλάδα της οικογένειας των Χειλανθών από τα ακόλουθα γένη: *Ballota*, *Hyssopus*, *Lavandula*, *Marrubium*, *Nepeta*, *Phlomis*, *Ocimum*, *Origanum*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Stachys*, *Coridothymus*, *Mentha*, *Melissa*, *Sideritis*, *Satureja*, *Teucrium*, *Lamium* και *Betonica*, με το σκεπτικό μήπως κάποιο άλλο φυτό αποτελεί καλύτερη πηγή για μία ή για μερικές ή για όλες τις προαναφερόμενες ουσίες. Ως δρόγη χρησιμοποιήθηκαν τα αποξηραμένα φύλλα του εκάστοτε βοτάνου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τουλάχιστον μία από τις εξεταζόμενες ενώσεις ανιχνεύθηκε σε 23 είδη (*Rosmarinus* (2), *Salvia* (14), *Melissa*, *Ocimum*, *Mentha* (2) *Lavandula* (3)). Η 7MER και η RO δεν ταυτοποιήθηκε σε κανένα εκχύλισμα, ενώ το CA, η CS και το 12MCA, ανιχνεύθηκαν όλα μαζί ταυτοχρόνως μόνο σε είδη των γενών *Salvia* (7) και *Rosmarinus* (2). Η μεγαλύτερη ποσότητα CA βρέθηκε στη *Salvia somalensis* Vatke (32,15±0,93 mg/g αποξηραμένης δρόγης) > *Salvia pomifera* subsp. *pomifera* L. (21,64±0,6 mg/g α.δ) > *Salvia fruticosa* Mill. (12,5±1,56 mg/g α.δ) > *Salvia officinalis* L. (11,66±4,33 mg/g α.δ), της CS στη *Salvia somalensis* Vatke (4,24±0,04 mg/g α.δ) > *Salvia fruticosa* Mill. (1,57±0,38 mg/g α.δ) > *Salvia officinalis* L. (1,11±0,43 mg/g α.δ) > *Salvia canariensis* L. (1,13±0,32 mg/g α.δ), του 12MCA στη *Salvia microphylla* Kunth (10,68±3,27 mg/g α.δ) > *S. officinalis* (6,12±2,3 mg/g α.δ) > *Salvia fruticosa* Mill. (3,05±0,29 mg/g α.δ) > *Rosmarinus officinalis* L. (2,03±0,66 α.δ), της DMA στο *Rosmarinus officinalis* L. (0,41±0,1 mg/g α.δ) > *Salvia viscosa* Jacq. (0,33±0,05 mg/g α.δ) > *Rosmarinus officinalis* var. *prostratus* Pasq. (0,12±0,02 mg/g α.δ), του BA στο *Rosmarinus officinalis* L. (7,55±1,06 mg/g α.δ) > *Rosmarinus officinalis* var. *prostratus* Pasq. (3,88±0,04 mg/g α.δ). Τα γένη *Salvia* και *Rosmarinus* ήταν οι καλύτερες πηγές για το CA, την CS και το 12MCA. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η φασματοσκοπία $^1\text{H-qNMR}$ προσφέρει ένα χρήσιμο εργαλείο για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των εξεταζόμενων ενώσεων σε σύνθετα εκχυλίσματα, με απλό, γρήγορο και άμεσο τρόπο χωρίς την αλλοίωση του δείγματος.

Θέλοντας να δώσουμε μια πιο πρακτική διάσταση στο όλο θέμα σχεδιάστηκε μια σειρά πειραμάτων με εγχύματα, αφεψήματα, εκχυλίσματα με τυρβώδη ροή,

ελαιόλυτα, φαρμακευτικά βάμματα και οινόλυτα, που αφορούσαν τα φυτά που παρουσίαζαν την μεγαλύτερη περιεκτικότητα στους εν λόγω μεταβολίτες αλλά και που κατείχαν την πιο ευρεία αναγνωρισιμότητα-διάδοση παγκοσμίως. Επιλέχθηκαν λοιπόν η *Salvia fruticosa* Mill., η *Salvia officinalis* L. και το *Rosmarinus officinalis* L. Ο απώτερος σκοπός ήταν να ανακαλυφθεί μια φαρμακοτεχνική μορφή είναι η πιο κατάλληλη, μια μέθοδος παρασκευής είναι η καλύτερη όσον αφορά τις εξεταζόμενες ουσίες, (π.χ. για ένα συγκεκριμένο φυτό είναι αποδοτικότερο να το χρησιμοποιούμε ως αφέψημα ή ως έγχυμα; ή για πόσο χρόνο πρέπει να μείνει σε επαφή η δρόγη με τον διαλύτη; ή μια είναι η βέλτιστη αναλογία δρόγης/ διαλύτη; επίσης, σε ποια περίπτωση έχουμε κυρίαρχη ουσία τον ένα ή τον άλλο μεταβολίτη κάτι που είναι επίσης πολύ σημαντικό) δίνοντας με αυτό τον τρόπο για πρώτη φορά απαντήσεις με μαθηματική πλέον ακρίβεια σε βασικά και χρόνια ερωτήματα που αφορούν τις δρόγες που ερευνήθηκαν. Σύμφωνα με αποτελέσματα, για τα 3 εξεταζόμενα φυτά η μέθοδος της αφέψησης ήταν αποδοτικότερη από την έγχυση ενώ η εκχύλιση με τυρβώδη ροή εν θερμώ ήταν εφάμιλλη της αφέψησης. Επίσης διαπιστώθηκε ότι το φαρμακευτικό βάμμα δεν είναι κατάλληλη φαρμακευτική μορφή για τα διτερπένια αβιτανίου λόγω της αστάθειας που παρουσιάζουν οι ουσίες αυτές σε υδατοαλκοολικό διαλύτη 45° και 70°. Επιπλέον ερευνήθηκαν τα ελαιόλυτα του *Rosmarinus officinalis* L. στα οποία αποδείχθηκε ότι οι μεταβολίτες CA, CS, 12MCA, BA και DMA διαλύονται στο έξτρα παρθένο ελαιόλαδο και, ιδιαίτερα σημαντικό για τα διτερπένια αβιτανίου, παραμένουν σταθεροί στο μέσο αυτό. Στο οινόλυτο του *Rosmarinus officinalis* L., που παρασκευάστηκε με τη μέθοδο που εισήγαγε ο Διοσκουρίδης, ταυτοποιήθηκε το ροσμαρινικό οξύ (το οποίο απομονώθηκε από τα φύλλα του εν λόγω φυτού). Τέλος, δόθηκαν παραδείγματα ποσοτικής αντιστοιχίας μεταξύ των φαρμακευτικών μορφών που ερευνήθηκαν. Η ανάλυση όλων των δειγμάτων έγινε με ¹H-qNMR.

Μια πολυπαραγοντική νόσος, θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί καλύτερα με ένα πολυπαραγοντικό φάρμακο παρά με ένα φάρμακο που έχει μεγάλη εξειδίκευση για έναν μόνο μοριακό στόχο. Ένα φυσικό προϊόν μπορεί να δράσει με πλειοτροπικό τρόπο, αντιπροσωπεύοντας μια καλή πολυπαραγοντική θεραπεία. Επιπλέον, ένα φυσικό προϊόν θα μπορούσε να «σεβαστεί» καλύτερα την ομοιότητα του οργανισμού και να είναι λιγότερο τοξικό ή εντελώς μη τοξικό.

Παναγιώτης Καλλιμάνης
Φαρμακοποιός
M.Sc Κλινικής Φαρμακευτικής

S U M M A R Y

Study of plants of the Lamiaceae family for the production of metabolites that inhibit the action of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR), with application to skin diseases

The purpose of this thesis was to study the behavior of specific secondary metabolites, derived from plants of the Labiatae family, with respect to the aromatic hydrocarbon receptor (AhR).

AhR activation by various environmental factors, especially microbial metabolites found in human skin, is involved in a number of inflammatory skin diseases such as seborrheic dermatitis (SD), but also in the development of skin cancer. Therefore, it would be very important to identify natural compounds that could inhibit AhR activation by microbial ligands such as 6-formylindole [3,2-b] carbazole (FICZ), indirubin (IND) and pityriazepine (PZ) or the original 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) ligand. Patient data have shown that topical application of a cream containing dry *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract is effective in treating SD.

Therefore, 5 extracts of *Rosmarinus officinalis* L., which differed from each other in terms of solvent or time of extraction, were prepared by a specific method. These extracts were first analyzed qualitatively and quantitatively by ¹H-qNMR spectroscopy and then tested *in vitro* on guinea pig cytosol, human hepatoma cells (HG2L7.5c1) and human keratinocytes (SIK) regarding their behavior against the AhR, in the absence and presence of TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin) or of *Malassezia*-derived substances (FICZ, IND and PZ). The results showed that:

- all extracts of *Rosmarinus officinalis* L. investigated:
 - i. did not show agonistic action
 - ii. were able to antagonize the action of TCDD on AhR, with the methanolic extract (7-days of maceration) [ROS-7d] exhibiting the greatest activity.
 - iii. the competition was competitive
- [ROS-7d] extract (10 µg/mL) in human keratinocytes antagonizes the activity of TCDD, FICZ, PZ and IND in AhR by 97,65%, 44,96%, 82,09% and 90,09% respectively.

During the process, the main active ingredients of the methanolic extract [ROS-7d], namely carnosic acid (CA), carnosol (CS), 7-O-methyl-*epi*-rosmanol (7MER), 4',7'-O-dimethylapigenine (DMA) and betulinic acid (BA) were isolated by innovative procedures. The metabolites were then tested for their ability to antagonize TCDD activity in AhR. The following experiment *in vitro* on guinea pig cytosol showed that CA, CS, BA, DMA and 7MER (100 µM each) reduced the activity of TCDD by 81,93%, 78,41%, 82,96%, 70,18% and 66,59% respectively. In the same experiment [ROS-7d] caused a decrease of 101,07%.

The fact that has been found agents that act as competitors of AhR were found is very important because it can be used to prevent the toxicity of dioxins or to treat their

established toxicity, as is the case of chloracne for example, in the prevention and treatment of various forms of skin cancer and inflammatory skin diseases.

The methanolic extracts of 61 plants grown in Greece of the Labiatae family from the following genera: *Ballota*, *Hyssopus*, *Lavandula*, *Marrubium*, *Nepeta*, *Phlomis*, *Ocimum*, *Origanum*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Stachys*, *Coridothymus*, *Mentha*, *Melissa*, *Teiderium*, *Satureium*, and *Betonica*, were analyzed quantitatively and qualitatively by ^1H -qNMR spectroscopy, regarding the metabolites CA, CS, 7MER, BA, DMA, rosmanol (RO, was isolated from *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Mill.) and 12-O-methylcarnosic acid (12MCA, was isolated from *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia microphylla* Kunth), on the grounds that same another plant might be a better source for one or more or even all of the above substances. The dried leaves of each herb were used as a drug.

The results showed that at least one of the test compounds was detected in 23 species (*Rosmarinus* (2), *Salvia* (14), *Melissa*, *Ocimum*, *Mentha* (2) *Lavandula* (3)). 7MER and RO were not identified in any extracts, while CA, CS and 12MCA were all detected simultaneously in species of the genera *Salvia* (7) and *Rosmarinus* (2). The highest amount of CA was found in *Salvia somalensis* Vatke (32,15±0,93 mg/g of dried drug)> *Salvia pomifera* subsp. *pomifera* (21,64±0,6 mg/g d.d.)> *Salvia fruticosa* Mill. (12,50±1,56 mg/g d.d.)> *Salvia officinalis* L. (11,66±4,33 mg/g d.d.), of CS in *Salvia somalensis* Vatke (4,24±0,04 mg/g d.d.)> *Salvia fruticosa* Mill. (1,57±0,38 mg/g d.d.)> *Salvia officinalis* L. (1,11±0,43 mg/g d.d.)> *Salvia canariensis* L. (1,13±0,32 mg/g d.d.), of 12MCA in *Salvia microphylla* Kunth (10,68±3,27 mg/g d.d.)> *Salvia officinalis* L. (6,12±2,3 mg/g d.d.)> *Salvia fruticosa* Mill. (3,05±0,29 mg/g d.d.)> *Rosmarinus officinalis* L. (2,03±0,66 a.d.), of DMA in *Rosmarinus officinalis* L. (0,41±0,1 mg/g d.d.)> *Salvia viscosa* Jacq. (0,33±0,05 mg/g d.d.)> *Rosmarinus officinalis* var. *prostratus* Pasq. (0,12±0,02 mg/g d.d.), of BA in *Rosmarinus officinalis* L. (7,55±1,06 mg/g d.d.)> *Rosmarinus officinalis* var. *prostratus* Pasq. (3,88±0,04 mg/g d.d.). The genera *Salvia* and *Rosmarinus* were the best sources for CA, CS and 12MCA. Moreover, it was shown that the ^1H -qNMR spectroscopy provides a useful tool for the quantitative and qualitative analysis of test compounds in complex extracts, in a simple, fast and direct way without any alteration of the sample.

In order to give a more practical dimension to the whole issue, a series of experiments were designed regarding infusions, decoctions, turbolent-extractions, extracts in olive oil, medicinal tinctures and extracts in wine which concerned the plants that had the highest content of these metabolites but also possessed the widest recognition-dissemination worldwide. The *Salvia fruticosa* Mill., *Salvia officinalis* L. and *Rosmarinus officinalis* L. were therefore selected. The aim was to discover which formulation is the most suitable for a particular plant, for example whether it is more efficient to use it as a decoction or as an infusion; or for how long the drug should stay in contact with the solvent; or what is the optimal drug/solvent ratio is? also, in which case one or the other metabolite is dominant substance one or the other metabolite (which is also very important), thus giving for the first time answers with mathematical precision to basic and chronic questions concerning the investigated formulation. According to results, for the 3 plants examined the method of decoction

was more efficient than the infusion and that extraction with turbulent flow was almost equal to decoction. It was also found that the tincture is not a suitable formulation for the abietanic diterpenes due to the instability of these substances in hydroalcoholic solvent, 45° and 70°. In addition, the olive oil extract of *Rosmarinus officinalis* L. was investigated and showed that the metabolites CA, CS, 12MCA, BA and DMA dissolve in the extra virgin olive oil and remain stable in this medium, which is particularly important for abietanic diterpenes. In the wine extract of *Rosmarinus officinalis* L., prepared by the method introduced by Dioscorides, rosmarinic acid (RA) was identified (standard RA has been isolated from *Rosmarinus officinalis* L.). Finally, examples of quantitative correlation were given between the formulations investigated. All samples were analyzed by ¹H-qNMR.

A multifactorial disease could be treated better with a multifactorial remedy than with a drug having big specificity about one single molecular target. A natural product can act in a pleiotropic way, representing a good multifactorial remedy. Moreover, a natural product could “respect” better the organism’s homeostasis thus being less toxic or totally non-toxic.

*Panagiotis Kallimanis
Pharmacist
M.Sc in Clinical Pharmacy*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abad M, Moreno A, Palacios A, et al., (2011). The tumor suppressor ING1 contributes to epigenetic control of cellular senescence. *Aging Cell*. 10:158-171.
- Abad NAA, Nouri MHK, Tavakkoli F, (2011). Effect of *Salvia officinalis* hydroalcoholic extract on vincristine-induced neuropathy in mice. *Chin J Nat Med*. 9:354-358.
- Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H, (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: the role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*. 35 (1): 177-183.
- Abreu, M.E, Müller M, Alegre L, et al., (2008). Phenolic diterpene and α -tocopherol contents in leaf extracts of 60 *Salvia* species. *J. Sci. Food Agric.*, 88: 2648-2653.
- Abu-Dahab R, Abdallah MR, Kasabri V, et al., (2014). Mechanistic studies of antiproliferative effects of *Salvia triloba* and *Salvia dominica* (Lamiaceae) on breast cancer cell lines (MCF7 and T47D). *Z Naturforsch C*. 69 (11-12): 443-51.
- Abu-Dahab R, Afifi F, Kasabri V., (2012). Comparison of the antiproliferative activity of crude ethanol extracts of nine *salvia* species grown in Jordan against breast cancer cell line models. *Pharmacogn Mag*. 8 (32): 319-24.
- Adachi J, Mori Y, Matsui S, et al., (2001). Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem*. 276:31475-8.
- Adsersen A, Gauguin B, L. Gudiksen L, et al., (2006). Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol* 104 (3): 418-422.
- Afonso MS, de O Silva AM, Carvalho EB, et al., (2013). Phenolic compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Nutri Metabol*. 10 (1):19.
- Aguilar F, Autrup H, Barlow S, et al., (2008). Use of rosemary extracts as a food additive – scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food. *EFSA J*. 721. 1-29.
- Ahmed A, El-Hamd A, Mohamed H, et al., (2006). Salvidorol, a nor-abietane diterpene with a rare carbon skeleton and two abietane diterpene derivatives from *Salvia dorrii*. *Phytochemistry* 67: 424-428.
- Ahmed HH, Salem AM, Sabry GM, et al., (2013). Possible therapeutic uses of *Salvia triloba* and *Piper nigrum* in Alzheimer's disease-induced rats. *J Med Food*. 16 (5): 437-46.
- Akalın E, Alpınar K, (1994). An investigation on medicinal and edible wild plants of Tekirdag. *Journal of Faculty of Pharmacy Ege University* 2 (1), 1-11.
- Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, et al., (2003). *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *J Clin Pharm Ther*. 28:53-59.
- Akkawi R, Valente AL, Badawy SZ, (2012). Large mesonephric cyst with acute adnexal torsion in a teenage girl. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 25:143-145.
- Akoury E, (2017). Isolation and structural elucidation of rosmarinic acid by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *American Research Journal of Chemistry*, 2(1):17-23.
- Al-Bakri AG, Othman G, Afifi FU, (2010). Determination of the antibiofilm, antiadhesive, and anti-MRSA activities of seven *Salvia* species. *Pharmacogn Mag*. 6 (24): 264-70,
- Al-Hamood MH, Elbetieha A, Alkofahi A, et al., (1998). Reproductive toxicity potentials of *Salvia fruticosa* (Labiatae) in rats. *J Ethnopharmacol*. 61 (1): 67-74.

- Ali-Shtayeh MS, Abu Ghdeib SI, (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*. 42 (11-12): 665-72.
- Ali-Shtayeh MS, Jamous RM, Jamous RM, (2012). Complementary and alternative medicine use amongst Palestinian diabetic patients. *Complement Ther Clin Pract*. 18 (1):16-21.
- Ali-Shtayeh MS, Yaniv Z, Mahajna J, (2000). Ethnobotanical survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 73 (1-2): 221-32.
- Al-Kalaldeh JZ, Abu-Dahab R, Afifi FU, (2010). Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. *Nutr Res*.30 (4): 271-8.
- Alkan FU, Gürsel FE, Ateş A, (2012). Protective effects of *Salvia officinalis* extract against cyclophosphamide-induced genotoxicity and oxidative stress in rats. *Turk J Vet Anim Sci*. 36:646–654.
- Al-Mustafa AH, Al-Thunibat OY, (2008). Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. *Pakist J Biol Sci*. 11 (3): 351-8.
- Al-Sereitia, MR, Abu-Amerb KM, Sena P, (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol* 37. 124-131.
- Altay A, Bozoğlu F, (2017). *Salvia fruticosa* Modulates mRNA Expressions and Activity Levels of Xenobiotic Metabolizing CYP1A2, CYP2E1, NQO1, GPx, and GST Enzymes in Human Colorectal Adenocarcinoma HT-29 Cells. *Nutr Cancer*. 69 (6): 892-903.
- Altinier G, Sosa S, Aquino RP, et al., (2007). Characterization of topical anti-inflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *J Agricult Food Chemi*. 55. 1718-1723.
- Alziar G, *Synonymique des Salvia du Monde* (1989) (*World Catalogue of Salvia Synonyms*, 1989) Amaral GP, Carvalho NR, Barcelos RP, et al., (2013). Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. *An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association Food and Chemical Toxicology*. 55. 48-55.
- Amakura Y, Yoshimura Y, Takaoka M, et al., (2014). Characterization of Natural Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists from Cassia Seed and Rosemary. *Molecules* 19. 4956-4966.
- Amaro-Luis JM, (1997). Abietane diterpenoids from *Salvia rubescens* ssp. *truxillensis*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 72: 233-238.
- Ambrose D, Manickavasagan A, Naik R, (2016). *Leafy Medicinal Herbs*. CABI, London.
- Amots D, Lev E, Sabine Beckmann S, et al., (2006). Ritual plants of Muslim graveyards in northern Israel. *J Ethnobiolo Ethnomed* 2(1):38.
- Anadón A, Martínez MA, Ares I, et al., (2013). Acute and repeated dose (28 days) oral safety studies of ALIBIRD in rats. *J Food Prot*. 76 (7):1226-39.
- Andrade JM, Faustino C, Garcia C, et al., (2018). *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Sci OA*. 1.4 (4).
- Anwar MA, Samaha AA, Ballan S, et al., (2017). *Salvia fruticosa* Induces Vasorelaxation In Rat Isolated Thoracic Aorta: Role of the PI3K/Akt/eNOS/NO/cGMP Signaling Pathway. *Sci Rep*. 7 (1): 686.
- Arnold N, Valentin G, Bellomaria, B, et al., (1997). Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan and *Fourr.* from Algeria and *R. officinalis* L. from other countries. *JEOR*. 9: 167-175.
- Arranz E, Mes J, Wichers HJ, et al., (2015). Anti-inflammatory activity of the basolateral fraction of Caco-2 cells exposed to a rosemary supercritical extract. *Journal of Functional Foods*. 13: 384-390,
- Aruoma O, Halliwell B, Aeschbach R, et al., (1992). Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, 22: 257-268.

