ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

«ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΒΟΤΑΝΩΝ ΤΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ ΣΕ ΤΡΟΦΟΓΕΝΗ ΠΑΘΟΓΟΝΑ»

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Κοντοέ Μαρία-Σπυριδούλα

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Κυριακού Αδαμαντίνη

Επίκουρη Καθηγήτρια Βακτηριολογίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κυριακού Αδαμαντίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βακτηριολογίας

Καλογερόπουλος Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας Τροφίμων και Περιβάλλοντος

Μπόσκου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Οργάνωσης και Διοίκησης Μονάδων Διατροφής

ΑΘΗΝΑ, 2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φαρμακευτικά φυτά, τα οποία αποτέλεσαν τη βασική συνιστώσα της παραδοσιακής ιατρικής ήδη από την προϊστορία, φαίνεται να συνεχίζουν να προσελκύουν το ενδιαφέρον της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας ακόμη και σήμερα, λόγω των πολλά υποσχόμενων δυνατοτήτων χρήσης τους στην παραδοσιακή, συμπληρωματική ή εναλλακτική θεραπεία πολλών ανθρώπινων ασθενειών. Οι ευεργετικές τους δράσεις αποδίδονται στα περιεχόμενα φυτοχημικά συστατικά τους, τα οποία φαίνεται να διαθέτουν αντιοξειδωτική, καρδιοπροστατευτική, χημειοπροστατευτική αλλά και αντιμικροβιακή δράση, τόσο έναντι βακτηρίων όσο και μυκήτων.

Οι μύκητες μολύνουν συχνά τρόφιμα, αλλοιώνοντας τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, υποβαθμίζοντας την ποιότητά τους και θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Για την καταπολέμισή τους έχουν χρησιμοποιηθεί μυκητοκτόνα φάρμακα, τα οποία ωστόσο είναι επικίνδυνα για την υγεία του ανθρώπου λόγω των υψηλών επιπέδων τοξικότητας και αναποτελεσματικά λόγω της αύξησης του πληθυσμού των ανθεκτικών σε αυτά παθογόνων πληθυσμών. Γι' αυτό τα τελευταία χρόνια διερευνάται η χρήση των φαρμακευτικών φυτών ως πιθανές πηγές νέων αντιμικροβιακών ουσιών. Σε γενικές γραμμές η χρήση των φυτικών εκχυλισμάτων εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με τη χρήση των κοινών μυκητοκτόνων, καθώς ενέχει μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης ανθεκτικότητας του παθογόνου και μικρότερη κυτταροτοξικότητα και επίσης είναι πιο οικονομική και πιο φιλική προς το περιβάλλον.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει σαν στόχο τη διερεύνηση της δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων ορισμένων αρωματικών φυτών της ελληνικής χλωρίδας έναντι μυκήτων, δυνητικά αλλοιογόνων των τροφίμων ή ευκαιριακά παθογόνων του ανθρώπινου οργανισμού. Αν και υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία γύρω από τις αντιμυκητιασικές δράσεις πολλών φυτών και βοτάνων, οι περισσότερες μελέτες δεν αφορούν τα υδατικά εκχυλίσματα αυτών, τη μορφή δηλαδή με την οποία καταναλώνονται συνηθέστερα.

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας διερευνήθηκε η δράση των υδατικών εκχυλισμάτων 13 βοτάνων της ελληνικής χλωρίδας έναντι 14 στελεχών μυκήτων, του γένους *Rhizopus, Aspergillus, Candida* και *Penicillium*. Καμία

επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 200 μg/μL στα γένη *Rhizopus, Aspergillus* και *Candida* δεν παρατηρήθηκε.Όσον αφορά το *Penicillium* spp. το υδατικό εκχύλισμα του σπαθόχορτου σε συγκέντρωση 200 μg/μL φαίνεται να επιδρά εν μέρη στην σποριογονία, ενώ όσον αφορά το *P.italicum* συγκεκριμένα, τα υδατικά εκχυλίσματα του θυμαριού, της ρίγανης, της θρύμπας και του δίκταμου σε συγκέντρωση 200 μg/μL φαίνεται να δυσχεραίνουν την ανάπτυξη του μυκηλίου και τη σποριογονία. Τα αντίστοιχα εκχυλίσματα του μελισσόχορτου και της μαντζουράνας φαίνεται να επιδρούν μόνο στη σποριογονία του συγκεκριμένου στελέχους.

ABSTRACT

Medicinal plants, which have been widely used in traditional medicine since prehistoric times, seem to continue to attract the interest of the global scientific community even today because of their potential in traditional, complementary or alternative treatment of varius human diseases. The beneficial effects of these plants are attributed to the phytochemical compounds, which appear to have antioxidant, cardioprotective, chemoprotective and antimicrobial activity against both bacteria and fungi.