- Aruoma OI., Spencer JPE, Rossi R, et al., (1996). An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provençal herbs. *Food Chem Tox.* 34: 449-456.
- Aslan A, Mat A, Ozhatay N, et al, (2007). A contribution to traditional medicine in West Anatolia. *Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University* 39. 73-83.
- Asokkumar K, Sen S, Umamaheswari M, et al., (2014). Synergistic effect of the combination of gallic acid and famotidine in protection of rat gastric mucosa. *Pharmacol Repts.* 66: 594-599.
- Ateya A, Abou-Hashem M, Dora G, et al., (2017). Phytochemical investigation and cytotoxic activity of *Rosmarinus officinalis* L. Fam. Labiateae. *IJPPR*, 9 (12): 1446-1451.
- Atmaca H, Bozkurt E, (2016). Apoptotic and anti-angiogenic effects of *Salvia triloba* extract in prostate cancer cell lines. *Tumour Biol.* 37 (3): 3639-3646.
- Aydogmus Z, Yesilyurt V, Topcu G, (2006). Constituents of *Salvia microphylla*. *Nat Prod Res*, 20, 8 (10): 775-781.
- Aylward LL, Brunet RC, Carrier G, et al., (2005). Concentration-dependent TCDD elimination kinetics in humans: toxicokinetic modeling for moderately to highly exposed adults from Seveso, Italy, and Vienna, Austria, and impact on dose estimates for the NIOSH cohort. *J Exp Anal Environ Epidemiol.* 15:51-65.
- Azeredo GA, Stamford TLM, Nunes PC, et al., (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Res Intern.* 44 (5): 1541-1548.
- Azevedo MF., Lima CF., Fernandes-Ferreira M., et al., (2011). Rosmarinic acid, major phenolic constituent of Greek sage herbal tea, modulates rat intestinal SGLT1 levels with effects on blood glucose. *Mol Nutr Food Res.* 55 Suppl 1: S15-25.
- Azevedo MI, Pereira AF, Nogueira RB, (2013). The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Mol Pain.* 9:53.
- Aziz MH, Reagan-Shaw S, Wu J, et al., (2005). Chemoprevention of skin cancer by grape constituent resveratrol: relevance to human disease? *FASEB J* 19(9):1193-1195.
- Babovic N, Djilas S, Jadranin M, et al., (2010). Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity. *Innov Food Sci Emerg Technol* 11: 98-107.
- Badiee P, Nasirzadeh AR, Motaffaf M, (2012). Comparison of *Salvia officinalis* L. essential oil and antifungal agents against *candida* species. *J Pharm Technol Drug Res.* 1:7.
- Bai N, He K, Roller M, et al., (2010). Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.* 58 (9):5363-5367.
- Bakirel T, Bakirel U, Keleş OU, et al., (2008). *In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 116(1) :64-73.
- Barberini S, Di Silvestro D, Fedi S, et al., (2012). Contamination during micropropagation: analysis of the bacterial lines and treatment with sage extract. *Acta Hort.* 961: 81-88.
- Baricevic D, Sosa S, Della Loggia R, (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *J Ethnopharmacol.* 75:125-132.
- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD, (2007). *Herbal Medicines: A Guide for Healthcare Professionals.* 3rd ed. Pharmaceutical Press London, Chicago.
- Barouti N, Fontao L, Pardo B, et al., (2009). AhR pathway as a novel pharmacological target for wound healing. *J Invest Dermatol.* 129: S80 (Abstr.)
- Barreto HM, Silva Filho EC, Lima EDO, et al., (2014). Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Industr Crops Prods.* 59: 290-294.

- Baser K., Honda G., Miki W., (1986). Herb drugs and herbalists in Turkey. Institute for the study of languages and cultures of Asia and Africa. Tokyo: Institute for the Study of Languages and Cultures of Asia and Africa, 1986.
- Bassil M. Daher CF, Mroueh M. et al., (2015). *Salvia libanotica* improves glycemia and serum lipid profile in rats fed a high fat diet. BMC Complement Altern Med. 15: 384.
- Bayrak A., Akgul A., (1987). Composition of Essential Oils from Turkish *Salvia* Species. Phytochemistry, 26: 846-847.
- Begum A, Sandhya S, Shaffath Ali S, et al., (2013). An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 12 (1):61-73.
- Behradmanesh S, Derees F, Rafieian-Kopaei M, (2013). Effect of *Salvia officinalis* on diabetic patients. J Renal Inj Prev. 2(2):51-4.
- Bellomaria B., Arnold N., Valentini G., et al., (1992). Contribution to the Study of the Essential Oils from Three Species of *Salvia* Growing Wild in the Eastern Mediterranean Region. J. Essent. Oil Res., 4. 607-614.
- Benci J, Xu L, Qiu B, et al., (2016). Tumor interferon signaling regulates a multigenic resistance program to immune checkpoint blockade. Cell, 167(6), 1540-1554.
- Bendif H, Miara MD, Peron G, et al., (2017). NMR, HS-SPME-GC/MS, and HPLC/MSn analyses of phytoconstituents and aroma profile of *Rosmarinus eriocalyx*. Chem. Biodiversity 14.
- Benedum J, Loew D, Schilcher H, (2006). *Salviae trilobae folium* (Greek sage leaves). In Medicinal Plants in Traditional Medicine. 4th ed. *Kooperation Phytopharmaka*, Bonn, p. 322.
- Benincá JP, Dalmarco JB, Pizzolatti MG, et al., (2011). Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. Food Chem. 124 (2):468-475.
- Beretta G, Artali R, Facino RM, et al., (2011). An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: the case of *Rosmarinus officinalis* L. J. Pharm. Biomed. Anal. 55 (5):1255-1264.
- Bertolotto C, (2013). Melanoma: From melanocyte to genetic alterations and clinical options. Scientifica. 2013:635203.
- Bettiol F, Vincieri FF, (2009). Manuale delle preparazioni erboristiche. Edizioni: Tecniche Nuove.
- Bettiol F, (2010). Manuale delle preparazioni galeniche. Tecniche Nuove.
- Bisset NG, Wichtl M. 2nd ed. CRC Press; Boca Raton, FL, (2001). Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis with Reference to German Commission E Monographs; pp. 440-443.
- Blank JA, Tucker AN, Sweatlock J, et al., (1987). alpha-Naphthoflavone antagonism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced murine lymphocyte ethoxyresorufin-O-deethylase activity and immunosuppression. Mol Pharmacol, 32 (1) 169-172.
- Blumenthal M et al., (1998). The Complete German Commission E monographs. Therapeutic guide to herbal medicines. Austin, TX, American Botanical Council.
- Bobev SG, Margina AF, Gruyter J, (2002). First Report of *Phoma Strasserii* as a Pathogen of *Stachys Officinalis* in Bulgaria. Plant Dis., 86 (6): 699.
- Bodsgard BR, Lien NR, Waulters QT, (2016). Liquid CO₂ extraction and NMR characterization of anethole from fennel seed: a general chemistry laboratory. J Chem Educ., 93: 397-400,
- Böhme H, Bracher F, Heisig P, (2010). Dreilappiger Salbei. In: Kommentar zum europäischen Arzneibuch. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2010,
- Bommer S, Klein P, Suter A, (2011). First time proof of sage's tolerability and efficacy in menopausal women with hot flushes. Adv Ther. 28(6):490-500,
- Borrás-Linares I, Stojanović Z, Quirantes-Piné R, (2014). *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. Int. J. Mol. Sci. 15. 20585-20606.

- Boukhary R, Raafat K, Ghoneim AI, et al., (2016). Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of *Salvia fruticosa*: An HPLC Determination of Phenolic Contents. E- Based Compl Altern Med.: 7178105.
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, et al., (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. J Agric Food Chem. 55:7879–7885.
- Bradley P, (2006). Rosemary leaf. British Herbal Compendium, a handbook of scientific information on widely used plant drugs. Companion to the British Herbal Pharmacopoeia. Vol 2. Bournemouth, 333-338.
- Bradley P, (2006). Sage Leaf. British Herbal Compendium, a handbook of scientific information on widely used plant drugs. Companion to the British Herbal Pharmacopoeia. Vol 2. Bournemouth, 339-344.
- Brieskorn CH, Domling HJ, (1969). Natürliche und synthetische derivate der carnosolsäure. Arch Pharm 302:641–6499.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foodsea review. Int J Food Microbiol. 94 (3):223-253.
- Capasso F, Grandolini G, Izzo AA, (2006). Fitoterapia: Impiego razionale delle droghe vegetali. Edizioni: Springer.
- Carta C, Moretti MDL, Peana AT, (1996). Activity of the oil of *Salvia officinalis* L. against *Botrytis cinerea*. J Essent Oil Res. 8:399–404.
- Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, et al., (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chem. 100(2): 553-559.
- Ceres, 1984. The Healing Power of Herbal Teas. Thorsons Publishers, ISBN 0-72251578-8.
- Chae IG, Yu MH, Im N-K, et al. (2012). Effect of *Rosmarinus officinalis* L. on MMP-9, MCP-1 levels, and cell migration in RAW 264.7 and smooth muscle cells. J. Med. Food. 15 (10):879–886.
- Chahal HS, Lin Y, Ransohoff KJ, et al., (2016). Genome-wide association study identifies novel susceptibility loci for cutaneous squamous cell carcinoma. Nat Commun. 7:12048.
- Chandler. Rosemary. Clinical Edge, 1985. 40-53.
- Chang JT, Chang H, Chen PH, et al., (2007). Requirement of aryl hydrocarbon receptor overexpression for CYP1B1 up-regulation and cell growth in human lung adenocarcinomas. Clin Cancer Res. 13(1):38–45.
- Charisiadis P, Tsiafoulis C, Exarchou V, et al., (2012). Rapid and direct low micromolar NMR method for the simultaneous detection of hydrogen peroxide and phenolics in plant extracts. J. Agric. Food Chem., 60: 4508-4513.
- Chen C, Chen HL, Hsieh, et al., (2011). Upregulation of NF-E2-related factor-2-dependent glutathione by carnosol provokes a cytoprotective response and enhances cell survival. Acta Pharmacol. Sin 32. 62–69.
- Chen JH, Ho CT, (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. J. Agric. Food Chem. 45: 2374–2378.
- Cheong J, Sun L, (2018). Targeting the IDO1/TDO2-KYN–AhR Pathway for Cancer Immunotherapy – Challenges and Opportunities. Trends Pharmacol Sci, Vol. 39. No. 3.

- Chipault JR, Mizuno GR, Hawkins JM, et al., (1952). The antioxidant properties of natural spices. *Food Res.*, 17: 46-55.
- Chovanová R., Mezovská J., Vaverková Š., et al., (2015). The inhibition the Tet(K) efflux pump of tetracycline resistant *Staphylococcus epidermidis* by essential oils from three *Salvia* species. *Lett Appl Microbiol.* 61 (1): 58-62.
- Christensen KB, Jørgensen M, Kotowska D, (2010). Activation of the nuclear receptor PPAR γ by metabolites isolated from sage (*Salvia officinalis* L) *J Ethnopharmacol.* 132:127-133.
- Chunhong J, (2013) CN patent, 103083304.
- Cieřla L, Staszek D, Hajnos M, et al., (2011). Development of chromatographic and free radical scavenging activity fingerprints by thin-layer chromatography for selected *Salvia* species. *Phytochem Anal.* 22(1):59-65.
- Cieřla L, Staszek D, Kowalska T, et al., (2013). The use of TLC-DPPH* test with image processing to study direct antioxidant activity of phenolic acid fractions of selected Lamiaceae family species. *J AOAC Int.* 96 (6): 1228-32.
- Clebsch B, Barner CD, (2003). *The New Book of Salvias.* Timber Press. pp. 125-127.
- Cole P, Trichopoulos D, Pastides H, et al., (2003). Dioxin and cancer: a critical review. *Regul Toxicol Pharmacol* 38: 378-388.
- Corre S, Tardif N, Mouchet N, et al., (2018). Sustained activation of the Aryl hydrocarbon Receptor transcription factor promotes resistance to BRAF-inhibitors in melanoma. *Nat Commun.* 9(1):4775.
- Cui L, Kim MO, Seo JH, et al., (2012). Abietane diterpenoids of *Rosmarinus officinalis* and their diacylglycerol acyltransferase inhibitory activity. *Food Chemistry.* 132 (4): 1775-1780,
- Culpeper N, (1992). *Culpeper's Complete Herbal.* London. Bloomsbury Books.
- Cuvelier E, Richard H, Berset C, (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J Am Oil Chem Soc* 73: 645-652.
- Cuvelier ME, Berset C, Richard H, (1994). Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *J Agric Food Chem* 42:665-669.
- Dapkevicius A, Venskutonis R, Beek T, et al., (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J Sci Food Agricult* 77.140-146.
- De Falco B, Lanzotti V, (2018). NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics analysis of *Salvia*. *Phytochem Rev,* 17: 951-972.
- De Oliveira PF, Munari CC, Nicolella HD, (2016). Manoool, a *Salvia officinalis* diterpene, induces selective cytotoxicity in cancer cells. *Cytotechnology.* 68:2139-2143.
- DeAngelis Y, Gemmer C, Kaczvinsky J, et al., (2005). Three etiologic facets of dandruff and seborrheic dermatitis: *Malassezia* fungi, sebaceous lipids and individual sensitivity. *J Invest Dermatol Symp Proc* 10:295-7.
- Del Baño MJ, Lorente J, Castillo J, et al. (2003). Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 51 (15):4247-4253.
- Delamare APL., Moschen-Pistorello IT, Artico L, et al., (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem.* 100:603-608.
- Demirezer LÖ, Gürbüz P, Kelicen Uğur EP, et al., (2015). Molecular docking and ex vivo and *in vitro* anticholinesterase activity studies of *Salvia sp.* and highlighted rosmarinic acid. *Turk J Med Sci.* 45 (5): 1141-8.
- Denison MS, Rogers JM, Rushing SR, et al., (2002). Analysis of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) signal transduction pathway. In: Maines MD, Costa LG, Reed DJ, Sassa S, Sipes G,

- editors. Current Protocols in Toxicology. Vol. 4. John Wiley & Sons, Inc.; New York: pp. 481–485.
- Denison MS, Soshilov AA, He G, et al., (2011). Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol Sci* 124(1):1–22.
- Desfontaines L, (1830). *Caii Plinii secundi historiae naturalis libri XXXVII*. Vol. 7. N. Lemaire, Paris.
- Di Meglio P, Duarte J, Ahlfors H, et al., (2014). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor Dampens the Severity of Inflammatory Skin Conditions. *Immunity*. 40(6): 989–1001.
- Dianat M, Esmaeilziadeh M, Badavi M, et al., (2014). Cardiac protective effects of crocin on hemodynamic parameters and infarct size in compare vitamin E after ischemia reperfusion in isolated rat heart. *Planta Med*. 80:393–398.
- Diani-Moore S, Labitzke E, Brown R, et al., (2006). Sunlight generates multiple tryptophan photoproducts eliciting high efficacy CYP1A induction in chick hepatocytes and *in vivo*. *Toxicol Sci* 90(1):96–110,
- Dias PC, Foglio MA, Possenti A, et al., (2000). Anti-ulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. *J Ethnopharmacol*. 69: 57–62.
- Diaz J. (1988). *Teofrasto, historia de las plantas*. Gredos, Madrid.
- Díaz-Maroto MC, Perez-Coello MS, Sanchez- Palomo E, et al., (2007). Impact of drying and storage time on sensory characteristics of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *J Sens Stud*. 22: 34–48.
- Dimayuga R, Garcia S, Nielsen PH, et al., (1991). Traditional medicine of Baja california sur (mexico) iii. carnosol: a diterpene antibiotic from *Lepechinia hastata*. *J Ethnopharmacol*, 31 (1991) 43–48.
- Di Natale BC, Schroeder JC, Perdew GH et al., (2011). Ah receptor antagonism inhibits constitutive and cytokine inducible IL6 production in head and neck tumor cell lines. *Mol Carcinog*. 50(3):173–83.
- Dincer C, Topuz A, Sahin-Nadeem H, et al., (2012). A comparative study on phenolic composition, antioxidant activity and essential oil content of wild and cultivated sage (*Salvia fruticosa* Miller) as influenced by storage. *Industr Crops Pr* 39: 170–176.
- Ding P, Wang KW, (2018). Chemical constituents of *Euscaphis japonica*. *Chem Nat Compnds*, 54. No. 2
- Djarmati RM, Jankov E, Schwirtlich B, et al., (1991). High Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Sage by Supercritical CO₂ Extraction. *JAOCS*, 68: 10,
- Djarmati Z, Jankov R, Csanádi J, et al., (1993). The isolation of carnosic acid 12-methyl ether from *Salvia officinalis* L. and NMR Study of its methyl ester. *Collect. Czech. Chem. Commun*. 58: 1919–1924.
- Dmitrievna ZM, Seryogina LY, Melika G, et al., (2003). New Genus and New Species of Cynipid Gall Inducing Wasp. *J Entomol Res Soc*. 5 (1): 35–49.
- Dokos C, Hadjicosta C, Dokou K, et al., (2009). Ethnopharmacological Survey of Endemic Medicinal Plants in Paphos District of Cyprus. *Ethnobotan Leaf* 13: 1060–1068.
- Dörrie J, Sapala K, Zunino SJ, (2001). Carnosol-induced apoptosis and downregulation of Bcl-2 in B-lineage leukemia cells. *Cancer Lett*. 170 (1): 33–39.
- Duke JA. *CRC handbook of medicinal herbs*. CRC Press, United States 1985.
- Dumbrava DG, Moldovan C, Raba DN, et al., (2012). Vitamin C, chlorophylls, carotenoids and xanthophylls content in some basil (*Ocimum basilicum* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves extracts. *J Agroalim Proc Technol*. 18(3):253–258.
- Dweck AC, (2000). Introduction the folklore and cosmetic use of various *Salvia* species. In: *Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles*; Vol. 14.
- Economic Properties, Cultivation and Folk-lore of Herbs, Grasses, Fungi, Shrubs and Trees with All Their Modern Scientific Uses, Volume 2.

- Ehrnhofere Ressler MM, Fricke K, Pignitter M, et al., (2013). Identification of 1.8-cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. *J Agricult Food Chem.* 61:3451-3459.
- Eidi M, Eidi A, (2009). Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 3:40-44.
- Eidi M, Eidi A, Bahar M, (2006). Effects of *Salvia officinalis* L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with the cholinergic system in rats. *Nutrition.* 22:321-326.
- Eidi M, Eidi A, Zamanizadeh H, (2005). Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 100:310-313.
- El Ghaoui WB, Ghanem EB, Chedid LA, et al., (2008). The effects of *Alcea rosea* L., *Malva sylvestris* L. and *Salvia libanotica* L. water extracts on the production of anti-egg albumin antibodies, interleukin-4, gamma interferon and interleukin-12 in BALB/c mice. *Phytother Res.* 22 (12): 1599-604.
- El Hadri A, del Río MÁG., Sanz J, (2010). Cytotoxic activity of α -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *An R Acad Nac Farm.* 76:343-356.
- Elmann A, Mordechay S, Rindner M, et al., (2009). Protective Effects of the Essential Oil of *Salvia fruticosa* and Its Constituents on Astrocytic Susceptibility to Hydrogen Peroxide-Induced Cell Death. *J Agric Food Chem.* 57 (15): 6636-41.
- El-Sayed NH, El-Eraky W, Ibrahim MT, et al., (2006). Antiinflammatory and ulcerogenic activities of *Salvia triloba* extracts. *Fitoterapia.* 77 (4): 333-5.
- Elzaawely A, Xuan T, Koyama H, et al., (2007). Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. *Food Chem.* 104(4): 1648-1653.
- Emond C, Michalek JE, Birnbaum L, et al., (2005). Comparison of the use of a physiologically based pharmacokinetic model and a classical pharmacokinetic model for dioxin exposure assessments. *Environ Health Perspect,* 113:1666-8.
- Erdogrul OT, (2002). Antibacterial activities of some plant extracts used in folk medicine. *Pharml Biol.* 40 (4): 269-273.
- Erenmemisoglu A, Saraymen R, Ustun S, (1997). Effect of a *Rosmarinus officinalis* leave extract on plasma glucose levels in normoglycaemic and diabetic mice. *Pharmazie.* 52 (8): 645-6.
- ESCOP Monographs, (2014). *Salviae trilobae folium* - Sage Leaf, Three-lobed. The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products.
- ESCOP Monographs. (2003). The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, 2nd ed. Exeter, European Scientific Cooperative on Phytotherapy.
- Esser C, Rannug A, Stockinger B, et al., (2009). The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol.* 30:447-454.
- Etsassala N, Adewale O, Adeloye A, El-Halawany A, et al., (2019). Investigation of in-vitro antioxidant and electrochemical activities of isolated compounds from *Salvia chamelaeagnea* P.J.Bergius extract. *Antioxidants* (Basel). 12;8(4):98.
- European Medicines Agency: Community herbal monograph on *Rosmarinus officinalis* L., aetheroleum, 2010, EMA/HMPC/235453/2009. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Community_herbal_monograph/2011/01/WC500101493.pdf.
- European Pharmacopoeia 8th Edition (2014) (8.2); Ref. 01/2008:1561.
- European Pharmacopoeia. (2005). European directorate for the quality of medicines (EDQM) (5th ed., pp. 2377-2379). Strasbourg: Council of Europe. [ROS].
- Everest A, Ozturk E, (2005). Focusing on the ethnobotanical uses of plants in Mersin and Adana provinces (Turkey). *J Ethnobiolo Ethnomed* 1. 6.

- Exarchou V, Kanetis L, Charalambous Z, (2015). HPLC-SPE-NMR characterization of major metabolites in *Salvia fruticosa* Mill. extract with antifungal potential: relevance of carnosic acid, carnosol, and hispidulin. *J Agric Food Chem.* 63 (2): 457-63.
- Exarchou V, Troganis A, Gerotheranassis I, et al., (2001). Identification and quantification of caffeic and rosmarinic acid in complex plant extracts by the use of variable-temperature two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2–8.
- Eyong K, Bairy G, Eno A, et al., (2018). Triterpenoids from the stem bark of *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae) and derived esters exhibit cytotoxicity against a breast cancer cell line. *Med Chem Res* (2018) 27:268–277.
- Fakir H, Korkmaz M, Guller B, (2009). Medicinal plant diversity of Western Mediterranean region in Turkey. *J Appl Biol Sci* 3 (2),30–40,
- Farahani MS, Bahramsoltani R, Farzaei MH, et al., (2015). Plant-derived natural medicines for the management of depression: an overview of mechanisms of action. *Rev Neurosci.* 26 (3):305-21.
- Farhat GN., Affara NI., Gali-Muhtasib HU., (2001). Seasonal changes in the composition of the essential oil extract of East Mediterranean sage (*Salvia libanotica*) and its toxicity in mice. *Toxicol.* 39 (10): 1601-5.
- Farhat MB, Landoulsi A, Chaouch-Hamad R, et al., (2013). Profiling of essential oils and polyphenolics of *Salvia argentea* and evaluation of its by-products antioxidant activity. *Industr Crops Prods*, 47: 106-112.
- Farhat MB, Rym Chaouch-Hamad R, Sotomayor JA, et al., (2014). Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. *Industr Crops Prods*, 54: 78-85.
- Farmahin R, Crump D, O'Brien JM, et al., (2016). Time-dependent transcriptomic and biochemical responses of 6-formylindolo[3,2-b] carbazole (FICZ) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) are explained by AHR activation time. *Biochem Pharmacol* 115:134-43.
- Farnsworth NR, (1975). Potential value of plants as sources of new antifertility agents 1. *J Pharm Sci*, 64:535–598.
- Farnsworth NR. Potential value of plants as sources of new antifertility agents 1. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1975. 64:535–598. Ladytnina EA, Morozova RS. *Fitoterapija*. Leningrad, Meditsina, 1987.
- Felter HW and Lloyd JU. *King's American dispensatory*. Eclectic Medical Publications, Sandy, OR, 1983.
- Fernández LF, Palomino OM, Frutos G, (2014). Effectiveness of *Rosmarinus officinalis* essential oil as antihypotensive agent in primary hypotensive patients and its influence on health-related quality of life. *J Ethnopharmacol.* 151 (1):509-16.
- Fernandez-Fernandez L, Comes G, Bolea I, et al., (2012). LMN diet, rich in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, improves mouse cognitive decline associated with aging and Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research.* 228 (2): 261-271.
- Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, et al., (1995). Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science (New York NY)* 268:722–6.
- Firenzuoli F, (2009). *Fitoterapia: Guida all' uso clinic delle piante medicinali*. Edizioni: Elsevier.
- Fischedick J, Standiford M, Johnson D, et al., (2013). Structure activity relationship of phenolic diterpenes from *Salvia officinalis* as activators of the nuclear factor E2-related factor 2 pathway. *Bioorg med chem* 21 (9): 2618-2622.
- Flamini G, Cioni PL, Morelli I, et al., (2002). Main agronomic productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. *J Agricult Food Chem.* 50: 3512-3517.
- Folkman J, (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol.* 29 (6. Supplement 16): 15–18.

- Fomogne-Fodjoa M, Ndintehb D, Olivierc D, et al., (2017). Secondary metabolites from *Tetracera potatoria* stem bark with antimycobacterial activity. *J Ethnopharmacol* 195 (2017) 238–245.
- Forseth RR, Schroeder FC, (2011). NMR-spectroscopic analysis of mixtures: from structure to function. *Curr Opin Chem Biol*, 15 (1): 38–47.
- Fotovvat M, Radjabian T, Saboora A, (2019). HPLC fingerprint of important phenolic compounds in some *Salvia L.* species from Iran. *Rec. Nat. Prod.* 13 (1): 37-49.
- Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, et al., (1996a). Prior, E. Antioxidant activity of a Rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J. Agric. Food Chem.* 44: 131-135.
- Frankel, E. N.; Huang, S.-W.; Prior, E.; Aeschbach, R. Frankel EN, Huang SW, Prior E, et al., (1996b). Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *J. Sci. Food Agric.* 72: 201-208.
- Fritsche E, Schäfer C, Calles C, et al., (2007). Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmic target for ultraviolet B radiation. *Proc Nat Acad Sc USA.* 104:8851–8856.
- Fujii-Kuriyama Y, Mimura J, (2005). Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 338:311-7.
- Furue M, Fuyuno Y, Mitoma C, et al., (2018). Therapeutic agents with AHR inhibiting and NRF2 activating activity for managing chloracne. *Antioxidants (Basel)*: 7. 90.
- Furue M, Hashimoto-Hachiya H, Tsuji G, (2019). Aryl Hydrocarbon Receptor in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.*: 20, 5424.
- Furue M, Takahara M, Nakahara T et al., (2014). Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Arch Dermatol Res.* 306(9): 769–779.
- Furue M, Uchi H, Mitoma Ch, (2017). Antioxidants for Healthy Skin: The Emerging Role of Aryl Hydrocarbon Receptors and Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor-2. *Nutrients* 2017. 9(3), 223.
- Gaitanis G, Magiatis P, Stathopoulou K et al., (2008). AhR Ligands, Malassezin, and Indolo[3,2-b]Carbazole are Selectively Produced by *Malassezia furfur* Strains Isolated from Seborrheic Dermatitis. *J Invest Dermatol*, 128 (7): 1620-1625.
- Gaitanis G, Velegraki, A, Magiatis P, et al., (2011). Could *Malassezia* yeasts be implicated in skin carcinogenesis through the production of aryl-hydrocarbon receptor ligands? *Medical Hypotheses*, 77. 47-51.
- Gali-Muhtasib H, Hilan C, Khater C, (2000). Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of its essential oils. *J Ethnopharmacol.*;71(3):513-20,
- Garcia CSC, Menti C, Lambert APF, (2016). Pharmacological perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): antioxidant, and antitumor in mammalian cells. *An Acad Bras Ciênc.* 88:281–292.
- George J, Hedge S, Rajesh KS, et al., (2009). The efficacy of an herbal based toothpaste in the control of plaque and gingivitis: a clinic-biochemical study. *Dent res.* 20: 480-482.
- German Pharmacopeias (Ergänzungsbuch zum Deutschen Arzneibuch (Erg. B. 6. Stuttgart 1956. 1958.)
- Ghasemzadeh Rahbardar M, Hosseinzadeh H, (2020). Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) and its active constituents on nervous system disorders. *Iranian journal of basic medical sciences*, 23(9): 1100–1112.
- Gohari A, Ebrahimi H, Saeidniaa S, et al., (2011). Flavones and Flavone Glycosides from *Salvia macrosiphon Boiss.* *Iran J Pharm Res* 10 (2): 247-251.
- Gomar A, Hosseini A, Mirazi N, (2014). Evaluation of *Salvia officinalis L.* (sage) leaves on morphine-induced memory impairment in adult male rats. *Focus Altern Complement Ther.* 19:156–162.

- Goñalons LS, *Salvia* L. In Castroviejo S, Aedo C, Laínz M, et al., editors. *Flora iberica* 3:298-326. Real Jardín Botánico. CSIC, Madrid 1993.
- Gonzalez A, Andres L, Herrera J, et al., (1989). Abietane diterpenes with antibiotic activity from the flowers of *Salvia canariensis*. Reaction of galdosol with diazomethane. *Can. J. Chem.* Vol 67.
- González MA, (2015). Aromatic abietane diterpenoids: their biological activity and synthesis. *Natural product reports*, 32(5): 684-704.
- Gonzalez-Tejero MR, Casares-Porcel M, Sanchez-Rojas CP, et al., (2008). Medicinal plants in the Mediterranean area: synthesis of the results of the project Rubia. *J Ethnopharmacol* 116. 341-357.
- Gonzalez-Trujano ME, Pena EI, Martínez AL, et al., (2007). Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol*. 111 (3): 476-482.
- González-Vallinas M, Molina S, Vicente G, et al. (2013). Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacol. Res.* 72:61-68.
- Govindaraj J, Sorimuthu PS, (2015). Rosmarinic acid modulates the antioxidant status and protects pancreatic tissues from glucolipotoxicity mediated oxidative stress in high-fat diet: streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 404:143-159.
- Gramatzki D, Pantazis G, Schittenhelm J, et al., (2009). Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF-beta/Smad pathway in human glioblastoma cells. *Oncogene*, 28(28):2593-605.
- Grauso L., Zotti M, Sun W, et al., (2019). Spectroscopic and multivariate data-based method to assess the metabolomic fingerprint of Mediterranean plants. *Phytochem Anal.*30: 572-581.
- Grdisa M, Eidi A, Zamanizadeh H, (2005). Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 52:439-443.
- Grdisa M, Jug-Dujakovic M, Loncaric M, Carovic-Stanko K et al (2015) Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): a review of biochemical contents, medical properties and genetic diversity. *Agricult Conspect Sci* 80:69-78.
- Grieve M, (1984). *A Modern Herbal. The Medicinal, Culinary, Cosmetic and Economic Properties, Cultivation and Folklore of Herbs, Grasses, Fungi, Shrubs and Trees with All Their Modern Scientific Uses.* Edited and Introduced by Mrs C.F. Leyel. Savvas Publishing.
- Grolier Multimedia Encyclopedia, (1992). Grolier Interactive Inc.
- Grosch S, Monakhova YB, Kuballa T, et al., (2013). Comparison of GC/MS and NMR for quantification of methyleugenol in food. *Eur Food Res Technol.*, 236: 267-275.
- Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C, PDR for herbal medicines. Medical Economics Company Inc., Montvale, NJ USA 2000, 367-368.
- Gu JQ, Wang, Scott G., et al., (2006). Dereplication of Pentacyclic Triterpenoids in Plants by GC-EI/MS. *Phytochemical Analysis Phytochem. Anal.* 17: 102-106.
- Gunther, R. (1968). *The Greek herbal of Dioscorides.* Hafner, London.
- Gupta AK, Batra R, Bluhm R, et al., (2004). Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol.*, 51:785-798.
- Gürdal B, Kültür S, (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). *J Ethnopharmacol.* 146 (1): 113-26.
- Gursoy UK, Gursoy M, Gursoy OV, et al., (2009). Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. *Anaerobe.* 15 (4): 164-7.
- Guy GP, Machlin SR, Ekwueme DU, et al., (2015). Prevalence and costs of skin cancer treatment in the U.S., 2002-2006 and 2007-2011. *Am J Prev Med.* 48:183-87.

- Guyot E, Chevallier A, Barouki R, et al., (2013). The AhR twist: ligand dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discov Today* 18. 479–486.
- Guyot E, Chevallier A, Barouki R, et al., (2013). The AhR twist: ligand dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications. *Drug Discovery Today* 18. 479–486.
- Haarmann-Stemann T, Esser C, Krutmann J, (2015). The janus-faced role of aryl hydrocarbon receptor signaling in the skin: consequences for prevention and treatment of skin disorders. *J Invest Dermatol.*, 135(11):2572–2576.
- Haarmann-Stemann Th, Abel J, Fritsche E, et al., (2012). The AhR–Nrf2 Pathway in Keratinocytes: On the Road to Chemoprevention? *J Invest Dermatol*, 132. 7–9.
- Habtemariam S, (2016). The Therapeutic Potential of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Diterpenes for Alzheimer's Disease. Evidence-based complementary and alternative medicine, eCAM, 2680409.
- Halicioglu O, Astarcioglu G, Yaprak I, et al., (2011). Toxicity of *Salvia officinalis* in a newborn and a child: an alarming report. *Pediatr Neurol.* 45:259–260,
- Hani SB, Bayachou M, (2014). *Salvia fruticosa* reduces intrinsic cellular and H₂O₂-induced DNA oxidation in HEK 293 cells; assessment using flow cytometry. *Asian Pac J Trop Biomed.* 4 (5): 399-403.
- Hanson B, (2004). Designing an Herb Garden. Brooklyn Botanic Garden. p. 58. ISBN 978-1-889538-63-1.
- Haque A, Ali Siddiqi M, Rahman M, et al., (2013). Isolation of Betulinic acid and 2,3-Dihydroxyolean-12-en-28-oic acid from the Leaves of *Callistemon linearis*. *Dhaka Univ. J. Sci.* 61(2): 211-212.
- Harach T, Aprikian O, Monnard I, et al., Moulin, (2010). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf extract limits weight gain and liver steatosis in mice fed a high-fat diet. *Planta Med.* 76 (6): 566-571.
- Harley R.M., Atkins S., Budantsev A.L., et al., (2004). Labiatae. In: Kadereit, J.W. (Ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants, Lamiales*, vol. VII. Springer, Berlin.
- Hartwell JL, 1982. *Plants Used Against Cancer*. Quarterman, Lawrence, MA.
- Harvala G., Menounos P., Argyriadou N., (1987). Essential Oil from *Salvia triloba*. *Fitoterapia*, 58: 353-356.
- Hasanein P, Felehgari Z, Emamjomeh A, (2016). Preventive effects of *Salvia officinalis* L. against learning and memory deficit induced by diabetes in rats: possible hypoglycaemic and antioxidant mechanisms. *Neurosci Lett.* 622:72–77.
- Hassan SB, Gali-Muhtasib H, Göransson H, et al., (2010). Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-kappa B signalling. *Anticancer Res.* 30 (6):1911-9.
- Hayashibara T, Yamada Y, Mori N, et al., (2003). Possible involvement of Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) in adult T-cell leukemia (ATL) leukemogenesis: constitutive activation of AhR in ATL. *Biochem Biophys Res Commun.* 300(1):128–34.
- Hayouni EA, Chraief I, Abedrabba M, (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *Int J Food Microbiol.* 125:242–251.
- He G, Zhao J, Brennan JC, et al., (2013). Cell-based assays for identification of aryl hydrocarbon (Ah) receptor activators. In: *Optimization of Drug Discovery: in vitro Methods*, Second Edition (Yan, A. and Caldwell, G.W., Eds.), pp. 221-235. Humana Press, New York, NY.
- Hecht SS, (2012). Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *Int. J. Cancer* 131. 2724–2732.
- Heidari-vala H, Ebrahimi R, Reza M, et al., (2013). Evaluation of an aqueous-ethanolic extract from *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) for its activity on the hormonal and cellular function of testes in adult male rat. *Iran J Pharm Res.* 12(2): 445-451.
- Heinrich M, Kufe, J, Leonti M, et al., (2006). Ethnobotany and ethnopharmacology. Interdisciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol.* 107: 157-160,

- Hernández-Hernández E, Ponce-Alquicira E, Jaramillo-Flores MEb, et al., (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science* 81: 410–417.
- Hernandez-Saavedra D, Perez-Ramirez IF, Ramos-Gomez M, (2016). Phytochemical characterization and effect of *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum*, and *Salvia officinalis* infusions on obesity associated cardiovascular risk. *Med Chem Res.* 25:163–172.
- Herodez S, Hadolinb M, Mojca Skerget M, et al., (2003). Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chem* 80: 275–282.
- Herrmann S, Seidelin M, Bisgaard HC, et al., (2002). Indolo[3,2-b] carbazole inhibits gap junctional intercellular communication in rat primary hepatocytes and acts as a potential tumor promoter. *Carcinogenesis*, 23:1861–1868.
- Hidaka T, Fujimura T, Aiba S, (2019). Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates Carcinogenesis and Maintenance of Skin Cancers. *Front Med (Lausanne)*. 4. 6:194.
- Hidaka T, Ogawa E, Kobayashi EH, et al., (2017). The aryl hydrocarbon receptor AhR links atopic dermatitis and air pollution via induction of the neurotrophic factor artemin. *Nat Immunol*, 18:64–73.
- Hidalgo PJ, Uebera JL, Tena MT, et al., (1998). Determination of the Carnosic Acid Content in Wild and Cultivated *Rosmarinus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2624–2627.
- Hilan C, Khazzaka K, Sfeir R, (1997). Antimicrobial effect of essential oil of *Salvia libanotica* (Sage). *Br J Phytother* 4 (4), 1–3.
- Hinson J, translator. “Le Menagier de Paris”. 1393.
- Holmes, P. (1999). Rosemary oil. *Intern J Aromather*, 9(2): 62–66.
- Honda G, Yes-ilada E, Tabata M, et al., (1996). Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kutahya, Denizli, Mugla, Aydın Provinces. *J Ethnopharmacol* 53 (2), 75–87.
- Horiuchi K, Shiota S, Hatano T, et al., (2007). Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci. *Biol Pharm Bull.* 30:1147–1149.
- Horváthová E, Srančíková A, Regendová-Sedláčková E, (2016). Enriching the drinking water of rats with extracts of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* increases their resistance to oxidative stress. *Mutagenesis*. 31:51–59.
- Hu W, Sorrentino C, Denison MS, et al., (2007). Induction of cyp1a1 is a nonspecific biomarker of aryl hydrocarbon receptor activation: results of large-scale screening of pharmaceuticals and toxicants *in vivo* and *in vitro*. *Mol Pharmacol* 71:1475–86.
- Huang MT, Ho CT, Wang ZY, et al. (1994). Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res.* 54 (3): 701–708.
- Huang SS, Zheng RL, (2006). Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action *in vitro*. *Cancer Lett.* 239:271–280,
- Hubbert M, Sievers H, Lehnfeld R, et al., (2006). Efficacy and tolerability of a spray with *Salvia officinalis* in the treatment of acute pharyngitis – a randomised, double-blind, placebo-controlled study with adaptive design and interim analysis. *Eur J Med Res.* 11:20–26.
- Hung, C, Yen G, (2001). Extraction and identification of antioxidative components of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl.). *Food Sci Technol* 34 (2001): 306–311.
- Hussain AI, Anwar F, Chatha SAS, et al., (2010). Essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Braz J Microbiol.* 41: 1070–1107.
- Hussain AI, Anwar F, Hussain Sherazi ST, et al., (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem.* 108 (3): 986–995.