Fungi often spoil food by contaminating the organoleptic characteristics and degrading food quality. In this way they usually pose a threat to consumers' health. In order to limit fungal population growth, fungicides have been used. However, most of the fungicides used today are based on chemical compounds that are dangerous to human health because of high levels of toxicity and ineffective because of the large population of resistant pathogens to these substances. This is the main reason why in recent years the use of medicinal plants is investigated as potential source of new antimicrobial agents. In general the use of plant extracts shows several advantages compared to the use of common fungicides, such as a lower risk of development of resistance pathogens and less cytotoxicity. The plant extracts are also more economical and more environmentally friendly.

This project aims to investigate the effects of aqueous extracts of some herbs of the Greek flora against fungi, which are potential spoilage of food or opportunistic pathogens of the human body. Although there is abundant literature on the antifungal activity of several plants and herbs, the majority of these studies do not focus on the aqueous extracts, which are more frequently consumed.

The antifungal activity of aqueous extracts of 13 herbs against 14 strains of fungi of the genus *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Candida* and *Penicillium* is investigated. No effect of the aqueous extracts at 200 μg / mL against the genera *Rhizopus*, *Aspergillus* and *Candida* is noticed. In terms of the aqueous extract of St. John's Wort at 200 μg / mL, seems to partially affect the spore germination of *Penicillium* spp. The aqueous extracts of thyme, oregano, pink savory and dittany at 200 μg / mL seem to hinder the development of mycelium and the spore germination of *P.italicum*, while the

corresponding extracts of lemon balm and marjoram seem to affect only the spore germination.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του ανθρώπου και των μικροοργανισμών του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών από τον Σεπτέμβριο 2013 ως τον Μάιο 2014, υπό την επίβλεψη της κυρίας Κυριακού Αδαμαντίνης, Επίκουρης Καθηγήτριας Βακτηριολογίας. Πρώτα απ΄όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Κυριακού Μαντώ για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ πολύ επίσης τον κύριο Καλογερόπουλο Νίκο, Αναπληρωτή Καθηγητή Χημείας Τροφίμων και Περιβάλλοντος για την πρόταση του θέματος αλλά και τη βοήθεια και τη θετική του ενέργεια. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στην υποψήφια διδάκτωρ Κογιάννου Δήμητρα για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και τη στήριξή της. Ευχαριστώ ακόμη την κυρία Κώτσου Μαρία για τη συνεργασία μας και την υποψήφια διδάκτωρ Μήτσου Ευδοκία, για την προσφορά των στελεχών του γένους *Candida* και τη βοήθειά της. Τέλος, ευχαριστώ ιδιαιτέρως την οικογένειά μου και τον Γιώργο για την αμέριστη στήριξή τους σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **2**
ABSTRACT **4**
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **10**
Ι. Φαρμακευτικά φυτά-Βότανα 10
Ι.1 Γενικά στοιχεία-Σύντομη Ιστορική Αναδρομή 10
Ι.2 Ταξινόμηση και Βοτανικά Χαρακτηριστικά 11
Ι.3 Ελληνικά αρωματικά φυτά 12
Ι.3.1 Αντωναίδα ή Τεύκτρο *(Origanum microphyllum)* 12
Ι.3.2 Δενδρολίβανο *(Rosmarinus officinalis)* 12
Ι.3.3 Δίκταμο *(Origanum dictamnus)* 13
Ι.3.4 Θρύμπα *(Satureja trhymbra)* 13
Ι.3.5 Θυμάρι *(Thymus vulgaris)* 13
Ι.3.6 Μαντζουράνα *(Origanum majorana)* 14
Ι.3.7 Μελισσόχορτο *(Melissa officinalis)* 14
Ι.3.8 Ρίγανη *(Origanum vulgare)* 15
Ι.3.9 Σπαθόχορτο ή Υπερικό *(Hypericum perforatum)* 15
Ι.3.10 Τσάι του βουνού *(Sideritis syriaca)* 16
Ι.3.11 Φασκόμηλο *(Salvia officinalis)* 16
Ι.3.12 Φλισκούνι *(Mentha pulegium)* 17
Ι.3.13 Χαμομήλι *(Matricaria chamomilla)* 17
Ι.4 Φυτοχημικά 18
Ι.4.1 Καροτενοειδή 19
Ι.4.2 Πολυφαινόλες 20
Ι.4.2.1 Φαινολικά οξέα 20
Ι.4.2.2 Φλαβονοειδή 21
Ι.4.2.3 Στιλβένια 22
Ι.4.2.4 Κουμαρίνες 22
Ι.4.2.5 Ταννίνες 23
Ι.4.3 Αλκαλοειδή 23
Ι.4.4 Μέθοδοι παραλαβής φυτοχημικών 24

I.5 Αιθέρια Έλαια 25
II. Μύκητες 27
II.1 Γενικά στοιχεία 27
II.2 Ζυγομύκητες 29
II.2.1 *Rhizopus* spp. 30
II.3 Ασκομύκητες 31
II.3.1 *Aspergillus* spp. 32
II.3.1.1 *Aspergillus flavus* 33
II.3.1.2 *Aspergillus niger* 35
II.3.1.3 *Aspergillus candidus* 36
II.3.1.4 *Aspergillus carbonarius* 36
II.3.1.5 *Aspergillus parasiticus* 37
II.3.2 *Penicillium* spp. 38
II.3.2.1 *Penicillium italicum* 39
II.3.3 *Candida* spp. 39
II.3.3.1 *Candida albicans* 40
II.3.3.2 *Candida glabrata* 41
II.3.3.3 *Candida krusei* 41
II.3.3.4 *Candida lipolytica* 42
II.3.3.5 *Candida parapsilosis* 42
III. Αντιμυκητιασική δράση βοτάνων 43
IV. Σκοπός της μελέτης 48
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 49
V.1 Προετοιμασία Εκχυλισμάτων Βοτάνων και Διαδικασία Παραλαβής Αφυδατωμένων Αφεψημάτων 49
V.2 Διαλυτοποίηση και φιλτράρισμα στερεού υπολείμματος αφεψημάτων 50
V.3 Επιλογή στελεχών μυκήτων και απομονώσεις ζυμών γένους *Candida* 51
V.4 Προετοιμασία στελεχών προς μελέτη 53
V.5 Παραλαβή σπορίων/κυττάρων-Παρασκευή εμβολίου 54
V.6 Παρασκευή θρεπτικών υλικών 55
V.7 Παρασκευή θετικών μαρτύρων 55
V.8 Εμβολιασμός θρεπτικού υλικού και επίστρωση τρυβλίων Petri 56
V.9 Διερεύνηση της αντιμυκητιασικής δράσης των εκχυλισμάτων 56
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ 59

VI.1 Παραλαβή στερεού υπολείμματος αφεψημάτων 59
VI.2 Αντιμυκητιασική δράση αφεψημάτων 61
VI.2.1 *Aspergillus* spp. 61
VI.2.2 *Rhizopus* spp. 67
VI.2.3 *Candida* spp. 69
VI.2.4 *Penicillium* spp. 72
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 79
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 80

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ι. Φαρμακευτικά φυτά-Βότανα

Ι.1 Γενικά στοιχεία-Σύντομη Ιστορική Αναδρομή

Ως φαρμακευτικό φυτό ορίζεται κάθε φυτό το οποίο χρησιμοποιείται στη θεραπεία ή πρόληψη ασθενειών και το οποίο φαίνεται να έχει έναν ωφέλιμο ρόλο στην υγεία του ανθρώπου.[1]

Τα φαρμακευτικά φυτά αποτελούν την παλαιότερη και πιο διαδεδομένη μορφή θεραπείας.[2] Σε μία σύντομη ιστορική αναδρομή, αξίζει να εστιάσουμε στο γεγονός ότι άνθρωποι από όλες τις ηπείρους χρησιμοποιούσαν καταπλάσματα και εκχυλίσματα από ενδημικά φυτά για θεραπευτικούς σκοπούς, ήδη από την προϊστορία.[3] Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές για τη χρήση των φαρμακευτικών φυτών ως παραδοσιακή μέθοδο ίασης ασθενειών από το 2800 π.Χ.[4] Αργότερα, ο Ιπποκράτης (460-377 π.Χ), στα τέλη του 5^{ου} αιώνα π.Χ κατέγραψε 300 - 400 φαρμακευτικά φυτά και εν συνεχεία ο Διοσκουρίδης κατά τον 1^{ο} αιώνα μ.Χ έγραψε το «De Materia Medica», έναν κατάλογο φαρμακευτικών φυτών, ο οποίος αποτέλεσε τη βάση της σύγχρονης φαρμακολογίας.[3] Επίσης, έχει καταγραφεί η χρήση φαρμακευτικών φυτών και στους πρώτους ιστορικούς πολιτισμούς της Κίνας, της Ινδίας και του Θιβέτ, όπου ο θεραπευτής που χρησιμοποιούσε αυτά τα φυτά κατείχε μάλιστα εξέχουσα θέση στην κοινωνία. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι μία σημαντική πρόοδος στον τομέα των φαρμακευτικών φυτών επιτεύχθηκε το 18^{ο} αιώνα, όταν ο Σουηδός Carolus Linnaeus ταξινόμησε τα φυτά αυτά. Η ταξινόμηση του αποτέλεσε το θεμέλιο για την μετέπειτα καταγραφή των σχέσεων και της εξέλιξης των φαρμακευτικών φυτών.[2]

Ως αρωματικό φυτό ορίζεται κάθε φυτό το οποίο περιέχει σε διάφορα μέρη του αιθέρια έλαια *(βλ. Ενότητα Ι.5)*. Συχνά οι όροι φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά ταυτίζονται. Τα φαρμακευτικά φυτά καλούνται επίσης και βότανα. Ως βότανα, σύμφωνα με τον ορισμό που αποδίδεται σε αυτά από το λεξικό της Οξφόρδης, θεωρούνται τα φυτά των οποίων τα διάφορα μέρη χρησιμεύουν ως τροφή ή θεραπεία, χάρη στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Επίσης, ο όρος βότανο χρησιμοποιείται προκειμένου να περιγράψει όχι μόνο τα μικρά φυλλώδη φυτά, αλλά και τους φλοιούς, τις ρίζες, τους βολβούς, τους σπόρους, τα άνθη ή τους καρπούς δέντρων, θάμνων αλλά και τα εκχυλίσματα αυτών τα οποία έχουν ιδιαίτερα