- Ikuta T, Namiki T, Fujii-Kuriyama Y, et al., (2009). AhR protein trafficking and function in the skin. *Biochem Pharmacol* 77(4):588–596.
- Inatani R, Nakatani N, H Fuwa H, (1983). Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, 47: 521-528.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 69. Geneva: IARC, 1997.
- Itani WS, El-Banna SH, Hassan SB, et al., (2008). Anti colon cancer components from Lebanese sage (*Salvia libanotica*) essential oil: Mechanistic basis. *Cancer Biol Ther.* 7 (11): 1765-73.
- Jaberian H, Pir K, Nazari J, (2013). Phytochemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food Chem.* 136:237–244.
- Jäger S, Trojan H, Kopp Th, et al., (2009). Pentacyclic triterpene distribution in various plants – rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*, 14: 2016-2031.
- Jaradat NA, Ayeshe OI, Anderson C, (2016). Ethnopharmacological survey about medicinal plants utilized by herbalists and traditional practitioner healers for treatments of diarrhea in the West Bank/Palestine. *J Ethnopharmacol.* 182: 57-66.
- Jayasinghe C, Gotoh N, Aoki T, et al., (2003). Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4442–4449.
- Jedinák A, Mucková M, Kost'álová D, et al., (2006). Antiprotease and antimetastatic activity of ursolic acid isolated from *Salvia officinalis*. *Z Naturforsch C.* 61:777–782.
- Jin UH, Park H, Li X, et al., (2018). Structure-Dependent Modulation of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Activities by Flavonoids. *Toxicol Sci.*, 164(1):205-217.
- Ju Q, Fimmel S, Hinz N, et al., (2011). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters sebaceous gland cell differentiation *in vitro*. *Exp. Dermatol.*: 20, 320–325.
- Kaileh M, Vanden BW, Boone E, et al., (2007). Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *J Ethnopharmacol.* 113 (3): 510-6.
- Kaliora AC, Kogiannou DAA, Kefalas P, et al., (2014). Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention? *Food Chem* 2014. 142:233–241.
- Kallimanis P, (2017). Rosemary and sage extracts for skin diseases: Compositions and treatments method. GR1009073.
- Kallimanis P, Prodromidis S, (2021a). Plaque psoriasis therapy using a cream containing *salvia fruticosa mill.* Poster presented at: 20th International Congress of the International Society for Ethnopharmacology Virtual Congress. 18-21 April, Thessaloniki.
- Kallimanis P, Prodromidis S, (2021b). Guttate psoriasis therapy using a cream containing *salvia fruticosa mill.* Poster presented at: 20th International Congress of the International Society for Ethnopharmacology Virtual Congress. 18-21 April, Thessaloniki.
- Kallimanis P, Prodromidis S, (2021c). Treatment of seborrheic dermatitis using a cream containing *salvia fruticosa mill.* Poster presented at: 20th International Congress of the International Society for Ethnopharmacology Virtual Congress. 18-21 April, Thessaloniki.
- Kamatou G, (2006). Indigenous salvia species – an investigation of their pharmacological activities and phytochemistry. Ph.D Thesis, Johannesburg.
- Kamatou GPP, Viljoen AM, Steenkamp P, (2010). Antioxidant, anti-inflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chem.* 119:684–688.
- Karakurum Goskel B, Coskun O, Ucler S, et al., (2014). Use of complementary and alternative medicine by a sample of Turkish primary headache patients. *Rev Agricult.* 26 (1): 1-7.
- Karim F, Quraan S, (1986). Medicinal Plants of Jordan. Centre for Jordanian Studies, Irbid.

- Karkoula E, Skantzari A, Melliou E, et al., (2012). Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative (1)H NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(47), 11696–11703.
- Karousou R, Kokkini S, (1999). Distribution and clinal variation of *Salvia fruticosa* Mill. (Labiatae). *Biochem Syst Ecol.* 27 (6): 559–568.
- Kasai A, Hiramatsu N, Hayakawa K, et al., (2006). High levels of dioxin-like potential in cigarette smoke evidenced by *in vitro* and *in vivo* biosensing. *Cancer Res* 66: 7143–7150.
- Kbayssi H, (1993). *Encyclopedia of Weeds and Medicinal Plants*. Scientific Books, Beirut, Lebanon, p. 271.
- Kennedy DO, Pace S, Haskell C, et al., (2006). Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery. *Neuropsychopharmacol.* 31 (4):845-52.
- Kerkoub N, Panda SK, Yang M-R, et al., (2018). Bioassay-guided isolation of anti-candida biofilm compounds from methanol extracts of the aerial parts of *Salvia officinalis* (Annaba, Algeria). *Front. Pharmacol.* 9:1418.
- Keshavarz M, Bidmeshkipour A, Mostafaie A., et al., (2011). Antitumor activity of *Salvia officinalis* is due to its anti-angiogenic, anti-migratory and anti-proliferative effects. *Cell J.* 12:477–482.
- Keshavarz M, Mostafaie A, Mansouri K, et al., (2010). *In vitro* and *ex vivo* antiangiogenic activity of *Salvia officinalis*. *Phytother Res.* 24:1526–1531.
- Khajeh, M., Yamini, Y., Bahramifar, N., et al., (2005). Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chem.* 91(4): 639-644.
- Khan A, Najeeb-ur R, Alkharfy K, et al., (2011) Antidiarrheal and antispasmodic activities of *Salvia officinalis* are mediated through activation of K⁺ channels. *J Bangladesh Pharm Soc.* 6: 111-116
- Khattab HAH, Mohamed RA, Hashemi JM, (2012). Evaluation of hypoglycemic activity of *Salvia officinalis* L. (Sage) infusion on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Am Sci.* 8:411–416.
- Khayate-Nouri MH, Namvaran-Abbasabad A, Tavakkoli F, ((2013). *Salvia Officinalis* and cisplatin effects on pentylenetetrazole induced seizure threshold print. *Zahedan J Res Med Sci.* 15:1–3.
- Khoury M., Stien D., Eparvier V., et al., (2016). Report on the Medicinal Use of Eleven Lamiaceae Species in Lebanon and Rationalization of Their Antimicrobial Potential by Examination of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Their Essential Oils. *E-Based ComplAltern Med.* 2016:2547169.
- Kianbakht S, Abasi B, Perham M, et al., (2011). Hashem Dabaghian F. Antihyperlipidemic effects of *Salvia officinalis* L. leaf extract in patients with hyperlipidemia: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Phytother Res.* 25:1849–1853.
- Kianbakht S, Dabaghian FH, (2013). Improved glycemic control and lipid profile in hyperlipidemic type 2 diabetic patients consuming *Salvia officinalis* L. leaf extract: a randomized placebo. *Controlled clinical trial.* *Compl Ther Med.* 21 (5):441-6.
- Kianbakht S, Nabati F, Abasi B, (2016). *Salvia officinalis* (Sage) Leaf Extract as Add-on to Statin Therapy in Hypercholesterolemic Type 2 Diabetic Patients: A Randomized Clinical Trial. *Int J Mol Cell Med.* 5 (3):141-148.
- Kim HO, Kim JH, Chung BY, et al., (2014). Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in patients with chronic inflammatory skin diseases. *Exp Dermatol* 23: 278–281.
- Kim K, Choi YH, R. Verpoorte, (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat Protocols*, 5 (3): 536–549.
- Kim KH, Choi YH, R. Verpoorte, (2011). NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends Biotechnol*, 29 (6): 267–275.
- Kintzios SE, (2000). *Sage: The Genus Salvia*. CRC Press.

- Kivilompolo M¹, Hyötyläinen T, (2007). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *J Chromatogr A*. 1145 (1-2):155-64.
- Klancnik A, Guzej B, Kolar MH, et al., (2009). *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *J. Food Prot.* 72 (8):1744-1752.
- Koliopoulos G, Pitarokili D, Kioulos E, (2010). Chemical composition and larvicidal evaluation of *Mentha*, *Salvia*, and *Melissa* essential oils against the West Nile virus mosquito *Culex pipiens*. *Parasitol Res.* 107 (2): 327-35.
- Kontogianni V, Exarchou, V, Troganis A, (2009). Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy – comparison with HPLC methods. *Anal. Chim. Acta*, 635: 188-195.
- Kontogianni V, Tomic G, Nikolic I, et al., et al., (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chem* 136: 120-129.
- Kontogianni VG, Tomic G, Nikolic I, et al., (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and antiproliferative activity. *Food Chem.* 136 (1): 120-129.
- Koutsoulas A, arneck M, Slanina J, et al., (2019). Characterization of Phenolic Compounds and Antiproliferative Effects of *Salvia pomifera* and *Salvia fruticosa* Extracts. *Molecules*, (24) :2921.
- Kozics K, Klusová V, Srančíková A, (2013). Effects of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* on oxidant-induced DNA damage and antioxidant status in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol.* 141:2198-2206.
- Krämer U, Sugiri D, Ranft U, et al., (2009). Eczema, respiratory allergies, and traffic-related air pollution in birth cohorts from small-town areas. *J Dermatol Sci.*, 56:99-105.
- Kuballa Th, Brunner T, Thongpanchang T, et al., (2018). Application of NMR for authentication of honey, beer and spices. *Curr Opin Food Sci*, 19:57-62.
- Kulkarni P, Crespo J, Afonso C, (2008). Dioxins sources and current remediation technologies - A review. *Environ Int.* 34:139-53.
- Kuo C-F, Su J-D, Chiu C-H, et al., (2011). Anti-inflammatory effects of supercritical carbon dioxide extract and its isolated carnosic acid from *Rosmarinus officinalis* leaves. *J. Agric. Food Chem.* 59 (8):3674-3685.
- Kwon YI, Vattem DA, Shetty K, (2006). Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacif J Clin Nutr.* 15: 107-118.
- Lachenmeier D, Schonberger T, Ehni S, et al., (2016). A discussion about the potentials and pitfalls of quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) spectroscopy in food science and beyond. In *Proceedings of the XIII International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science*:77-85.
- Ladynina EA, Morozova RS (1987). *Fitoterapija*. Leningrad, Meditsina, 1987.
- Lalićević S, Djordjević I, (2004). Comparison of benzydamine hydrochloride and *Salvia officinalis* as an adjuvant local treatment to systemic nonsteroidal anti-inflammatory drug in controlling pain after tonsillectomy, adenoidectomy, or both: an open-label, single-blind, randomized clinical trial. *Curr Ther Res Clin Exp.* 65:360-372.
- Länger R, Mechtler Ch, Jurenitsch J, (1998). "Composition of the Essential Oils of Commercial Samples of *Salvia officinalis* L. and *S. fruticosa* Miller: A Comparison of Oils Obtained by Extraction and Steam Distillation". *Phytochem Anal.* 7 (6): 289-293.
- Laude EA, Morice AM, Grattan TJ, (1994). The antitussive effects of menthol, camphor and cineole in conscious guinea pigs. *Pulm Pharmacol* 7 (3), 179-184.

- Lax V, (2014). Estudio de la variabilidad química: propiedades antioxidantes y biocidas de poblaciones espontáneas de *rosmarinus officinalis* L. en la Región de Murcia. Tesis por compendio de publicaciones.
- Leclair HM, Tardif N, Paris A, et al., (2020). Role of Flavonoids in the Prevention of AhR-Dependent Resistance During Treatment with BRAF Inhibitors. *Int J Mol Sci.* 16;21(14):5025.
- Leiter U, Eigentler T, Garbe C, (2014). Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol.* 810:120–40,
- Li X, Zhang Q, Hou N, et al., (2019). Carnosol as a Nrf2 activator improves endothelial barrier function through antioxidative mechanisms. *I j mol sci,* 20(4), 880,
- Lima CF, Azevedo MF, Araujo R, et al., (2006). Metformin-like effect of *Salvia officinalis* (common sage): is it useful in diabetes prevention? *Br J Nutr.* 96:326–333.
- Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C, (2007). Drinking of *Salvia officinalis* tea increases CCl₄-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol.* 45:456–464.
- Limoncu ME, Balcioglu C, Oyur T, et al., (2017). *In vitro* Investigation of the Pediculicidal Activities of the Volatile Oil Components of Some Medical Plants Raised in Turkey. *Turkiye Parazitolo Derg.* 41(4):208-213.
- Lin H, Wei S, Hurt EM, et al., (2018). Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest.* 128: 805 –15.
- Lin YK, Chang CJ, Chang YC et al., (2008). Clinical assessment of patients with recalcitrant psoriasis in a randomized, observer-blind, vehicle-controlled trial using indigo naturalis. *Arch Dermatol.,* 144: 1457– 64.
- Lin YK, See LC, Huang YH et al., (2012). Comparison of refined and crude indigo naturalis ointment in treating psoriasis: randomized, observer-blind, controlled, interpatient trial. *Arch Dermatol.,* 148: 397– 400,
- Lin YK, See LC, Huang YH, et al., (2018). Comparison of indirubin concentrations in indigo naturalis ointment for psoriasis treatment: a randomized, double-blind, dosage-controlled trial. *Br J Dermatol.,* 178(1):124-131.
- Lin YK, Wong WR, Chang YC, et al., (2007). The efficacy and safety of topically applied indigo naturalis ointment in patients with plaque-type psoriasis. *Dermatology* 214(2):155-161.
- Linden J, Lensu S, Tuomisto J, et al., (2010). Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance. *Front. Neuroendocrinol.* 31. 452–478.
- Lipson E, Mohammed T, Ogurtsova A, (2017). Basal cell carcinoma: PD-L1/PD-1 checkpoint expression and tumor regression after PD-1 blockade. *J Immun Ther Cancer* (2017) 5:23.
- Lipton SA, Rezaie T, Nutter A, et al., (2016). Therapeutic advantage of pro-electrophilic drugs to activate the Nrf2/ARE pathway in Alzheimer's disease models. *Cell death and disease,* 7(12), e2499.
- Liu X, Du J, Ou Y, Xu H, et al., (2013). Degradation pathway of carnosic acid in methanol solution through isolation and structural identification of its degradation products. *Eur Food Res Technol* (2013) 237:617–626.
- Liu Y, Liang X, Dong W, et al., (2018). Tumor-Repopulating Cells Induce PD-1 Expression in CD8⁺ T Cells by Transferring Kynurenine and AhR Activation. *Cancer Cell.,* 33(3):480-494.
- Liu Y, Liang X, Yin X, et al., (2017). Blockade of IDO kynurenine-AhR metabolic circuitry abrogates IFN- γ -induced immunologic dormancy of tumor-repopulating cells. *Nat Commun.,* 8:15207.
- Liu Z, Wu X, Zhang F, et al., (2013). AhR expression is increased in hepatocellular carcinoma. *J Mol Histol.* 44(4):455–61.
- Lo A, Liang Y, Lin-Shiau S-Y, et al., (2002). Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. *Carcinogenesis.* 23 (6):983–991.
- Longe JL, (2005). *The Gale encyclopedia of alternative medicine*, 2nd ed. Vol. 4. Detroit, MI, Thomson.

- López-Jiménez A, García-Caballero M, Medina M.Á, et al., (2013). Anti-angiogenic properties of carnosol and carnosic acid, two major dietary compounds from rosemary. *Eur. J. Nutr.*, 52. 85–95.
- Lorenzi H, Matos FJ., (2006). *Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas*. Primeira Edição. Instituto Plantarum. Nova Odessa, 512 pp.
- Lu Y, Foo Y, (1999). Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* 51: 91-94.
- Lu YP, Lou YR, Xie JG, et al., (2002). Topical applications of caffeine or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(19):12455–12460,
- Luis JC, Perez RM, Gonzalez FV, (2007). UV-B radiation effects on foliar concentrations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary plants. *Food Chem.* 101: 1211-1215.
- Ma C, Marlowe JL, Puga A, (2009). The aryl hydrocarbon receptor at the crossroads of multiple signaling pathways. *EXS* 99. 231–257.
- Ma Q, (2001). Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: Transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Curr Drug Metab.* 2:149-64.
- Mabeta P, (2020). Paradigms of vascularization in melanoma: Clinical significance and potential for therapeutic targeting. *Biomed. Pharmacother.*, 127:110135.
- Machado DG, Bettio LEB, Cunha MP, et al., (2009). Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Progr Neuro-Psycho Pharm Biol Psych.* 33 (4): 642-650,
- Machado DG, Cunha MP, Neis VB, et al., (2013). Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chem.* 136 (2): 999-1005.
- Macías-Alonso M, Andrés SL, Córdova-Guerrero I et al., (2019). Inhibition of squalene synthase of rat liver by abietane diterpenes derivatives. *Nat Prod Rese*, DOI: 10.1080/14786419.2019.1678614.
- Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK, (1996). *Food Antioxidants*, Marcel Dekker, New York, p. 1.
- Magiatis P, Pappas P, Gaitanis G, et al., (2013). *Malassezia* yeasts produce a collection of exceptionally potent activators of the Ah (dioxin) receptor detected in diseased human skin. *J Inv Dermatol* 133. 2023-2030,
- Mahdy K, Shaker O, Wafay H, et al., (2012). Effect of some medicinal plant extracts on the oxidative stress status in Alzheimer's disease induced in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 16 Suppl 3:31-42.
- Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R, (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem.* 100, 1409–1418.
- Mandal P, (2005). Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *J Comp Physiol B.*, 175: 221–230,
- Mansourabadi AM, Sadeghi HM, Razavi N, et al., (2015). Anti-inflammatory and analgesic properties of salvigenin, *Salvia officinalis* flavonoid extracted. *Adv Herb Med.* 1:31–41.
- Marc EB, Nelly A, Annick DD, et al., (2008). Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *J Ethnopharmacol* 8;120(3):315-34.
- Marin M, Koko V, Duletic-Lausevic A, et al., (2006). Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: morphology, stereology and histochemistry. *South Afr J Bot.* 72: 378-382.
- Marinković, N., Pašalić, D., Ferenčak, G., Gršković, B., & Stavljenić Rukavina, A. (2010). Dioxins and human toxicity. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 61(4), 445–453.
- Markham, Gervase (1615). *The English House-wife.*, Toronto: McGill-Queen's University Press, 1986.
- Marrero JG, Andres SL, Luis JG. (2002). Semisynthesis of rosmanol and its derivatives. Easy access to abietatriene diterpenes isolated from the genus *salvia* with biological activities. *J. Nat. Prod.* 2002. 65. 986-989.

- Martin R, Pierrard C, Lejeune F, et al., (2008). Photoprotective effect of a water-soluble extract of *Rosmarinus officinalis* L. against UV-induced matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts and reconstructed skin. *Eur J Dermatol.* 18(2):128-35.
- Martínez AL, González-Trujano ME, Chávez M, et al., (2012). Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception. *J. Ethnopharmacol.* 142 (1):28-34.
- Martins D, Carrion L, Ramos DF et al., (2013). Triterpenes and the antimycobacterial activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). *Biomed Res Int.* 2013:605831.
- Masaki H et al., (1995). Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol Pharm Bull*, 18:162-166.
- Matloubi F, Moridi M, Amin R, (2000). Carnosol from *Salvia eremophila* Boiss. *DARU J Pharm Sci.* 8 (3-4):45-46
- Matsumoto Y, Ide F, Kishi R, et al., (2007). Aryl hydrocarbon receptor plays a significant role in mediating airborne particulate-induced carcinogenesis in mice. *Environ Sci Technol.* 41:3775-80,
- Mayer B, Baggio KH, Freitas KS, et al., (2009). Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L. *Fitoterapia* 80: 421-426.
- Mayser P, Gaitanis G, (2010). Physiology and Biochemistry. In: Boekhout, T.; Gueho, E.; Mayser, P.; Velegraki, A., editors. *Malassezia* and the Skin. Science and Clinical Practice. Springer; Berlin: 2010,
- McKay M, (2002). Dioxin characterization, formation and minimization during municipal solid waste (MSW) incineration: review. *Chem Eng J* 2002. 86:343-68.
- Mendi A, Yağci BG, Kiziloğlu M, et al., (2017). Effects of *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, and *Salvia triloba* extracts on proliferation and differentiation of dental pulp stem cells. *J Appl Oral Sci.* 25 (5):515-522.
- Merches K, Haarmann-Stemmann T, Weighardt H, et al., (2017). AHR in the skin: From the mediator of chloracne to a therapeutic panacea? *Curr Opin Tox.* 2:79-86.
- Miller AJ, Mihm MC, (2006). Melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 355:51-65.
- Millet Y et al., (1981). Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study. *Clin tox*,18:1485-1498.
- Mills' S, Bone K, Elsevier; St Louis, Missouri, (2005). *The Essential Guide to Herbal Safety*; pp. 558-559.
- Mimura J, Ema M, Sogawa K, et al., (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.*, 13:20-5.
- Mimura J, Inose-Maruyama A, Taniuchi S, et al., (2019). Concomitant Nrf2- and ATF4-activation by Carnosic Acid Cooperatively Induces Expression of Cytoprotective Genes. *Int j mol sci*, 20(7), 1706.
- Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, et al., (1997). Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2:645-54.
- Miraldi E, Giachetti D, Mazzoni G, et al., (2010). Quali-quantitative analysis of eight *Rosmarinus officinalis* essential oils of different origin. First report. *J Siena Acad Sci.* 2 (1): 42-43.
- Miroddi M, Navarra M, Quattropiani MC, et al., (2014). Systematic review of clinical trials assessing pharmacological properties of *Salvia* species on memory, cognitive impairment and Alzheimer's disease. *CNS neurosci & ther*, 20(6): 485-495.
- Mirsadraee M, Tavakoli A, Ghorani V, et al., (2018). Effects of *Rosmarinus officinalis* and *Platanus orientalis* extracts on asthmatic subjects resistant to routine treatments. *Avicenna J Phytomed.* 8 (5):399-407.
- Mitic-Culafic D, Vukovic-Gacic B, Knezevic-Vukcevic J, et al., (2005). Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.) *Arch Biol Sci.* 57:173-178.