οργανοληπτικά και αρωματικά χαρακτηριστικά και τα οποία αξιολογούνται για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες.[5]

Τα βότανα έχουν χρησιμοποιηθεί ποικιλοτρόπως. Μεταξύ άλλων, έχουν χρησιμοποιηθεί ως ενισχυτικά της γεύσης και του αρώματος πολλών εδεσμάτων, ως αφεψήματα καθώς και στα πλαίσια της ιατρικής. Μάλιστα, ήδη από τα προϊστορικά χρόνια τα βότανα υπήρξαν η βάση για σχεδόν όλες τις φαρμακευτικές θεραπείες μέχρι την ανάπτυξη των συνθετικών φαρμάκων το 19^{ο} αιώνα. Σήμερα το 40% των φαρμακευτικών συνταγών περιλαμβάνει βότανα.[6]

Ορισμένες από τις θεραπευτικές ιδιότητες των φυτών, οι οποίες αρχικά τουλάχιστον καταγράφονταν μόνο εμπειρικά, σήμερα έχουν προσδιοριστεί και επεξηγηθεί. Τα τελευταία χρόνια μελέτες πάνω σε αυτό το πεδίο έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον και την προσοχή πολλών ερευνητών παγκόσμια, ενώ ταυτόχρονα μέσα από έρευνες αναδεικνύονται οι πολλά υποσχόμενες δυνατότητες χρήσης αυτών των φαρμακευτικών φυτών στην παραδοσιακή, συμπληρωματική ή εναλλακτική θεραπεία πολλών ανθρώπινων ασθενειών.[7]

I.2 Ταξινόμηση και Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Η πλειοψηφία των αρωματικών φυτών που απαντώνται στην ελληνική χλωρίδα φαίνεται να ανήκει στα Σπερματόφυτα, στην κλάση των Δικότυλων και στην οικογένεια Lamiaceae.[8] Στην οικογένεια αυτή, η οποία καλείται και οικογένεια των Χειλανθών, ανήκουν φυτά ποώδη ή ημιθαμνώδη των ξηρών και θερμών περιοχών της γης και ιδίως των παραμεσογειακών περιοχών, όπου οι εδαφοκλιματικές συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξή τους. Τα φυτά αυτά χαρακτηρίζονται από τετράγωνο βλαστό, αντίθετα και ανά ζεύγος σταυροειδώς εκφυόμενα φύλλα, ζυγόμορφα άνθη και αρωματική οσμή που αναδύεται ιδίως όταν αυτά τρίβονται ή τραυματίζονται.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν, ακόμη, και οι οικογένειες Asteraceae και Clusiaceae. Η πρώτη ανήκει επίσης στην κλάση των Δικότυλων και συγκεκριμένα στην τάξη Asterales. Η τάξη αυτή, γνωστή και ως τάξη των Συνθέτων, περιλαμβάνει ετήσια, διετή ή πολυετή ποώδη φυτά, σπανίως ξυλώδη, τα οποία απαντώνται σε διάφορες περιοχές της γης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι στην οικογένεια Clusiaceae ανήκουν περίπου 150 είδη ποωδών και θαμνωδών φυτών ή και φρύγανα.[8]

Ι.3 Ελληνικά αρωματικά φυτά

Η Ελλάδα αποτελεί μία χώρα με εξαιρετικά πλούσια χλωρίδα, στην οποία ανήκουν πολλά αρωματικά φυτά, ορισμένα εκ των οποίων μάλιστα είναι ενδημικά της χώρας. Στα πλαίσια του ερευνητικού ενδιαφέροντος της παρούσας πτυχιακής μελέτης παρατίθενται πληροφορίες σχετικά με ορισμένα ελληνικά αρωματικά φυτά.

Ι.3.1 Αντωναίδα ή Τεύκτρο (*Origanum microphyllum*)

Ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και στο γένος *Origanum.* Πρόκειται για ενδημικό φυτό της Κρήτης, το οποίο απαντάται κυρίως στην Ανατολική και Δυτική περιοχή της σε υψόμετρο 400 με 900 μέτρων. Είναι πολυετής θάμνος και φέρει πολλούς βλαστούς με διακλαδώσεις και μήκος 20 με 50 εκατοστά ο καθένας. Η στεφάνη της έχει πορφυρό χρώμα. Ευδοκιμεί από τον Ιούνιο μέχρι το Σεπτέμβριο.

Εμφανίζει ευεργετικές δράσεις στην υγεία του ανθρώπου, οι οποίες έχουν αποδοθεί στα αιθέρια έλαια *(βλ.Ενότητα 1.5)* που περιέχει και τα οποία μεταξύ άλλων φαίνεται να εμφανίζουν και ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι βακτηρίων αλλά και μυκήτων.[9]

Ι.3.2 Δενδρολίβανο *(Rosmarinus officinalis)*

Ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και στο γένος *Rosmarinus.* Ευδοκιμεί στην περιοχή της Μεσογείου αλλά σήμερα καλλιεργείται σχεδόν σε όλο τον κόσμο. Είναι φυτό θαμνώδες με ύψος που δεν ξεπερνά τα 2 μέτρα. Τα άνθη του είναι λευκά, κυανόλευκα ή μωβ. Είναι ανθεκτικό σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και ξηρασίας. Ευδοκιμεί κυρίως τους μήνες της άνοιξης.

Τα εκχυλίσματά του έχουν χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικά τροφίμων λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής τους δράσης. Επιπλέον, χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ιατρική εδώ και αιώνες, λόγω των αντιμικροβιακών, αντι-φλεγμονωδών, νευροπροστατευτικών, αντιοξειδωτικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων του.[10]

Ι.3.3 Δίκταμο *(Origanum dictamnus)*

Ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και στο γένος *Origanum.* Πρόκειται για ενδημικό φυτό της Κρήτης το οποίο απαντάται σε όλα τα βουνά του νησιού. Το ύψος του κυμαίνεται από 30 εώς 40 εκατοστά και έχει βιολετί άνθη. Ευδοκιμεί κυρίως από τον Ιούνιο ως τον Οκτώβριο.

Η χρήση του καταγράφηκε για πρώτη φορά από τους αρχαίους Έλληνες φιλοσόφους και γιατρούς, μεταξύ των οποίων και ο Αριστοτέλης και ο Ιπποκράτης, για τη βοήθειά του στον τοκετό και τη θεραπεία πληγών και δερματικών παθήσεων. Σήμερα, τα φύλλα και τα άνθη του χρησιμοποιούνται ευρέως στην Κρήτη για τη θεραπεία του πονόλαιμου, του βήχα, την ανακούφιση του στομαχόπονου και την καταπολέμηση άλλων ασθενειών και πόνων. Τέλος, εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση.[11]

Ι.3.4 Θρύμπα *(Satureja trhymbra)*

Ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και στο γένος *Satureja.* Τα είδη αυτού του γένους είναι ευρέως διαδεδομένα στην περιοχή της Μεσογείου και απαντώνται συνηθέστερα σε ηλιόλουστες, ξηρές και βραχώδεις περιοχές. Το συγκεκριμένο φυτό είναι θαμνώδες, με ύψος 20 με 35 εκατοστά και διακλαδώσεις.[12] Τα άνθη του είναι ροζ ή άσπρα και η καλύτερη περίοδος ανθοφορίας του είναι από τα μέσα Απριλίου ως τις αρχές Μαΐου.

Τα αιθέρια έλαια του φυτού αυτού χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή ιατρική ως αντισηπτικά, τονωτικά, διουρητικά και καταπραϋντικά. Επίσης, γενικά τα φυτά αυτού του γένους έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία πολλών ασθενειών, όπως των μυϊκών πόνων, της δυσπεψίας, της ναυτίας, της διάρροιας και ορισμένων μολυσματικών ασθενειών. Τέλος, έχουν χρησιμοποιηθεί ως αντιβακτηριακά, για την αντιμετώπιση του κρύου και της βρογχίτιδας. [12]

Ι.3.5 Θυμάρι *(Thymus vulgaris)*

Ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και στο γένος *Thymus*. Ευδοκιμεί στην δυτική περιοχή της Μεσογείου, αλλά καλλιεργείται και σε πολλές άλλες περιοχές με

εύκρατο κλίμακα. Είναι αυξανόμενης οικονομικής σημασίας φυτό για τη Βόρεια Αμερική, την Ευρώπη, τη Βόρεια Αφρική και την Ασία.[13] Πρόκειται για πολυετή, πολύκλαδο, μικρό θάμνο, ύψους μέχρι 30 εκατοστών, με μικρά και στενά φύλλα τα οποία όταν ξεραθούν αποκτούν καφεπράσινο χρώμα. Η καλύτερη περίοδος ανθοφορίας του είναι τους καλοκαιρινούς μήνες.

Εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση και χρησιμοποιείται ευρέως στην παραδοσιακή ιατρική σαν αντιβηχικό, αντισπασμωδικό, αντιβρογχολυτικό αλλά και για τις αντιφλεγμονώδεις, αντιδιουρητικές και αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Τα αιθέρια έλαιά του φαίνεται να εμποδίζουν την ανάπτυξη ορισμένων μυκήτων και την παραγωγή αφλατοξινών.[13]

Ι.3.6 Μαντζουράνα *(Origanum majorana)*

Ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και στο γένος *Origanum.* Αναπτύσσεται κυρίως σε βραχώδεις περιοχές της Κρήτης και της Κύπρου. Είναι πολυετές φυτό με ύψος που δεν ξεπερνά τα 60 εκατοστά και άνθη λευκού-ροζ χρώματος. Όλο το φυτό έχει σταχτοπράσινο χρώμα και η καλύτερη περίοδος ανθοφορίας του είναι από το καλοκαίρι μέχρι το φθινόπωρο.