- Miura K, Kikuzaki H, Nakatani N, (2002). Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. J Agric Food Chem. 50:1845–1851.
- Mohamed WA, Abd-Elhakim YM, Farouk SM, (2016). Protective effects of ethanolic extract of rosemary against lead-induced hepato-renal damage in rabbits. Exp Toxicol Pathol. 68 (8):451-61.
- Mohammad B. Hossain, Rai D, et al., (2010). Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. J. Agric. Food Chem. 58: 10576–10581.
- Mohammadi-Bardbori A, Bengtsson J, Rannug U, et al., (2012). Quercetin, resveratrol, and curcumin are indirect activators of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). Chem Res Toxicol 25(9):1878–1884.
- Mohebati A, Guttenplan J, Kochhar A, et al., (2012). Carnosol, a Constituent of Zyflamend, Inhibits Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Activation of *CYP1A1* and *CYP1B1* Transcription and Mutagenesis. Cancer Prev Res (Phila), 5(4): 593–602.
- Moldenke H, Moldenke A, (1986). Plants of the Bible. Dover, New York.
- Monakhova B, Kuballa Th, Dirk W, (2011). Rapid Determination of Total Thujone in Absinthe Using ¹H NMR Spectroscopy International Journal of Spectroscopy. I J Spectr, ID 171684: 5.
- Mongold JJ, Camillieri S, Susplugas P, et al., (1991). Activité Cholagogue/ Cholérétique d'un Extrait Liophilisé de Rosmarinus Officinalis L. Plantes Médicinales et Phytothérapie. 25 (1): 6-11.
- Moon DO, Kim MO, Lee JD, (2010). Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. Cancer Lett. 288:183–191.
- Moreno S, Ojeda Sana AM, Gaya M, et al., (2012). Rosemary compounds as nutraceutical health products. In Y. El-Samragy (Ed.), Food additives chapter 9. Rijeka, Croatia: Intech-open Science.
- Moss L, Rouse M, Wesnes KA, et al., (2010). Differential effects of the aromas of Salvia species on memory and mood. Hum Psychopharmacol. 25 (5):388-96.
- Mossi AJ., Cansian RL., Paroul N., et al., (2011). Morphological characterisation and agronomical parameters of different species of Salvia sp. (Lamiaceae). Braz J Biol. 71 (1): 121-9.
- Mulinacci N, Innocenti M, Bellumori M, et al., (2011). Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: an HPLC/DAD/MS study. Talanta. 85 (1): 167-176.
- Muñoz-Centeno L, (2002). Plantas medicinales españolas :Medicinales Españolas: *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae). Ediciones Universidad de Salamanca, Salamanca, Espana.
- Murino Rafacho BP, Portugal Dos Santos P, Gonçalves AF, et al., (2017). Rosemary supplementation (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuates cardiac remodeling after myocardial infarction in rats. PLoS One. 12 (5): e0177521.
- Murray IA, Patterson AD, Perdew GH, (2014). Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. Nat Rev Cancer, 14(12):801–814.
- Nadkarni's. Indian Materia Medica. Bombay, Popular Prakashan Pvt. Ltd. Reprinted 1999; Vol 1.
- Naemura A, Ura M, Yamashita T, et al., (2008). Long-term intake of rosemary and common thyme herbs inhibits experimental thrombosis without prolongation of bleeding time. Thrombosis Res. 122 (4): 517-522.
- Nakatsuru Y, Wakabayashi K, Fujii-Kuriyama Y, et al., (2004). Dibenzo[a,l]pyrene-induced genotoxic and carcinogenic responses are dramatically suppressed in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. Int. J. Cancer 112. 179-183.
- Napolitano M, Patruno C, (2018). Aryl hydrocarbon receptor (AhR) a possible target for the treatment of skin disease. Med Hypotheses., 116:96-100,

- Nebert DW, Puga A, Vasiliou V, (1993). Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 685:624-40,
- Negi PS, (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *International J Food Microbiol.* 156 (1): 7-17.
- Nematolahi P, Mehrabani M, Karami-Mohajeri S, et al., (2018). Effects of *Rosmarinus officinalis* L. on memory performance, anxiety, depression, and sleep quality in university students: A randomized clinical trial. *Comple Ther Clin Pract.* 30:24-28.
- Newall CA et al., (1996) eds. Herbal medicines. A guide for health-care professionals. London, Pharmaceutical Press.
- Ngo SN, Williams DB, Head RJ, (2011). Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 51 (10):946-54.
- Nicolella H, Senedese J, Furtado R, et al., (2015). Evaluation of anti-inflammatory potential of diterpene manool in macrophages by quantification of nitric oxide. *J Int Soc Antiox Nutr Health.* 1:124-128.
- Nikolić B, Mitić-čulafić D, Vuković-Gačić B, (2011). The antimutagenic effect of monoterpenes against UV-irradiation-, 4NQO- and T-BOOH-induced mutagenesis in coli. *Arch Biol Sci Belgr.* 63:117-128.
- Ninomiya K., Matsuda H, Shimoda H, et al., (2004). Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorg & Med Chem Letts,* 14: 1943-1946.
- Nishizaki Y, Masumoto N, Nakajima K, et al., (2019). Relative molar sensitivities of carnosol and carnosic acid with respect to diphenylamine allow accurate quantification of antioxidants in rosemary extract. *Food Additives & Contaminants: Part A,* 36:2. 203-211.
- Nobile V, Michelotti A, Cestone E, et al., (2016). Skin photoprotective and antiageing effects of a combination of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) polyphenols. *Food Nutr Res.* 60:31871.
- Nozedar A, (2008). *Element Encyclopedia of Secret Signs and Symbols.* HarperCollins Publishers, London.
- Nusier MK, Bataineh, HN, Daradkah HM, (2007). Adverse effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on reproductive function in adult male rats. *Exp Biol Med.* 232: 809-813.
- Offord EA, Macé K, Ruffieux C, et al., (1995). Rosemary components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis,* 16(9):2057-62.
- Ogawa T, Ishitsuka Y, Inoue S, (2020). Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) Regulates Epidermal Keratinization under Psoriatic Skin Inflammation. *Am J Pathol.,* 190(3):577-585.
- Ojeda-Sana AM, Van Baren CM, Elechosa MA, et al., (2013). New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control.* 31 (1):189-195.
- Okamura N, Fujimoto Y, Kuwabara S, et al., (1994). High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *J Chromatogr A,* (2) 679: 381-386.
- Olson JR, (1994). Pharmacokinetics of dioxin and related chemicals. In *Dioxins and Health.* A. Schechter, ed. New York, NY: Plenum Press, 163-167.
- Onlooker, (1995). Sage against age. *Pharm J,* 255 (25): 708.
- Opinion of the Scientific Committee on Food on Thujone. Brussels, European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 2003 (SCF/CS/FLAV/FLAVOUR/23 ADD2 Final, 6 February).
- Opinion of the Scientific Committee on Food on thujone. Brussels, European Commission, Scientific Committee on Food, 2002.

- Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, et al., (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478(7368):197–203.
- Orhan I, Aslan M, (2009). Appraisal of scopolamine-induced anti-amnesic effect in mice and *in vitro* anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. *J Ethnopharmacol.*122(2):327-332.
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, et al., (2004). Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis*. 25:549–557.
- Ozarowski M, Mikolajczak PL, Bogacz A, et al., (2013). *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia*, 91: 261-271.
- Paek JH, Shin KH, Kang YH, et al., (2013). Rapid identification of aldose reductase inhibitory compounds from *Perilla frutescens*. *Biomed Res Int*. 2013:679463.
- Paghdal KV, Schwartz RA, (2009). Topical tar: back to the future. *J Am Acad Dermatol.*, 61:294–302.
- Palermo CM, Hernando JL, Dertinger SD, (2003). Identification of potential aryl hydrocarbon receptor antagonists in green tea. *Chem Res Toxicol* 16(7):865–872.
- Panahi Y, Taghizadeh M, Marzony ET, et al., (2015). Rosemary oil vs minoxidil 2% for the treatment of androgenetic alopecia: a randomized comparative trial. *Skinmed*. 13 (1):15-21.
- Panda H, (2009). Compendium of Herbal Plants. Asia Pacific Business Press, New-Delhi, India, 172.
- Pandey P, Singh S, Banerjee S, (2019). *Ocimum basilicum* suspension culture as resource for bioactive triterpenoids: yield enrichment by elicitation and bioreactor cultivation. *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 137: 65–75.
- Panteleyev AA, Bickers DR, (2006). Dioxin-induced chloracne--reconstructing the cellular and molecular mechanisms of a classic environmental disease. *Exp Dermatol*. 15(9):705–30,
- Papageorgiou V, Gardeli C, Mallouchos A, et al., (2008). Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. *J Agric Food Chem*. 56 (16): 7254-7264.
- Park SY, Song H, Sung M, et al., (2014). Carnosic Acid Inhibits the Epithelial-Mesenchymal Transition in B16F10 Melanoma Cells: A Possible Mechanism for the Inhibition of Cell Migration. *Int. J. Mol. Sci*. 2014. 15. 12698–12713.
- Patenković A, Stamenković-Radak M, Banjanac T, et al., (2009). Antimutagenic effect of sage tea in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Tox*. 47:180–183.
- Pedro DF, Ramos AA, Lima CF, et al., (2016). Colon cancer chemoprevention by sage tea drinking: decreased DNA damage and cell proliferation. *Phytother Res*. 30:298–305.
- Pelclová D, Urban P, Preiss J, et al., (2006). Adverse health effects in humans exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Rev Environ Health*. 21(2):119-38.
- Peng CH, Su JD, Chyau CC, et al., (2007). Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. *Biosci Biotech Biochem*. 71(9): 2223-2232.
- Perfumi M, Arnold N, Tacconi R, (1991). Hypoglycemic activity of *Salvia fruticosa* Mill. from Cyprus. *J Ethnopharmacol* 34 (2–3), 135–140,
- Perry NSL, Menzies R, Hodgson F, et al., (2018). A randomised double-blind placebo-controlled pilot trial of a combined extract of sage, rosemary and melissa, traditional herbal medicines, on the enhancement of memory in normal healthy subjects, including influence of age. *Phytomedicine*. (15) 39:42-48.
- Pesavento G, Calonico C, Bilia R, et al., (2015). Antibacterial activity of oregano, *Rosmarinus* and thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meat balls. *Food Control*. (54):188-199.

- Peter KV, (2012). Introduction to herbs and spices: medicinal uses and sustainable production. In K. V. Peter (Ed.), Handbook of herbs and spices (pp. 1-15).
- Petiwala SM, Johnson JJ, (2015). Diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): Defining their potential for anti-cancer activity. *Cancer letts*, 367(2), 93–102.
- Petrolini FV, Lucarini R, de Souza MG, et al., (2013). Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. *Braz J Microbiol*. 4(3):829-34.
- Pharmacopée Française. Rosmarin. 1989.
- Physicians' Desk Reference (PDR) for Herbal Medicines. 3rd ed. Thompson; Montvale, NJ, (2004). pp. 698–701.
- Pintore G, Usai M, Bradesi P, et al., (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flav Fragra J*. 17: 15-19.
- Pliny the elder, (1951). *Natural History*, Leob Classical Library, vol. VI, tr. Jones, W.H.S., pp: 399.
- Pollet M, Shaik S, Mescher M, et al., (2018). The AHR represses nucleotide excision repair and apoptosis and contributes to UV-induced skin carcinogenesis. *Cell Death Differ.*, 25:1823–36.
- Polunin O, (1980). *Flowers of Greece and the Balkans*. Oxford University Press, Oxford.
- Pra VD, Bisol LB, Detoni S, et al., (2011). Anti-inflammatory activity of fractionated extracts of *Salvia officinalis*. *J Appl Pharm Sci*. 1:67–71.
- Proença A, Roque O, (2008). *Salvia trilobada*. In *Plantas medicinais da Farmacopeia Portuguesa*, Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 583-585.
- Puga A, Ma C, Marlowe JL, (2009). The aryl hydrocarbon receptor crosstalks with multiple signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol*. 77:713–722.
- Pukalskas A, Teris, Van Beek A, De Waard P, (2005). Development of a triple hyphenated HPLC–radical scavenging detection–DAD–SPE–NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts. *J Chrom A*, 1074: 81–88
- Qnais EY, Abu-Dieyeh M, Abdulla FA, (2010). The antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Salvia officinalis* leaf aqueous and butanol extracts. *Pharm Biol*. 48:1149–1156.
- Ramos AA, Azqueta A, Pereira-Wilson C, et al., (2010). Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. *J Agr Food Chem*. 58 (12): 7465-7471
- Ramos AA, Pedro D, Collins AR, et al., (2012) Protection by *Salvia* extracts against oxidative and alkylation damage to DNA in human HCT15 and CO115 cells. *J Tox Envir Health A*. 75(13-15):765-775.
- Rannug A, Rannug U, (2018). The tryptophan derivative 6-formylindolo[3.2-b] carbazole, FICZ, a dynamic mediator of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling, balances cell growth and differentiation. *Crit Rev Toxicol*. 48(7):555-574.
- Rannug, A, Fritsche E, (2006). The aryl hydrocarbon receptor and light. *Biol. Chem*. 387. 1149–1157.
- Rao MS, Subbarao V, Prasad JD, et al., (1988). Carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the Syrian golden hamster. *Carcinogenesis*, 9:1677–9.
- Rauter AP, Dias C, Martins A, et al., (2012). Non-toxic *Salvia sclareoides* Brot. extracts as a source of functional food ingredients: phenolic profile, antioxidant activity and prion binding properties. *Food Chem*. 132. 1930–1935.
- Rea MA, Zhao L, Qin Q, et al., (2006). Spontaneous immortalization of human epidermal cells with naturally elevated telomerase. *J. Invest. Dermatol*. 126. 2507–2515.
- Ren Z, Zheng M, (2009). Impact of human activities on dioxins emissions at national scale. *Chemosphere*, 76:853-9.

- Riahi L, Chograni H, Elferchichi M, et al., (2013). Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities. *Industr Crops Prods.* 46: 290-296.
- Ribeiro-Santos R, Carvalho-Costa D, Cavaleiro C et al., (2015). A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends Food Sci & Technolo* 45 (2), 355-368.
- Rice-Evans C., Miller A, Paganga G, (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free rad Biolo Med.*,20: 933-956.
- Richheimer SL, Bernart MW, King GA, et al., (1996). Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. *J Am Oil Chem Soc* 73:507–514
- Rivera D, Obon C, Cano F, (1994). The botany, history and traditional uses of three-lobed Sage (*Salvia fruticosa* Miller) (Labiatae). *Econ Bot* 48(2). 190-195.
- Roby M, Khaled A, Khalel A, et al., (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industr Crops Prods*, 43: 827–831.
- Rodrigues MR, Kanazawa LK, das Neves TL, (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. *J Ethnopharmacol.* 139:519–526.
- Rodriguez-Meizoso I, Cifuentes A, San Roman J, et al., (2007). A systematic study on the interactions between carnosic acid and ethylpyrrolidine methacrylate–methyl methacrylate copolymer in supercritical media. *J. Supercrit Fluids* 41: 452–460,
- Román GC, Jackson RE, Reis J, et al., (2019). Extra-virgin olive oil for potential prevention of Alzheimer disease. *Revue neurologique*, 175(10): 705–723.
- Romano CS, Abadi K, Repetto V, et al., (2009). Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chem*, 115 (2): 456-461.
- Romo Vaquero M, Yáñez-Gascón M-J, García Villalba R, et al. (2012). Inhibition of gastric lipase as a mechanism for body weight and plasma lipids reduction in Zucker rats fed a rosemary extract rich in carnosic acid. *PLoS ONE.* 7 (6): e39773.
- Roseblade A, Ung A, Bebawy M, (2017). Synthesis and *in vitro* biological evaluation of thiosulfinate derivatives for the treatment of human multidrug-resistant breast cancer. *Acta Pharmacol. Sin.*: 38. 1353–1368.
- Rosenbaum CC, O' Mathúna DP, Chavez M, et al., (2010). Antioxidants and antiinflammatory dietary supplements for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Altern. Ther. Health Med.*16 (2):32–40,
- Rozman T, Jersek B. (2009). Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta Agriculturae Slovenica.* 93(1): 51-58.
- Russo A, Formisano C, Rigano D, (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food Chem Tox.* 55:42–47.
- Sá CM, Ramos AA, Azevedo MF, et al., (2009). Sage tea drinking improves lipid profile and antioxidant defences in humans. *Int J Mol Sci.* 10:3937–3950,
- Salah SM, Jäger AK, (2005). Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J Ethnopharmacol.* 97 (1): 145-149.
- Samman S, Sandström B, Toft MB, et al., (2001). Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. *Am J Clin Nutr.* 71:607-612.
- Sanches-Silva A, Costa D, Albuquerque TA, et al., (2014). Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 31 (3):374-395.
- Sancheti G, Goyal P, (2006a). Modulatory influence of *Rosmarinus officinalis* on DMBA-induced mouse skin tumorigenesis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 7. 331–335.

- Sancheti G, Goyal PK, (2006b). Effect of *Rosmarinus officinalis* in modulating 7.12-dimethylbenz(a)anthracene induced skin tumorigenesis in mice. *Phytother. Res.* 20, 981–986.
- Sanchez-Camargo ADP, Valdes A, Sullini G, et al. (2014). Two-step sequential supercritical fluid extracts from rosemary with enhanced anti-proliferative activity. *J Funct Foods.* 11: 293-303.
- Santayana M, Heinrich M, (2006). The historical evolution of the medicinal use of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), a Spanish panacea. *J. Pharm. Pharmacol.* 58: A81.
- Saraswathy A, Vidhya B, Amala K, (2012). Apigenin-4', 7-dimethyl ether from *Aquilaria agallocha roxb.* *Indian drugs* 49(10):30-32
- Sasaki K, El Omri A, Kondo S, et al., (2013). *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. *Behav Brain Res.* 238: 86-94.
- Sasikumar B, (2012). Rosemary. In K. V. Peter (Ed.), *Handbook of herbs and spices* (pp. 452-468).
- Sato Y, Fujimura T, Tanita K, et al., (2019). *Malassezia* derived aryl hydrocarbon receptor ligands enhance the CCL20/ Th17/soluble CD163 pathogenic axis in extra-mammary Paget's disease. *Exp Dermatol.*, 28:933–39.
- Satoh T, Kosaka K, Itoh K, et al., (2008). Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both *in vitro* and *in vivo* through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1. *J neurochem*, 104(4), 1116–1131.
- Savelev SU, Okello EJ, Perry EK., (2004). Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytother Res* 18:315–324.
- Sawalha AF, Sweileh WM, Zyoud SH, et al., (2008). Self-therapy practices among university students in Palestine: focus on herbal remedies. *Compl Ther Med.* 16 (6): 343-349.
- Schauenberg P, Paris F, (1990). *Guide to Medicinal Plants*. First paperback edition (Paris 1974).
- Scheckel KA, Degner SC, Romagnolo DF, (2008). Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines. *J Nutr.* 138:2098–2105.
- Schilcher H, (1985). Effects and side-effects of essential oils. In: Svendsen, B., Scheffer, J.J.C. (Eds.), *Essential Oils and Aromatic Plants*. Junk, Dordrecht, The Netherlands, pp.217–231.
- Schiller C, Schiller D, (2008). *The Aromatherapy Encyclopedia*. Basic Health Publications, INC., Laguna Beach.
- Schnitzlera P, Nolkemper S, Stintzing FC, et al., (2008). Comparative *in vitro* study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. *Phytomedicine* 15: 62-70,
- Scholey AB, Tildesley NT, Ballard CG, et al., (2008). An extract of *Salvia* (sage) with anticholinesterase properties improves memory and attention in healthy older volunteers. *Psychopharmacol (Berl)*. 198 (1):127-139.
- Schröder S, Beckmann K, Franconi G, (2013). Can medical herbs stimulate regeneration or neuroprotection and treat neuropathic pain in chemotherapy-induced peripheral neuropathy? *E-Based Compl Altern Med.* 2013:423713.
- Schwartz K, Ternes W, (1992). Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. I. Determination of phenolic diterpenes with antioxidative activity amongst tocochromanols using HPLC. *Z. Leben. -Unters. -Forsch.* 195: 95-98.
- Schwartz K, Ternes W, Schmauderer E (1992). Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. III. Stability of phenolic diterpenes of rosemary extracts under thermal stress as required for technological processes. *Z. Leben. -Unters. -Forsch.* 195: 104-107.
- Schwarz K, Ternes W (1992). Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. *Z Leben Unters Forsch* 195:99–103.