Παραδοσιακά τα φύλλα του έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του διαβήτη, της αϋπνίας, της καταρροής, του άσθματος και της νευρικότητας. Πρόσφατα έχουν αναδειχθεί οι αντιβακτηριακές, ηπατοπροστατευτικές, αντιϋπεργλυκαιμικές, αντιλιπιδαιμικές, αντιυπερτασικές, αντιθρομβωτικές και κατά του έλκους ιδιότητές του. Το άρωμα και οι δράσεις του, ωστόσο, είναι ηπιότερες από τη συγγενική του ρίγανη.[14]

Ι.3.7 Μελισσόχορτο *(Melissa officinalis)*

Ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και στο γένος *Mentha.* Ευδοκιμεί στη νότια Ευρώπη και στην περιοχή της Μεσογείου, αλλά σήμερα καλλιεργείται σε πολλές ακόμη περιοχές. Πρόκειται για πολυετή πόα ύψους 70-150 εκατοστών, με υποκίτρινα ή λευκά άνθη. Η περίοδος ανθοφορίας του είναι οι καλοκαιρινοί μήνες.

Χρησιμοποιείται συχνά, κυρίως στην Ευρώπη, για τις αρωματικές, πεπτικές και αντισπασμωδικές του ιδιότητες σε νευρικές και γαστρεντερικές διαταραχές.[15] Έχει φανεί, επίσης, ότι διαθέτει αντιμικροβιακή δράση αν και αυτή είναι πολύ πιο ασθενής από ότι άλλων φυτών.

Ι.3.8 Ρίγανη *(Origanum vulgare)*

Ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και στο γένος *Origanum.* Ευδοκιμεί σε ξηρές, ηλιόλουστες και βραχώδεις τοποθεσίες της Ευρώπης και της Ασίας, ιδιαίτερα στην περιοχή της Μεσογείου. Αναφύεται επίσης και σε ορεινές περιοχές της Βαλκανικής. Πρόκειται για πολυετή πόα, ύψους μέχρι 50 εκατοστών, με οβάλ φύλλα και μωβ άνθη. Η καταλληλότερη περίοδος ανθοφορίας της είναι από τον Ιούνιο μέχρι τον Αύγουστο.

Στην παραδοσιακή ιατρική έχει χρησιμοποιηθεί κατά του κρυολογήματος, καθώς και για την επίλυση πεπτικών και αναπνευστικών προβλημάτων. Έχουν αποδειχθεί, επίσης, οι αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές δράσεις των αιθέριων ελαίων του αλλά και ορισμένων εκχυλισμάτων του ενώ τέλος, σε ορισμένα εκχυλίσματα αποδίδονται και αντιφλεγμονώδεις και αντιυπεργλυκαιμικές ιδιότητες.[16]

Ι.3.9 Σπαθόχορτο ή Υπερικό *(Hypericum perforatum)*

Ανήκει στην οικογένεια Clusiacea και στο γένος *Hypericum.* Απαντάται στην Ευρώπη, τη Δυτική Ασία, τη Βόρεια Αφρική, αλλά και στη Βόρεια Αμερική και την Αυστραλία.[17] Πρόκειται για πολυετή θάμνο, του οποίου το ύψος μπορεί να φτάσει μέχρι και το 1 μέτρο. Τα άνθη του είναι χρυσοκίτρινα και η περίοδος ανθοφορίας του είναι από τον Ιούνιο μέχρι το Σεπτέμβριο.

Έχει χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική ποικιλοτρόπως, όπως για τη θεραπεία δερματικών πληγών, εκζεμάτων και εγκαυμάτων, για την αντιμετώπιση των ερεθισμών του βλεννογόνου και της νευραλγίας. Επιπλέον, στο παρελθόν έχουν καταγραφεί χρήσεις του συγκεκριμένου φυτού στην παραδοσιακή ιατρική για την καταπολέμηση πετρών και ελκών στην ουροδόχο κύστη, ελκών στα νεφρά, του

πυρετού, του ίκτερου, της ουρικής αρθρίτιδας, των ρευματισμών αλλά και η χρήση του ως αντιδιουρητικό.[17] Ακόμη, σημαντική είναι και η συμβολή του σε περιπτώσεις κατάθλιψης, καθώς και οι αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Τέλος, έχουν καταγραφεί και παρενέργειες, μεταξύ των οποίων ναυτία, ξηροστομία, έμετοι, πονοκέφαλος, κόπωση, αλλεργικές αντιδράσεις, οι οποίες όμως προκύπτουν κυρίως μετά την κατανάλωση μεγάλων δόσεων του συγκεκριμένου φυτού.[18]

I.3.10 Τσάι του βουνού *(Sideritis syriaca)*

Ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και στο γένος *Sideritis.* Ευδοκιμεί σε πετρώδεις και βραχώδεις περιοχές, με μεγάλο υψόμετρο. Είναι πολυετής θάμνος με ύψος ως 50 εκατοστά και λευκά ή κίτρινα, μικρά άνθη. Στη Βαλκανική Χερσόνησο, καταναλώνεται πολύ συχνά, λόγω της ιδιαίτερης γεύσης του και των πιθανών φαρμακολογικών του ιδιοτήτων.

Στην παραδοσιακή ιατρική έχει χρησιμοποιηθεί για τις αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αναλγητικές, αντιρευματικές και τονωτικές του ιδιότητες, ενώ ακόμη και σήμερα χρησιμοποιείται για να προσφέρει ανακούφιση από το κοινό κρυολόγημα. [19]

I.3.11 Φασκόμηλο *(Salvia officinalis)*

Ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και στο γένος *Salvia.* Απαντάται σε όλη την Ελλάδα και κυρίως σε ξηρά και πετρώδη μέρη. Πρόκειται για ένα πολυετές και θαμνώδες φυτό με μωβ άνθη και ύψος το οποίο φτάνει τα 50 εκατοστά. Η ανθοφορία του πραγματοποιείται από το Μάιο ως τον Ιούνιο.

Το κατεξοχήν χρησιμοποιούμενο τμήμα του φυτού αυτού είναι τα φύλλα του, τα οποία συλλέγονται είτε λίγο πριν είτε στην αρχή της ανθοφορίας. Χρησιμοποιείται τόσο στη μαγειρική όσο και στην ιατρική, καθώς τα φύλλα του φαίνεται να έχουν ποικίλες δράσεις, μεταξύ των οποίων αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, γαστροπροστατευτικές, σπασμολυτικές και αντιυπεργλυκαιμικές.[20] Τα αιθέρια έλαιά του εμφανίζουν αντιμικροβιακές και αντιμυκητιασικές ιδιότητες. [21]

Ι.3.12 Φλισκούνι *(Mentha pulegium)*

Ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και στο γένος *Mentha.* Ευδοκιμεί σε υγρά περιβάλλοντα, όπως κοντά σε λίμνες και ποτάμια στην Ευρώπη, τη Βόρεια Αφρική, τη Μικρά Ασία και την Εγγύς Ανατολή.[22] Αρχικά αναπτύσσεται ένα μικρό φυτό με έντονο άρωμα μέντας και κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού οι μίσχοι του φυτού αυτού αναπτύσσονται σε ύψος και ο ανώτερος περιβάλλεται από άνθη. Η περίοδος ανθοφορίας του είναι από τον Ιούνιο μέχρι τον Οκτώβριο.

Το φυτό αυτό έχει χρησιμοποιηθεί παραδοσιακά για τις αντισηπτικές του ιδιότητες, στα πλαίσια της θεραπείας του κρύου, της ιγμορίτιδας, της χολέρας, της τροφικής δηλητηρίασης, της βρογχίτιδας και της φυματίωσης αλλά και σαν αποχρεμπτικό, διουρητικό, αντιβηχικό. Επίσης έχουν καταγραφεί οι αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Παρ' όλα αυτά η υπερβολική κατανάλωσή του πρέπει να αποφεύγεται καθώς μπορεί να προκαλέσει κυτταροτοξικότητα. [22]

Ι.3.13 Χαμομήλι *(Matricaria chamomilla)*

Ανήκει στην οικογένεια Asteraceae και στο γένος *Matricaria.* Ευδοκιμεί στην ανατολική και δυτική Ευρώπη, καλλιεργείται όμως και στη Γερμανία, την Ουγγαρία, τη Γαλλία, τη Ρωσία, τη Γιουγκοσλαβία και τη Βραζιλία.[23] Πρόκειται για μονοετές, ποώδες φυτό με ύψος ως 35 εκατοστά και με λευκοκίτρινα άνθη.