- Seebacher W, Simic N, Robert Weis R, et al., (2003). Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR resonances of oleanolic acid, 18α -oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. *Magn. Reson. Chem.* 41: 636–638.
- Senol FS, Orhan I, Celep F, et al, (2010). Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. *Food Chem.* 120:34-43.
- Seok SH, Ma ZX, Feltenberger JB, et al., (2018). Trace derivatives of kynurenine potentially activate the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *J Biol Chem.* 293(6):1994-2005.
- Sertel S, Eichhorn T, Plinkert PK, et al., (2011). Anticancer activity of *Salvia officinalis* essential oil against HNSCC cell line (UMSCC1). *HNO*, 59:1203–1208.
- Shafiee-Nick R, Ghorbani A, Vafae Bagheri F, (2012). Chronic administration of a combination of six herbs inhibits the progression of hyperglycemia and decreases serum lipids and aspartate amino transferase activity in diabetic rats. *Adv Pharmacol Sci.* 2012:789796.
- Shaiq Ali M, Dardass AKY, Ahmada S, et al., (2000). Two new diterpenoids from *Salvia triloba*. *Fitoterapia* 71:347-352.
- Sharmila R, Manoharan S, (2012). Anti-tumor activity of rosmarinic acid in 7.12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Indian J Exp Biol.* 50:187–194.
- Sherr DH, Monti S, (2013). The role of the aryl hydrocarbon receptor in normal and malignant B cell development. *Semin Immunopathol.* 35(6):705–16.
- Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, (200). Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:779–82.
- Shin H-B, Choi M-S, Ryu B, et al. (2013). Antiviral activity of carnosic acid against respiratory syncytial virus. *Virology* 453(1):303.
- Shun-Hua Wu, Hong-Jie Z, Zhong-Wen L, et al., (1993). Terpenoids from *Isodon grandifolia* var. *atuntzensis*. *Phytochemistry* 34 (4): 1176-1178.
- Simić D, Vuković-Gačić B, Knežević-Vukčević J, (1998). Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. *Mut Res.* 402:51–57.
- Simmler C, Napolitano J, McAlpine J, (2014). Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 25: 51-59.
- Sivropoulou A, Nikolaou C, Papanikolaou E, (1997). Antimicrobial, Cytotoxic, and Antiviral Activities of *Salvia fruticosa* Essential Oil. *J Agric Food Chem.* 45:3197-3201.
- Smidling D, Mitic-Culafic D, Vukovic-Gacic B, et al., (2008). Evaluation of antiviral activity of fractionated extracts of *Salvia officinalis* L. *Archives of Biological Sciences*, 60(3).
- Smith SH, Jayawickreme C, Rickard DJ, et al., (2017). Tapinarof is a natural AhR agonist that resolves skin inflammation in mice and humans. *J Invest Dermatol.*, 137(10):2110-2119.
- Sokovic M, Tzakou O, Pitarokili D, et al., (2002). Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. *Nahrung.* 46 (5): 317–320,
- Solhi H, Salehi B, Alimoradian A, et al., (2013). Beneficial Effects of Rosmarinus Officinalis for Treatment of Opium Withdrawal Syndrome during Addiction Treatment Programs: A Clinical Trial. *Addict Health.* 5 (3-4):90-4.
- Sorg O, (2014). AhR signalling and dioxin toxicity. *Toxicol Lett.*, 230(2):225-33.
- Sorg O, Zennegg M, Schmid P, et al., (2009). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) poisoning in Victor Yushchenko: identification and measurement of TCDD metabolites. *Lancet*, 374:1179-85
- Soshilov AA, Denison MS, (2014). DNA binding (gel retardation assay) analysis for identification of aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists and antagonists. In *Methods in Pharmacology and Toxicology*, pp.207-219.

- Souza CRF, Schiavetto IA, Thomazini FCF, et al., (2008). Processing of *Rosmarinus officinalis* L extract on spray and spouted bed dryers. *Brazil J Chem Engin.* 25 (01):59-69.
- Stahl-Biskup E, Wichtl M, Loew D., (2008). *Salviae trilobae folium*. Teedrogen und Phytopharmaka - Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. 5th ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2008. 596-597.
- Stefanovits-Banyai E, Tulok MH, Hegedus A, et al., (2003). Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. *Acta Biologica Szegediensis.* 47:111-113.
- Stevens EA, Mezrich JD, Bradfield CA, (2009). The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology* 127(3):299-311.
- Stockinger B, Di Meglio P, Gialitakis M, et al., (2014). The aryl hydrocarbon receptor: Multitasking in the immune system. *Ann. Rev. Immunol.:* 32. 403-432.
- Strabao Walahfrid, (1966). C.A.D. 843-48. Hortulus, tr. Raef Payne. Pittsburgh, Penn.: Hunt Botanical Library, pp: 30-81.
- Sun S, Jin M, Zhou X, et al., (2017). The application of quantitative ¹H-NMR for the determination of orlistat in tablets. *Molecules.* 22, 1517.
- Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN, (2018). Regulation and function of the PD-L1 checkpoint. *Immunity.* 48:434-52.
- Sut S, Poloniato G, Malagoli M, et al., (2018). Fragmentation of the main triterpene acids of apple by LC-APCI-MSn . *J Mass Spectrom.* 53:882-892.
- Sutton J, (1999), *Guide du jardinier à la culture Salvias*, Timber Press.
- Swanson HI, (2004). Cytochrome P450 expression in human keratinocytes: an aryl hydrocarbon receptor perspective. *Chem Biol Interact.,* 149:69-79.
- Szumny A, Figiel A, Gutierrez-Ortiz A, et al., (2010). Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. *J Food Eng.* 97(2): 253-260,
- Tada M, Okuno K, Chiba K, (1994). Antiviral diterpens from *Saliva officinalis*. *Phytochemistry.* 35:539-541.
- Tagliabue G, Faber S, Motta SC, et al., (2019). Modeling the binding of diverse ligands within the Ah receptor ligand binding domain. *Sci Rep* 9. 10693.
- Tai J, Cheung S, Wu M, et al., (2012). Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells *in vitro*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology.* 19(5):436-443.
- Takei K, Hashimoto-Hachiya A, Takahara M, et al., (2015). Cynaropicrin attenuates UVB-induced oxidative stress via the AhR-Nrf2-Nqo1 pathway. *Toxicol. Lett.:* 234. 74-80,
- Takei K, Mitoma C, Hashimoto-Hachiya A, et al., (2015). Antioxidant soybean tar Glyteer rescues T-helper-mediated downregulation of filaggrin expression via aryl hydrocarbon receptor. *J. Dermatol.:* 42. 171-180,
- Takenaka M, Watanabe T, Sugahara K, et al., (1997). New antimicrobial substances against streptomyces scabies from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Biosci, Biotech Biochem,* 61 (9): 1440-1444.
- Tang H, Liang Y, Anders RA, et al., (2018). PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest.* 128:580-588.
- Tauchi M, Hida A, Negishi T, et al., (2005). Constitutive expression of aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes causes inflammatory skin lesions. *Mol Cell Biol.,* 25(21):9360-9368.
- Teixeira B, Marques A, Ramos C, et al., (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industr Crops Prodts.* 43 (1): 587-595.
- Ternes W, Schwarz K, (1995). Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. IV. Determination of carnosic acid in different foodstuffs. *Z. Lebensm Unters. Forsch.* 201. 584-550

- Teruel MR, Garrido MD, Espinosa MC, et al., (2015). Effect of different format-solvent rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis*) on frozen chicken nuggets quality. *Food Chem.* 172:40-46.
- Tigges J, Haarmann-Stemann T, Vogel CF, et al., (2014). The new aryl hydrocarbon receptor antagonist E/Z-2-benzylindene-5,6-dimethoxy-3,3-dimethylindan-1-one protects against UVB-induced signal transduction. *J Invest Dermatol.*, 134(2):556-9.
- Tisserand R, Balacs T, (1995). *Essential Oil Safety*. Churchill Livingstone, Edinburgh, United Kingdom
- Todorov S, Philianos S, Petkov V, et al., (1984). Experimental pharmacological study of three species from genus *Salvia*. *Acta Physiol PharmBulg.* 10 (2): 13-20,
- Tong X, Ma Y, Quan D, et al., (2017). Rosemary Extracts Upregulate Nrf2, Sestrin2, and MRP2 Protein Level in Human Hepatoma HepG2 Cells. *E-Based Compl Altern Med.* 2017: 7359806.
- Topcu G, Ozturk M, Kusman T, et al., (2013). Terpenoids, essential oil composition, fatty acid profile, and biological activities of Anatolian *Salvia fruticosa* Mill. *Turk J Chem.* 37: 619 – 632
- Tosun M, Ercisli S, Sengul M, et al., (2009). Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. *Biol. Res.* 42. 175–181.
- Tsekos I, Moustakas M, (1998). *Progress in Botanical Research*. Springer. p. 66.
- Tsuji G, Takahara M, Uchi H et al., (2012) Identification of ketoconazole as an AhR–Nrf2 activator in cultured human keratinocytes: the basis of its anti-inflammatory effect. *J Invest Dermatol* 132:59–68.
- Tucakov J. (1990). *Healing with plants*. Rad, Beograd, 576-578.
- Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, et al., (2017). Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2017. 85(1):36-43
- Ugurlu E, Secmen O, (2008). Medicinal plants popularly used in the villages of Yunt Mountain (Manisa-Turkey). *Fitoterapia* 79. 126–131.
- Ulbricht C, Abrams TR, Brigham A, et al., (2010). An evidence-based systematic review of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) by the natural standard research collaboration. *J Diet Suppl* 7(4): 351-413.
- Ulubelen A, (1990). New Diterpenoids from the Roots of *Salvia triloba*. *Planta Med.* 56 (1): 82-83.
- Vagi E, Rapavi E, Hadolin M, et al., (2005). Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. *J Agric Food Chem* 53:17-21.
- Valavanidis A, (2019). NOBEL PRIZE 2018: Discovery of Cancer Therapy by Inhibition of Negative Immune Regulation. New class of drugs for activated immune system as an effective strategy for harnessing attacks on cancerous cells. *Pharmakeftiki*, 31. IV: 169-178.
- Valdes A, García-Canas V, Rocamora-Reverte L, et al., (2012α). Effect of rosemary polyphenols on human colon cancer cells: transcriptomic profiling and functional enrichment analysis. *Genes Nutr.* 8 (1):43-60,
- Valdes A, Simo C, Ibanez C, et al., (2012β). Effect of dietary polyphenols on K562 leukaemia cells: a foodomics approach. *Electrophoresis.* 33 (15):2314-2327.
- Valnet J, (1990). *Aromatherapie*, Maloine. S.A. Publishers, Paris, pp. 338–343.
- Valones MA, Higino JS, Souza PR, et al., (2016). Dentifrice Containing Extract of *Rosmarinus officinalis* Linn.: An Antimicrobial Evaluation. *Braz Dent J.* 27 (5):497-501.
- Van den Bogaard EH, Bergboer JG, Vonk-Bergers M, et al., (2013). Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *J Clin Invest.* 123(2):917-27.
- Vandecasteele K, Ost P, Oosterlinck W, et al., (2012). Evaluation of the efficacy and safety of *Salvia officinalis* in controlling hot flashes in prostate cancer patients treated with androgen deprivation. *Phytother Res.* 26 (2):208-13.

- Veličković DT, Randelović NV, Ristić MS, et al., (2003). Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L. J Serb Chem Soc. 68:17–24.
- Vicente G, Molina S, Gonzalez-Vallinas M, et al. (2013). Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression. J Supercrit Fluids. 79:101-108.
- Villano C, Murphy K, Akintobi A, et al., (2006). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells. Tox Appl Pharm. 210, (3): 212-224.
- Vitaliano PP, Urbach F, (1980). The relative importance of risk factors in nonmelanoma carcinoma. Arch Dermatol. 116:454–6.
- Vlachos C, Schulte BM, Magiatis P, et al., (2012). Malassezia-derived indoles activate the aryl hydrocarbon receptor and inhibit Toll-like receptor-induced maturation in monocyte-derived dendritic cells. Br J Dermatol. 167:496–505.
- Von Schoen-Angerer T, Deckers B, Henes J, et al., (2018). Effect of topical rosemary essential oil on Raynaud phenomenon in systemic sclerosis. Compl Ther Med. 40:191-194.
- Vujošević M, Blagojević J, (2004). Antimutagenic effects of extracts from sage (*Salvia officinalis*) in mammalian system *in vivo*. Acta Vet Hung. 52:439–443.
- Vuković-Gačić B, Nikčević S, Berić-Bjedov T, (2006). Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Chem Toxicol. 44:1730–1738.
- Walch SG, Kuballa Th, Stühlinger W et al., (2011). Determination of the biologically active flavour substances thujone and camphor in foods and medicines containing sage (*Salvia officinalis* L.). Chem Centr J. 5:44.
- Walczak K, Langner E, Makuch-Kocka A, et al., (2020). Effect of Tryptophan-Derived AhR Ligands, Kynurenine, Kynurenine Acid and FICZ, on Proliferation, Cell Cycle Regulation and Cell Death of Melanoma Cells- *in vitro* Studies. Int J Mol Sci. 21(21):7946.
- Wang D, Chen T, Liu F, (2018). Betulinic acid alleviates myocardial hypoxia/reoxygenation injury via inducing Nrf2/HO-1 and inhibiting p38 and JNK pathways. Eur j pharm. 838. 53–59.
- Wang GZ, Zhang L, Zhao XC, et al., (2019). The Aryl hydrocarbon receptor mediates tobacco-induced PD-L1 expression and is associated with response to immunotherapy. Nat Commun.: 10,1125.
- Wang K, Li Y, Jiang YZ, et al. (2013). An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand inhibits proliferation and migration of human ovarian cancer cells. Cancer Lett. 340(1):63–71.
- Wang K, Lv Q, Miao YM, et al., (2018). Cardamonin, a natural flavone, alleviates inflammatory bowel disease by the inhibition of NLRP3 inflammasome activation via an AhR/Nrf2/NQO1 pathway. Biochem. Pharmacol.: 155. 494–509.
- Wang LH, Wang CC, Kuo SC, (2007). Vehicle and enhancer effects on human skin penetration of aminophylline from cream formulations: evaluation *in vivo*. J Cosmet Sci. 58:245-254.
- Wang W, Li N, Luo M, et al., (2012). Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. Molecules. 17(3):2704–2713.
- Wanga H, Chengb J, Yangb SH et al., (2020). Rosemary extract reverses oxidative stress through activation of Nrf2 signaling pathway in hamsters fed on high fat diet and HepG2 cells. J Funct Foods, 74: 104136.
- Whitlock JP, (1999). Induction of cytochrome P4501A1. Ann Rev Pharmacol Toxicol. 39:103-125.
- WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 4, (2009) p. 294.
- Wichtl M, (2004). *Salvia officinalis* folium. In Wichtl M, editor. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. A Handbook for Practice on a Scientific Basis. 3rd ed. Medpharm, Stuttgart, 538-542.

- Wincent E, Amini N, Luecke S, et al., (2009). The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b] carbazole is present in humans with a wide range of affinities. *J Biol Chem.*, 284(5):2690–2696.
- Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105:940-949.
- Wong ML, Medrano JF, (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39. 75–85.
- Woodward M. (1994). *Gerard's Herbal: The History of Plants*. Senate Books, London, United Kingdom.
- World Health Organization (WHO). Executive summary. Assessment of health risks of dioxins: re-evaluation of the Tolerable daily intake (TDI). Geneva: WHO, 1998.
- Wright EJ, De Castro KP, Joshi AD, et al., (2017). Canonical and non-canonical aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Curr Opin Toxicol.*, 2:87–92.
- Wu C, Li H, (1982). On the evolution and distribution in Labiatae. *Acta Bot Yun* 4:97–118.
- Xavier CP, Lima CF, Fernandes-Ferreira M, et al., (2009). *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis* and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutr Cancer.* 61 (4): 564-71.
- Xiao C, Dai H, Liu H, et al., (2008). Revealing the metabonomic variation of rosemary extracts using 1H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *J. Agric. Food Chem.* 56 :10142–10153
- Xiaojuan Liu, Jiquan Du, Yangwen Ou, et al., (2013). Degradation pathway of carnosic acid in methanol solution through isolation and structural identification of its degradation products. *Eur Food Res Technol* 237. 617–626.
- Xu L, Zhang Y, Tian K, et al., (2018). Apigenin suppresses PD-L1 expression in melanoma and host dendritic cells to elicit synergistic therapeutic effects. *J Exp Clin Cancer Res* 37. 261.
- Xu Y, Jiang Z, Ji G, (2010). Inhibition of bone metastasis from breast carcinoma by rosmarinic acid. *Planta Med.* 76:956–962.
- Yamahara M, Sugimura K, Kumagai A, et al., (2016). *Callicarpa longissima* extract, carnosol-rich, potently inhibits melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *J Nat Med.* 70:28–35
- Yamamoto J, Yamada K, Naemura A, et al., (2005). Testing various herbs for antithrombotic effect. *Nutrition.* 21 (5): 580-587.
- Yan M, Vemu B, Veenstra J, et al., (2018). Carnosol, a dietary diterpene from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) activates Nrf2 leading to sestrin 2 induction in colon cells. *Int mol med*, 5(4), 10,
- Yaniv Z., Dafni A., Friedman J., et al., (1987). Plants used for the treatment of diabetes in Israel. *J Ethnopharmacol.* 19 (2): 145-151.
- Yesil-Celiktas O, Sevimli C, Bedir E, et al., (2010). Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Hum Nutr.* 65:158–163.
- Yildirim A, Mavi A, Oktay M, et al., (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC), sage (*Salvia triloba* l.), and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *J Agric Food Chem.* 48 (10): 5030-5034.
- Yili A, Mutalipu, Aisa H, et al., (2009). Betulinic acid and sterols from *Astragalus altaicus*. *Chemistry of Natural Compounds* 45(4):592-594
- Yöney A, Prieto JM, Lardos A, et al., (2010). Ethnopharmacy of Turkish-speaking Cypriots in Greater London. *Phytother Res.* 24 (5): 731-740,
- Yu Y-M, Lin H-C, Chang W-C, (2008). Carnosic acid prevents the migration of human aortic smooth muscle cells by inhibiting the activation and expression of matrix metalloproteinase-9. *Br. J. Nutr.* 100 (4):731–738.
- Zanella CA, Treichel H, Cansian RL, et al., (2012). The effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) (Lamiaceae) in animal models of memory. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 48 (3):389–397.

- Zaouali Y, Bouzaine T, Boussaid M, (2010). Oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem Toxicol.* 48:3144-3152.
- Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, et al., (2016). Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *New Engl J Med*, 375(9), 819-829.
- Zeidán-Chuliá F, Rybarczyk-Filho JL, Gursoy M, (2012). Bioinformatical and *in vitro* approaches to essential oil-induced matrix metalloproteinase inhibition. *Pharm Biol.* 50 (6): 675-86.
- Zeng HH, Tu PF, Zhou K, et al., (2001). Antioxidant properties of phenolic diterpenes from *Rosmarinus officinalis*. *Acta Pharm. Sin.* 22 (12):1094-1098.
- Zgorka G, Glowniak K, (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *J Pharm Biomed Anal* 26:79-87.
- Zhang Y, Smuts JP, Dodbiba E, et al., (2012). Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. *J Agric Food Chem* 60:9305-9314.
- Zhao B, Bohonowych JES, Timme-Laragy A, et al., (2013). Common commercial and consumer products contain activators of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, *PloS One* 8 (2), e56860,
- Zhao Y, Harrison D, Song Y, et al., (2018). Antigen-Presenting Cell-Intrinsic PD-1 Neutralizes PD-L1 in cis to Attenuate PD-1 Signaling in T Cells. *Cell Rep.* 10, 24(2): 379-390,
- Zheng W, Wang SY, (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agr Food Chem.* 49:5165-5170,
- Zihlif M, Afifi F, Abu-Dahab R, et al., (2013). The antiangiogenic activities of ethanolic crude extracts of four *Salvia* species. *BMC Complement Altern Med.* 13 (13):358.
- Zohary M, (1983). *Pflanzen der Bibel*. Calwer Verlag, Stuttgart.

Αναφορές από το διαδίκτυο

- www.avogel.com/plant-encyclopaedia/salvia_officinalis.php
- www.greenfacts.org/en/dioxins/dioxins-greenfacts-level2.pdf
- www.greenfacts.org/en/dioxins/dioxins-greenfacts-level2.pdf
- www.greenfacts.org/en/dioxins/index.
- www.pharma.bayer.com/targeting-ahr-promising-new-approach-cancer-immunotherapy.
- www.phenex-pharma.com/wp-content/uploads/2020/01/AACR_2019_AhR.pdf
- www.sigmaldrich.com
- www.theplantlist.com
- www.uomomedicina.it/vini-medicinali/ricette-vini-medicinali
- www.uomomedicina.it/vini-medicinali/ricette-vini-medicinali
- www.who.int/mediacentre/factsheets/fs225/en/index.html

Ελληνική βιβλιογραφία

- Δημήτριος Σ. Καββαδάς, (1956). *Εικονογραφημένον Βοτανικόν - Φυτολογικόν Λεξικόν: Τόμος Ζ'.*
- Διοσκουρίδης, *Περί ύλης ιατρικής βιβλίον Ε'*, εκδόσεις Κάκτος, (2000).
- Μπαζαΐος Κ. (2013), *100 Βότανα 2000 Θεραπείες*. Εκδόσεις Μπαζαΐος.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

5-LOX, 5-Lipoxygenase (5-Λιποξυγενάση)
7MER, 7-O-μεθύλ-*epi*-ροομανόλη
12MCA, 12-O-methylcarnosic acid, 12-O-μεθυλοκαρνοσικό οξύ
AChE, ακετυλοχολινεστεράση
ACN, Acetonitrile (Ακετονιτρίλιο)
AD, ατοπική δερματίτιδα
AhR, aryl hydrocarbon receptor or dioxin receptor, υποδοχέας των αρυλοϋδρογονανθράκων ή υποδοχέας διοξινών
AhRR, AhR repressor
AIP, AhR-interacting protein, συμβολίζεται και ως ARA9
ARNT, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
B[a]P, benzo[a]pyrene, βένζο[α]πυρένιο
BA, betulinic acid, μπετουλινικό οξύ
BCC, basal cell carcinoma, βασικοκυτταρικός καρκίνωμα
BRAF, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRAFi, BRAF inhibitors, αναστολείς BRAF
CA, carnosic acid, καρνοσικό οξύ
CD₃OD, δευτεριωμένη μεθανόλη
CDCl₃, δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CH₂Cl₂, διχλωρομεθάνιο
CHx, cyclohexane, κυκλοεξάνιο
COX-2, cyclooxygenase 2, Κυκλοξυγενάση 2
CRP, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CS, carnosol, καρνοσόλη
CYP1A, cytochrome P450, 1A proteins, κυτόχρωμα P450, πρωτεΐνες 1A
CYP1A1, cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1
CYP1B1, cytochrome P450 Family 1 Subfamily B Member 1
CYP450: cytochrome P450, κυτόχρωμα P450
DMA, 4',7-O-dimethylapigenin, 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνη
DMSO, dimethylsulfoxide, διμεθυσουλφοξειδίο
DNA, deoxyribonucleic Acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DREs, dioxin responsive elements,
EC50, half maximal Effective Concentration, Μέση Αποτελεσματική Συγκέντρωση
EMPD, extramammary Paget's disease, εξωμαστική νόσος Paget
EtOAc, ethyl Acetate, οξικός αιθυλεστέρας
EtOH, ethanol, αιθανόλη
FICZ, 6-formylindolo[3,2-b]carbazole
GRA, gel retardation assay
H₂O, νερό
H₂O₂, hydrogen peroxide, υπεροξειδίο του υδρογόνου
hsp90, heat shock protein

IC50, half maximal inhibitory concentration, μέση ανασταλτική συγκέντρωση
ICZ, indolo[3,2-b]carbazole, ινδολο[3,2-b]καρβαζόλη
ID50, median ineffective dose, μέση μη αποτελεσματική δόση
IND, indirubin, ιντιρουμπίνη
MCP-1, χημειοελκτική πρωτεΐνη-1 των μονοκυττάρων
MeOH, methanol, μεθανόλη
MIC, minimum inhibitory concentration, ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση
mRNA, messenger Ribonucleic acid, αγγελιαφόρο RNA
NF-κB, πυρηνικός παράγοντας κάπα-B
NMSC, non-melanoma skin cancers
NO, nitric oxide, μονοξείδιο του αζώτου
NRf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OA, oleanolic acid, ολεανολικό οξύ
p23, protein 23, πρωτεΐνη 23
PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
PCR, polymerase chain reaction
PD-1, programmed cell death protein 1
PD-L1, programmed death ligand 1
PM, particulate matter
PZ, pityriazepin, πιτυριαζεπίνη
Q-RT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction
RA, rosmarinic acid, ροσμαρινικό οξύ
Rf, Retention Factor (Συντελεστής Επιβραδύνσεως)
RO, rosmanol, ροσμανόλη
RP, αντιστρόφου φάσεως
SCC, cutaneous squamous cell carcinoma
SD, seborrheic dermatitis, σμηγματορροϊκή δερματίτιδα
SiO₂, Silicon dioxide (Διοξείδιο του Πυριτίου)
subsp./spp./ssp. Υποείδος
TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, Διοξίνη
TLC, thin layer chromatography, χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
UGT1A1, UDP-glucuronosyltransferase 1A1
UO, ursolic acid, ουρσολικό οξύ
UV, ultraviolet, υπεριώδης
Vis: visible, ορατό
XAP2, hepatitis B virus X-associated protein 2
XRE, xenobiotic-response elements

Κ Α Τ Α Λ Ο Γ Ο Σ Ε Ι Κ Ο Ν Ω Ν

- Εικόνα 1.** Λειπομέρεια ταξιανθίας *Salvia fruticosa* Mill. (καλλιεργημένη, Αθήνα).
- Εικόνα 2.** Αποικία καλλιεργημένης *Salvia fruticosa* Mill. (φωτογραφία από το βοτανικό κήπο Διομήδους του ΕΚΠΑ).
- Εικόνα 3.** Αποικία καλλιεργημένης *Salvia officinalis* L. (φωτογραφία από το βοτανικό κήπο Διομήδους του ΕΚΠΑ).
- Εικόνα 4.** Λειπομέρεια ανθών *Salvia officinalis* L. (φωτογραφία από το βοτανικό κήπο Διομήδους του ΕΚΠΑ).
- Εικόνα 5.** Αποικία καλλιεργήσιμου *Rosmarinus officinalis* L. (φωτογραφία από το βοτανικό κήπο Διομήδους του ΕΚΠΑ).
- Εικόνα 6.** Χημικός τύπος αβιετανίου και 3 από τα βασικά του παράγωγα: το αβιετικό οξύ, το καρνοσικό οξύ και η φερουγκινόλη.
- Εικόνα 7.** Χημικοί τύποι: 12-Ο-μεθυλοκαρνοσικό οξύ (12MCA), καρνοσόλη (CS), ροσμανόλη (RO), 7-Ο-μεθύλ-*epi*-ροσμανόλη (7MER)
- Εικόνα 8.** Ταξινόμηση των πεντακυκλικών τριτερπενίων.
- Εικόνα 9.** Ποσοστό μελετών βιολογικής δραστηριότητας του *R. officinalis* L. που σχετίζονται με τον κάθε φαρμακολογικά σημαντικό μεταβολίτη.
- Εικόνα 10.** Φωτογραφίες φυτών της οικογένειας *Labiata* από το βοτανικό κήπο του ΕΚΠΑ, Ιουλίας και Αλεξάνδρου Ν. Διομήδους.
- Εικόνα 11.** Φωτογραφίες φυτών της οικογένειας *Labiata* από το βοτανικό κήπο του ΕΚΠΑ, Ιουλίας και Αλεξάνδρου Ν. Διομήδους.
- Εικόνα 12.** Οι χημικές δομές των διοξινών: PCDDs, PCDFs και PCBs
- Εικόνα 13.** Οι δύο διαφορετικοί βιοχημικοί καταρράκτες που ακολουθούνται μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα των αρυλοϋδρογονανθράκων (AhR)
- Εικόνα 14.** Ξηρό εκχύλισμα [ROS-7d] των φύλλων του *Rosmarinus officinalis* L.
- Εικόνα 15.** Φάσμα ¹H-NMR σε CDCl₃ και σε CD₃OD του ξηρού εκχυλίσματος δεντρολίβανου [ROS-7d].
- Εικόνα 16.** Φάσμα ¹H-NMR του [ΞΔΒ7] σε CDCl₃.
- Εικόνα 17.** Φάσμα ¹H-NMR του [ΞΔΒ7] σε CD₃OD.
- Εικόνα 18.** Αναλυτικές TLC αντίστροφης φάσης με καθαρό ροσμαρινικό οξύ, 7-Ο-μεθύλ-*epi*-ροσμανόλη και κανονικής φάσης της ροσμανόλης και της 7-Ο-μεθύλ-*epi*-ροσμανόλη με σύστημα CH₂Cl₂: CH₃OH= 97: 3 v/v.
- Εικόνα 19.** Κρυσταλλοί μπετουλινικού οξέος που σχηματίστηκαν στα κλάσματα 68-73 της χρωματογραφικής στήλης με δείγμα [ROS-7d] μετά από 48 ώρες ηρεμίας, κάτω από τον απαγωγό.
- Εικόνα 20.** Φάσμα 1D ¹H-NMR σε CDCl₃ του ξηρού εκχυλίσματος *Rosmarinus officinalis* L. [ROS-12h].
- Εικόνα 21.** TLC αντίστροφης φάσης του [ΞΔΒ12] με ροσμαρινικό οξύ. Σύστημα κινητής φάσης CH₃OH: H₂O = 75 : 25 v/v.
- Εικόνα 22.** Φάσμα πρωτονίου ¹H-NMR του κλάσματος Α που προκύπτει από την ένωση των κλασμάτων 36 έως και 40 της χρωματογραφικής στήλης με δείγμα [ROS-12h].

- Εικόνα 23.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$, σε CDCl_3 και σε CD_3OD ξηρού εκχυλίσματος *Rosmarinus officinalis* L. [**ROS-2m**].
- Εικόνα 24.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$, σε CDCl_3 του **LC-[ROS-2m]-κλάσματος-A**.
- Εικόνα 25.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$, σε CDCl_3 του **LC-[ROS-2m]-κλάσματος-B**
- Εικόνα 26.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$, σε CDCl_3 του **LC-[ROS-2m]-κλάσματος-E**.
- Εικόνα 27.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ ξηρού εκχυλίσματος [**ROS-1y**] σε CDCl_3 .
- Εικόνα 28.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$, σε CDCl_3 του μεθανολικού εκχυλίσματος της *Salvia microphylla* Kunth.
- Εικόνα 29.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ του κλάσματος **LC-[SM]-κλάσμα-Γ**.
- Εικόνα 30.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$, σε CDCl_3 του εκχυλίσματος [**SF-d**].
- Εικόνα 31.** TLC κανονικής φάσης του [**SF-d**] με ροσμανόλη. Σύστημα κινητής φάσης CH_2Cl_2 : CH_3OH = 97: 3 v/v.
- Εικόνα 32.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ του καρνοσικού οξέος σε CDCl_3 .
- Εικόνα 33.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ της καρνοσόλης σε CDCl_3 .
- Εικόνα 34.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ της καρνοσόλης σε CD_3OD .
- Εικόνα 35.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ του 12-μεθυλο-καρνοσικού οξέος σε CDCl_3 και CD_3OD .
- Εικόνα 36.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ της 7-Ο-μεθύλ-*epi*-ροσμανόλη σε CDCl_3 και CD_3OD .
- Εικόνα 37.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ της ροσμανόλης σε CDCl_3 και CD_3OD
- Εικόνα 38.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ του ροσμαρινικού οξέος σε CD_3OD .
- Εικόνα 39.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ της 4',7-Ο-διμεθυλαπιγενίνης σε CDCl_3 .
- Εικόνα 39.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ του μπετουλινικού οξέος σε CDCl_3 και CD_3OD .
- Εικόνα 41.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ του ολεανολικού οξέος σε CDCl_3 και $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.
- Εικόνα 42.** Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ του ουρσολικού οξέος σε CDCl_3 και $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.
- Εικόνα 43.** Διαδρομή αποικοδόμησης του καρνοσικού οξέος στη μεθανόλη και στο ζεστό νερό: στη μεθανόλη το CA μετατρέπεται βαθμιαία σε CS, RO και 7MER, ενώ στο νερό τελικό προϊόν είναι η RO.
- Εικόνα 44.** Φάσματα 1D $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των μεθανολικών εκχυλισμάτων της *Salvia fruticosa* Mill., του *Rosmarinus officinalis* L. και της *Salvia microphylla* Kunth.
- Εικόνα 45.** Σύγκριση των φασμάτων 1D $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των αφεψημάτων του *Rosmarinus officinalis* L. και της *Salvia fruticosa* Mill.
- Εικόνα 46.** Ασθενής με SD προσώπου πριν και μετά τη θεραπεία με κρέμα *Rosmarinus officinalis* L.
- Εικόνα 47.** Χημικές δομές των TCDD=2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-παρα-διοξίνη, FICZ=6-φορμύλ-ινδόλο[3,2b]καρμπαζόλη, IND=ιντιρουμπίνη, PZ=πιτυριαζεπίνη
- Εικόνα 48.** Η *in vitro* δράση της λουσιφεράσης σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος (HG2L7.5c1), που επώαστηκαν με μόνο τη TCDD (1 nM) και με μόνο του το κάθε εκχύλισμα *Rosmarinus officinalis* L. (R1-R5) (100 ppm έκαστο) για την διερεύνηση τυχόν ύπαρξης αγωνιστικής δράσης των φυτικών δειγμάτων στον AhR.
- Εικόνα 49.** Η *in vitro* δράση της λουσιφεράσης σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος (HG2L7.5c1) που επώαστηκαν με μόνο TCDD (1 nM) και με τον συνδυασμό της TCDD με κάθε ένα από τα εκχυλίσματα *Rosmarinus officinalis* L. R1-R5 (R 100 ppm + TCDD) που εξετάστηκαν.
- Εικόνα 50.** Ποσοστό του συμπλέγματος AhR-DNA που σχηματίζεται όταν το κάθε εκχύλισμα *Rosmarinus officinalis* L. (R1-R5 σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις των 10

και 100 ppm) επώζεται στα ηπατικά κυττοσόλια ινδικού χοιριδίου μαζί με τη TCDD (1 nM).

Εικόνα 51. Γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων του πειράματος Hydroxyapatite AhR Ligand Binding Assay σε ηπατικά κυττοσόλια ινδικού χοιριδίου, που μας δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα R1-R5 του δεντρολίβανου δρουν ως ανταγωνιστές της TCDD (2 nM) έναντι του AhR με συναγωνιστικό τρόπο.

Εικόνα 52. Επαγωγή του mRNA CYP1A1 στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (SIK 28) που προκαλείται από ένα παράγοντα με αγωνιστική δράση στον AhR και μετράται με την RT-PCR. Παρουσιάζεται η δράση του εκχυλίσματος R4 στα 10 µg/mL, μετά την επώαση απουσίας και παρουσίας της TCDD.

Εικόνα 53. Επαγωγή του mRNA CYP1A1 στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (SIK 28) που προκαλείται από ένα παράγοντα με αγωνιστική δράση στον AhR και μετράται με την RT-PCR. Παρουσιάζεται η δράση του εκχυλίσματος R4 στα 10 µg/mL, μετά την επώαση απουσίας και παρουσίας της με κάθε μια από τις PZ, FICZ και IND ξεχωριστά.

Εικόνα 54. Πείραμα GRA για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς (αγωνιστικής ή ανταγωνιστικής) των CS, CA, 7MER, DMA και BA στον AhR σε συγκέντρωση 10 nM, απουσίας και παρουσίας 1 nM της TCDD.

Εικόνα 55. Πείραμα GRA για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς (αγωνιστικής ή ανταγωνιστικής) των CS, CA, 7MER, DMA, BA στον AhR σε συγκέντρωση 100 nM απουσίας και παρουσίας 1 nM της TCDD.

Εικόνα 56. Σύνδεση μεταξύ καρκινικής και φλεγμονώδους κατάστασης με την canonical pathway και την non-canonical pathway του AhR.

Εικόνα 57. Ενέργειες που προκύπτουν στα φυσιολογικά και στα καρκινικά κύτταρα μετά την ενεργοποίηση του AhR.

Εικόνα 58. Καρκινογόνοι παράγοντες που ασκούν την δράση τους μέσω της ενεργοποίησης του AhR και η προστατευτική-θεραπευτική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος *R. officinalis* L. και των ουσιών του CA, CS και BA λόγω ανταγωνισμού στον AhR σε σχέση με τις FICZ, ιντιρουμπίνη και TCDD.

Εικόνα 59. Ο ρόλος του AhR στο φαινόμενο της ανοσολογικής ανοχής (<https://pharma.bayer.com/targeting-ahr-promising-new-approach-cancer-immunotherapy>).

Εικόνα 60. Τα φάσματα ¹H-NMR σε CDCl₃ των καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, 12-μεθυλο-καρνοσικό οξύ, 7-O-μεθύλ-*epi*-ροσμανόλη, ροσμανόλη στο διάστημα 6,45 έως 6,95 ppm.

Εικόνα 61. Το φάσμα ¹H-NMR σε CDCl₃ της 4',7-O-διμεθυλαπιγενίνης στο διάστημα 7,54 έως 8,00 ppm και του μπετουλινικού οξέος με έμφαση στη μονή κορυφή ολοκλήρωσης στα 4.73 ppm.

Εικόνα 62. Σύγκριση των φασμάτων ¹H-NMR (CDCl₃) των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών *R. officinalis* L. και του *Origanum vulgare* L. *subsp. hirtum* (Link) μεταξύ 6,50 και 7,20 ppm.

Εικόνα 63. Σύγκριση των φασμάτων ¹H-NMR (CDCl₃), του μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων του *Hyssopus officinalis* L. και των καθαρών ουσιών: καρνοσικό οξύ, καρνοσόλη, 12-μεθυλο-καρνοσικό οξύ, μεταξύ 7,10 και 6,20 ppm.

Εικόνα 64. Σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών *R. officinalis* L. και *S. somalensis* Vatke μεταξύ 6,45 και 7,35 ppm.

Εικόνα 65. Ποιοτική σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), των μεθανολικών εκχυλισμάτων της *Salvia sclarea* var. *turkestanica* (Noter) Mottet και της *Salvia sclarea* L. με εμφανείς διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις.

Εικόνα 66. Ποιοτική σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), των μεθανολικών εκχυλισμάτων της *Betonica officinalis* L. και του *Stachys officinalis* (L.) Trevis. με εμφανείς διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις.

Εικόνα 67. Σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), του μεθανολικού εκχυλίσματος φύλλων της *S. pomifera* L. subsp. *pomifera* (κόκκινο χρώμα) με τα αντίστοιχα του καρνοσικού οξέος, της καρνοσόλη και του 12-μεθυλο-καρνοσικού οξέος.

Εικόνα 68. Ποιοτική σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), των μεθανολικών εκχυλισμάτων της *S. pomifera* L. subsp. *calycina* και της *S. pomifera* L. subsp. *pomifera*.

Εικόνα 69. Σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3), των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φύλλων της *S. officinalis* L. και της *S. fruticosa* Mill.

Εικόνα 70. Σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φύλλων της *S. officinalis* L. και της *S. pomifera* L. subsp. *pomifera*.

Εικόνα 71. Σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φύλλων της *S. fruticosa* Mill. και της *S. pomifera* L. subsp. *pomifera*.

Εικόνα 72. Σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φύλλων του *R. officinalis* L. και του *R. officinalis* var. *prostratus*.

Εικόνα 73. Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των φυτών *S. pomifera* L. subsp. *pomifera* L., *S. officinalis* L., *S. pomifera* L. subsp. *calycina* (Sm) Hayek, και *S. fruticosa* Mill.

Εικόνα 74. Σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φύλλων του φυτού *Origanum majorana* L. και του *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link).

Εικόνα 75. Σύγκριση των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) των μεθανολικών εκχυλισμάτων των φύλλων του *Phlomis cretica* C. Presl και του *Phlomis fruticosa* L.

Εικόνα 76. Χημικός τύπος αβιετανίου.

Εικόνα 77. Διαδρομή αποικοδόμησης του καρνοσικού οξέος σε διάλυμα μεθανόλης.

Εικόνα 79. Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) του οινόλυτου του *R. officinalis* L.

Εικόνα 80. Φάσμα 1D $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) του οινόλυτου του *R. officinalis* L. σε σύγκριση με το αντίστοιχο φάσμα του ροσμαρινικού οξέος.

Εικόνα 81. 1D- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) φάσμα της κάμφορας.

Εικόνα 82. 1D- $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) φάσμα της α - β -, θουγιόνης.

Εικόνα 83. Φαινόμενο ανοσολογικής ανοχής και PD-1, PD-L1.

Εικόνα 84. Χημική δομή της κνουρενίνης

Εικόνα 85. Άξονας IDO1-κνουρενίνη-AhR

Εικόνα 86. Χημική δομή του B[a]P.

Εικόνα 87. Οξειδωτικοί παράγοντες, διοξίνες και περιβαλλοντικοί πολυκυκλικοί ρύποι σε σχέση με τους AhR και Nrf2.

Εικόνα 88. Ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών φυτοχημικών με βάση την συμπεριφορά τους έναντι των AhR και Nrf2.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1.** Διάρθρωση της παρούσα διατριβής.
- Πίνακας 2.** Επισκόπηση της παραδοσιακής χρήσης της *S. fruticosa* Mill.
- Πίνακας 3.** Μέταλλα και ιχνοστοιχεία στα φύλλα της *Salvia officinalis* L.
- Πίνακας 4.** Ενδείξεις και δοσολογία των παρασκευασμάτων των φύλλων της *Salvia officinalis* L. σύμφωνα με τα διεθνή εγχειρίδια.
- Πίνακας 5.** Ενδείξεις και δοσολογία των παρασκευασμάτων των φύλλων της *Salvia officinalis* L. σύμφωνα με την χρήση τους στις χώρες της Ευρώπης για πάνω από 30 χρόνια.
- Πίνακας 6.** Ποσοτικά στοιχεία των σημαντικότερων ενώσεων του *R. officinalis* L.
- Πίνακας 7.** Φαρμακευτικές μορφές για τα φύλλα *R. officinalis* L.: ενδείξεις και δοσολογία.
- Πίνακας 8.** Παραδοσιακή χρήση για το αιθέριο έλαιο του *R. officinalis* L.
- Πίνακας 9.** Παραδοσιακή χρήση για τα φύλλα του *R. officinalis* L.
- Πίνακας 10.** Ποσοτικά στοιχεία της καρνοσόλης που απομονώθηκε από τρεις διαφορετικές παρτίδες αποξηραμένων φύλλων *Rosmarinus officinalis* L. με την ίδια μέθοδο.
- Πίνακας 11.** Τα τεχνικά χαρακτηριστικά της χρωματογραφίας στήλης με του δείγματος [ROS-7d].
- Πίνακας 12.** Κλάσματα της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-7d].
- Πίνακας 13.** Συνενώσεις κλασμάτων της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-7d].
- Πίνακας 14.** Συνοπτικό διάγραμμα δημιουργίας και επεξεργασίας του [ROS-7d] και του [ΞΔΒ7].
- Πίνακας 15.** Χαρακτηριστικά της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-12h].
- Πίνακας 16.** Κλάσματα της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-12h].
- Πίνακας 17.** Συνενώσεις κλασμάτων της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-12h].
- Πίνακας 18.** Συνοπτικό διάγραμμα δημιουργίας και επεξεργασίας του [ROS-12h] και του [ΞΔΒ12].
- Πίνακας 19.** Χαρακτηριστικά της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-12h.7].
- Πίνακας 20.** Κλάσματα της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-12h.7].
- Πίνακας 21.** Συνενώσεις κλασμάτων της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-12h.7].
- Πίνακας 22.** Συνοπτικό διάγραμμα δημιουργίας και επεξεργασίας του [ROS-12h.7].
- Πίνακας 23.** Χαρακτηριστικά της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-2m].
- Πίνακας 24.** Κλάσματα της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-2m].
- Πίνακας 25.** Συνενώσεις κλασμάτων της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [ROS-2m].
- Πίνακας 26.** Συνοπτικό διάγραμμα δημιουργίας και επεξεργασίας του [ROS-2m].
- Πίνακας 27.** Χαρακτηριστικά της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [SM].

- Πίνακας 28.** Κλάσματα της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [SM].
- Πίνακας 29.** Συνενώσεις κλασμάτων της χρωματογραφίας στήλης του δείγματος [SM].
- Πίνακας 30.** Συνοπτικό διάγραμμα παρασκευής και επεξεργασίας του εκχυλίσματος [SM].
- Πίνακας 31.** Συνοπτικό διάγραμμα δημιουργίας και επεξεργασίας του εκχυλίσματος [SF-d].
- Πίνακας 32.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ του καρνοσικού οξέος σε CDCl_3 .
- Πίνακας 33.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ της καρνοσόλης σε CDCl_3 .
- Πίνακας 34.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ της καρνοσόλης σε CD_3OD .
- Πίνακας 35.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ του 12-μεθυλο-καρνοσικού οξέος σε CDCl_3 .
- Πίνακας 36.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ του 12-μεθυλο-καρνοσικού οξέος σε CD_3OD .
- Πίνακας 37.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ της 7-Ο-μεθύλ-*epi*-ροσμανόλης σε CDCl_3 .
- Πίνακας 38.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ της 7-Ο-μεθύλ-*epi*-ροσμανόλης σε CD_3OD .
- Πίνακας 39.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ της ροσμανόλης σε CDCl_3 .
- Πίνακας 40.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ της ροσμανόλης σε CD_3OD .
- Πίνακας 41.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ του ροσμαρινικού οξέος σε CD_3OD .
- Πίνακας 42.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ της 4',7-Ο-διμεθυλαπιγενίνης σε CDCl_3 .
- Πίνακας 43.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ του μπετουλινικού οξέος σε CDCl_3 .
- Πίνακας 44.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ του μπετουλινικού οξέος σε CD_3OD .
- Πίνακας 45.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ του ολεανολικού οξέος σε CDCl_3 .
- Πίνακας 46.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ του ολεανολικού οξέος σε $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.
- Πίνακας 47.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ του ουρσολικού οξέος σε CDCl_3 .
- Πίνακας 48.** 1D $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ του ουρσολικού οξέος σε $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.
- Πίνακας 49.** Οι ποσότητες των CA, CS, 12MCA, 7MER, RO, BA και DMA σε 1 g των ξηρών εκχυλισμάτων *Rosmarinus officinalis* L. που προκύπτουν μετά από εμβροχή της δρόγης για 12h, 48h, 7 ημέρες και 2 μήνες στη μεθανόλη.
- Πίνακας 50.** Συνολική ποσότητα των διτερπενίων αβιετανίου που εξετάστηκαν στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου σε συνάρτηση με το χρόνο εμβροχής (12 ώρες, 48 ώρες, 7 ημέρες και 2 μήνες).
- Πίνακας 51.** Οι ποσότητες των DMA, 7MER, CS, CA και BA στα εκχυλίσματα R1, R2, R3, R4, R5 του *Rosmarinus officinalis* L.
- Πίνακας 52.** Τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις τους και τα αποτελέσματα του πειράματος της λουσιφεράσης (AhR-Responsive Luciferase Reporter Gene Analysis)-Γονιδιακή έκφραση/αγωνιστική δράση των εκχυλισμάτων R1, R2, R3, R4 και R5 του *Rosmarinus officinalis* L.
- Πίνακας 53.** Τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις τους και τα αποτελέσματα του πειράματος της λουσιφεράσης (AhR-Responsive Luciferase Reporter Gene Analysis)-Γονιδιακή έκφραση/ανταγωνιστική δράση των εκχυλισμάτων R1, R2, R3, R4 και R5 του *Rosmarinus officinalis* L.
- Πίνακας 54.** Τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις τους και τα αποτελέσματα του πειράματος με τη μέθοδο GRA-Σύνδεση του συμπλέγματος AhR στο DNA/ανταγωνιστική δράση των εκχυλισμάτων R1, R2, R3, R4 και R5 του *Rosmarinus officinalis* L.

Πίνακας 55. Τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις τους και τα αποτελέσματα του πειράματος Hydroxyapatite AhR Ligand Binding Assay-Συναγωνιστικός Ανταγωνισμός των εκχυλισμάτων R1, R2, R3, R4 και R5 του *Rosmarinus officinalis* L.

Πίνακας 56. Τα δείγματα και τα αποτελέσματα του πειράματος RT-PCR (Sik 28 cells)-Αγωνιστική/Ανταγωνιστική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος R4 του *Rosmarinus officinalis* L. απουσίας και παρουσίας της TCDD.

Πίνακας 57. Τα δείγματα και τα αποτελέσματα του πειράματος RT-PCR (Sik 28 cells)-Αγωνιστική/Ανταγωνιστική δράση του μεθανολικού εκχυλίσματος R4 του *Rosmarinus officinalis* L. απουσίας και παρουσίας των PZ, IND και FICZ.

Πίνακας 58. Τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις τους και τα αποτελέσματα του πειράματος GRA σε ηπατικά κυττοσώλια ινδικού χοιριδίου των CA, CS, 7MER, DMA, και BA σε συγκέντρωση 10 nM -Αγωνιστική/Ανταγωνιστική δράση, απουσίας και παρουσίας της TCDD.

Πίνακας 59. Τα δείγματα, οι συγκεντρώσεις τους και τα αποτελέσματα του πειράματος GRA σε ηπατικά κυττοσώλια ινδικού χοιριδίου των CA, CS, 7MER, DMA και BA σε συγκέντρωση 10.0. nM -Αγωνιστική/Ανταγωνιστική δράση, απουσίας και παρουσίας της TCDD.

Πίνακας 60. Σύνοψη του κεφαλαίου 2.

Πίνακας 61. Αποτελέσματα των φυτών της οικογένειας *Labiata* που μελετήθηκαν ποσοτικά και ποιοτικά και περιείχαν τουλάχιστον μία από τις κάτωθι ουσίες: RO, 7MER, CA, CS, 12MCA, DMA και BA.

Πίνακας 62. Σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου (RO, 7MER, CA, CS, 12MCA) των φυτών της οικογένειας *Labiata* που μελετήθηκαν.

Πίνακας 63. Υδατικά εκχυλίσματα (εγχύματα, αφεψήματα, εκχυλίσματα με τυρβώδη ροή) των *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia fruticosa* Mill. και *Salvia officinalis* L. σε συνάρτηση με το χρόνο.

Πίνακας 64. Φαρμακευτικά βάμματα του *Rosmarinus officinalis* L. που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της εμβροχής σε λουτρό υπερήχων για 1 h. σε συνάρτηση με την αναλογία δρόγης/διαλύτη και τους αλκοολικούς βαθμούς του διαλύτη.

Πίνακας 65. Οι ποσότητες των 12MCA, CA, CS, 7MER, RO, BA και DMA σε αιθανολικό διάλυμα 70° *Rosmarinus officinalis* L. σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης του φαρμακευτικού βάμματος (1, 7 και 14 ημέρες). MO σε mg/100 mL αιθανολικού διαλύματος 70° *R. officinalis* L.

Πίνακας 66. Ελαιόλυτα του *Rosmarinus officinalis* L. που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της εμβροχής, εν θερμώ και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος: 1) αναλογία δρόγη: ελαιόλαδο (Δ: Ε)= 1: 20 w/w (5: 100 w/w), θέρμανση στους 65 °C για 6 ώρες, 2) αναλογία δρόγη: ελαιόλαδο= 1: 10 w/w (5: 100 w/w), θέρμανση στους 65 °C για 6 ώρες, 3) αναλογία δρόγη: ελαιόλαδο= 1: 20 w/w (5: 100 w/w), θερμοκρασία περιβάλλοντος, 21 μέρες εμβροχής σε προστασία από το φως.

Πίνακας 67. Σύγκριση της εκχυλιστικής απόδοσης του ελαιόλαδου, της αιθανόλης και της μεθανόλης με πρώτη ύλη τα αποξηραμένα φύλλα *Rosmarinus officinalis* L.

Πίνακας 68. Ελαιόλυτα που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της διάλυσης ξηρού εκχυλίσματος των *Rosmarinus officinalis* L. και *Salvia fruticosa* Mill. στο ελαιόλαδο, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Πίνακας 69. Μεταβολή των 12MCA, CA, CS, 7MER, RO, BA και DMA σε ελαιόλυτο του *Rosmarinus officinalis* L. σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης.

Πίνακας 70. Σύνολο των εξεταζόμενων διτερπενίων αβιετανίου σε συνάρτηση με τον χρόνο φύλαξης της δρόγης του φυτού *Salvia fruticosa* Mill.

Πίνακας 71. Εγχύματα 10 min της *Salvia fruticosa* Mill. σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης της δρόγης (χρόνος 0 και 20 μήνες), με αναλογία δρόγης/διαλύτη 3: 150 w/v.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1. Οι ποσότητες σε µg των CA, CS, 12MCA, 7MER, RO, BA και DMA σε 1 g των ξηρών εκχυλισμάτων *Rosmarinus officinalis* L. που προκύπτουν μετά από εμβροχή της δρόγης για 12h, 48h, 7 ημέρες και 2 μήνες στη μεθανόλη.

Γράφημα 2. Οι συνολικές ποσότητες των διτερπενίων αβιτανίου που εξετάστηκαν (CA, CS, 12MCA, 7MER και RO) στα εκχυλίσματα δεντρολίβανου σε συνάρτηση με τον χρόνο εμβροχής στη μεθανόλη.

Γράφημα 3. Εγχύματα *Rosmarinus officinalis* L. σε συνάρτηση με το χρόνο.

Γράφημα 4. Εγχύματα *Salvia fruticosa* Mill. σε συνάρτηση με το χρόνο.

Γράφημα 5. Εγχύματα *Salvia officinalis* L. σε συνάρτηση με το χρόνο.

Γράφημα 6. Αφεψήματα *Rosmarinus officinalis* L. σε συνάρτηση με το χρόνο.

Γράφημα 7. Αφεψήματα *Salvia fruticosa* Mill. σε συνάρτηση με το χρόνο.

Γράφημα 8. Αφεψήματα *Salvia officinalis* L. σε συνάρτηση με το χρόνο.

Γράφημα 9. Εκχύλιση με τυρβώδη ροή, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και εν θερμώ του *Rosmarinus officinalis* L.

Γράφημα 10. Εκχύλιση με τυρβώδη ροή, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και εν θερμώ της *Salvia fruticosa* Mill.

Γράφημα 11. Εκχύλιση με τυρβώδη ροή, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και εν θερμώ της *Salvia officinalis* L.

Γράφημα 12. Σύγκριση εγχυμάτων (Ε)-αφεψημάτων (Α)-εκχυλισμάτων τυρβώδους ροής (Τ.Ψ: σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, Τ.Θ: εν θερμώ) του *Rosmarinus officinalis* L. σε συνάρτηση με το χρόνο.

Γράφημα 13. Σύγκριση εγχυμάτων (Ε)-αφεψημάτων (Α)-εκχυλισμάτων τυρβώδους ροής (Τ.Ψ: σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, Τ.Θ: εν θερμώ) της *Salvia fruticosa* Mill. σε συνάρτηση με το χρόνο.

Γράφημα 14. Σύγκριση εγχυμάτων (Ε)-αφεψημάτων (Α)-εκχυλισμάτων τυρβώδους ροής (Τ.Ψ: σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, Τ.Θ: εν θερμώ) της *Salvia officinalis* L. σε συνάρτηση με το χρόνο.

Γράφημα 15. Σύγκριση μεταξύ των εκχυλισμάτων με τυρβώδη ροή των *R. officinalis* L., *Salvia officinalis* L. και *Salvia fruticosa* Mill.

Γράφημα 16. Φαρμακευτικά βάμματα του *Rosmarinus officinalis* L. σε συνάρτηση με την αναλογία δρόγης/διαλύτη και τους αλκοολικούς βαθμούς του διαλύτη.

Γράφημα 17. 12MCA, CA, CS, 7MER, RO, BA και DMA σε ξηρό εκχύλισμα *Rosmarinus officinalis* L. αιθανολικού διαλύματος 70° σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης (1, 7 και 14 ημέρες).

Γράφημα 18. Ελαιόλυτα του *R. officinalis* L. με εκχύλιση της δρόγης.

Γράφημα 19. Ελαιόλυτα με τη μέθοδο της διάλυσης ξηρού εκχυλίσματος των *Rosmarinus officinalis* L. και *Salvia fruticosa* Mill. στο ελαιόλαδο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Γράφημα 20. Μεταβολή των 12MCA, CA, CS, 7MER, RO, BA και DMA σε ελαιόλυτο του *Rosmarinus officinalis* L. σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης.

Γράφημα 21. Τα ποσοτικά και ποιοτικά στοιχεία της δρόγης *S. fruticosa* Mill. που αφορούν τα 12MCA, CA, CS, 7MER και RO σε συνάρτηση με τον χρόνο αποθήκευσης.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Συμμετοχές σε Διεθνή Συνέδρια

Kallimanis P, Chinou I, Magiatis P, Soshilov A, Denison M, (2019). *Rosmarinus officinalis* L. extracts from Greece and its secondary metabolites as antagonists of the Aryl hydrocarbon Receptor.

Poster presented at: 4th International conference on natural products utilization: from plants to pharmacy shelf. 29 May-01 June 2019, Albena, Bulgaria.
<https://www.researchgate.net/publication/334729872>

Kallimanis P, Magiatis P, Tsiaka Th, Zoumpoulakis P, Panagiotopoulou A, Chinou I, (2021). Quantitative and qualitative evaluation of 60 Labiatae species, growing in Greece, regarding the content of selected abietane-type diterpenes using ¹H-qNMR. Poster presented at: GA - 69th Annual Meeting, Bonn, Germany, Virtual conference, 5-8 Sept. 2021.

Planta Medica 87(15): 1274. doi:10.1055/s-0041-1736860

Δημοσιεύσεις

Kallimanis P, Chinou I, Panagiotopoulou A, Soshilov A, He G, Denison M, and Magiatis P, (2022). "*Rosmarinus officinalis* L. Leaf Extracts and Their Metabolites Inhibit the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Activation In Vitro and in Human Keratinocytes: Potential Impact on Inflammatory Skin Diseases and Skin Cancer".

Molecules 27, no. 8: 2499. <https://doi.org/10.3390/molecules27082499>

Kallimanis P, Magiatis P, Tsiaka Th, Zoumpoulakis P, Panagiotopoulou A, Chinou I. Valorization of different extraction methods of selected Lamiaceae species growing in Greece (infusions, decoctions, turbulent-extracts, tinctures, oleolites), regarding their content on abietane-type diterpenes by ¹H-qNMR method (to be submitted for publication)





ΕΠΙΛΟΓΟΣ

“Εν οίδα ὅτι οὐδέν οίδα”.....
(Σωκράτης)



.... η αναζήτηση συνεχίζεται.....

Cum Deo.