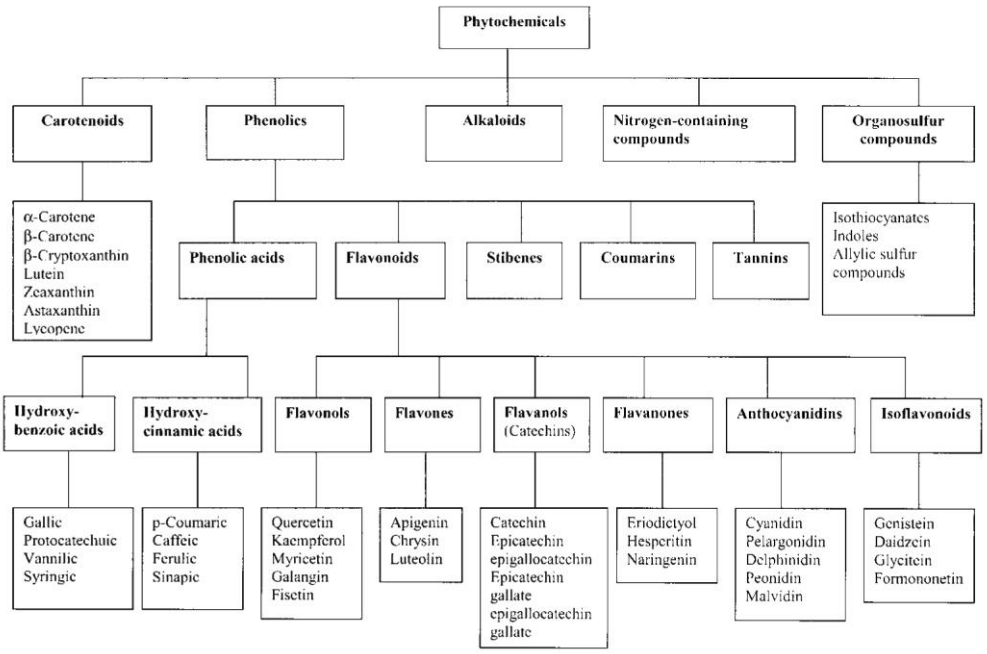
Έχει χρησιμοποιηθεί ποικιλοτρόπως και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται σήμερα για τις ηρεμιστικές του ιδιότητες, για την ανακούφιση του κοιλιακού μετεωρισμού, της ναυτίας, των κολικών και του διαλείποντος πυρετού. Χρησιμοποιείται, επίσης, ως αντιφλεγμονώδες, αντισηπτικό και αντισπασμωδικό, αλλά και για την ανακούφιση τραυμάτων που αργούν να επουλωθούν, δερματικών εξανθημάτων, λοιμώξεων και φλεγμονών του στόματος, του φάρυγγα, και των ματιών.[23] Τα αιθέρια έλαιά του χρησιμοποιούνται, επίσης, από τις βιομηχανίες παραγωγής καλλυντικών. Εμφανίζει, τέλος, αντιβακτηριακές ιδιότητες. [24]

Ι.4 Φυτοχημικά

Οι φαρμακευτικές δράσεις των φυτών αποδίδονται στα περιεχόμενα φυτοχημικά συστατικά τους.[25] Τα περισσότερα από τα φυτοχημικά συστατικά συνιστούν δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών.[26] Για πολλές δεκαετίες οι δευτερογενείς μεταβολίτες θεωρούνταν εσφαλμένα άχρηστα προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού. Σήμερα, ωστόσο, είναι πλέον γνωστό ότι η σύνθεσή τους σχετίζεται άμεσα με τη λειτουργία των φυτικών κυττάρων και ιστών, αλλά και με αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών ενάντια σε παθογόνα, έντομα ή φυτοφάγα ζώα.[27]

Τα φυτοχημικά απορροφώνται από τον άνθρωπο ποικιλοτρόπως, ωστόσο δεν αναγνωρίζονται σαν θρεπτικά συστατικά, καθώς η έλλειψή τους δεν έχει συσχετιστεί με κάποια ανεπάρκεια στον ανθρώπινο οργανισμό.[28] Φαίνεται να εμφανίζουν ποικίλες ωφέλιμες βιολογικές δράσεις, μεταξύ των οποίων η αντιοξειδωτική, η καρδιοπροστατευτική, η χημειοπροστατευτική δράση και φυσικά η αντιμικροβιακή δράση, τόσο έναντι βακτηρίων όσο και μυκήτων.[7] Λόγω των δράσεων αυτών, χρησιμοποιούνται συχνά στην παραγωγή φαρμάκων, διαιτητικών συμπληρωμάτων και φαρμακευτικών καλλυντικών.[29]

Τα διαιτητικά φυτοχημικά μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής:



Εικόνα 1: Ταξινόμηση διαιτητικών φυτοχημικών

Στη συνέχεια παρουσιάζονται πληροφορίες σχετικά με τις κυριότερες ομάδες φυτοχημικών, όπως αυτές ταξινομήθηκαν στην **Εικόνα 1.**

Ι.4.1 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή αποτελούν μία σημαντική, δομικά και λειτουργικά ποικιλόμορφη ομάδα φυσικών χρωστικών. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 700 καροτενοειδή στη φύση, εκ των οποίων τα 50 είναι συστατικά της ανθρώπινης διατροφής.[30] Καθότι συστατικά των φωτοσυνθετικών οργανιδίων, τα καροτενοειδή απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς που μπορούν να φωτοσυνθέσουν. Απαντώνται, ακόμη, στο αίμα και τους ιστούς του ανθρώπου και των ζώων, παρ' ότι δεν συντίθενται από αυτούς τους οργανισμούς.[30] Η διατροφική τους αξία έγκειται στο ότι ορισμένα από αυτά αποτελούν πρόδρομες ενώσεις της ρετινόλης.[31] Τέλος, από δομικής πλευράς, τα περισσότερα διαθέτουν ένα συμμετρικό σκελετό τετρατερπενίου, αποτελούμενο από 2 συνδεόμενα τμήματα 20 ατόμων άνθρακα το καθένα.[30]

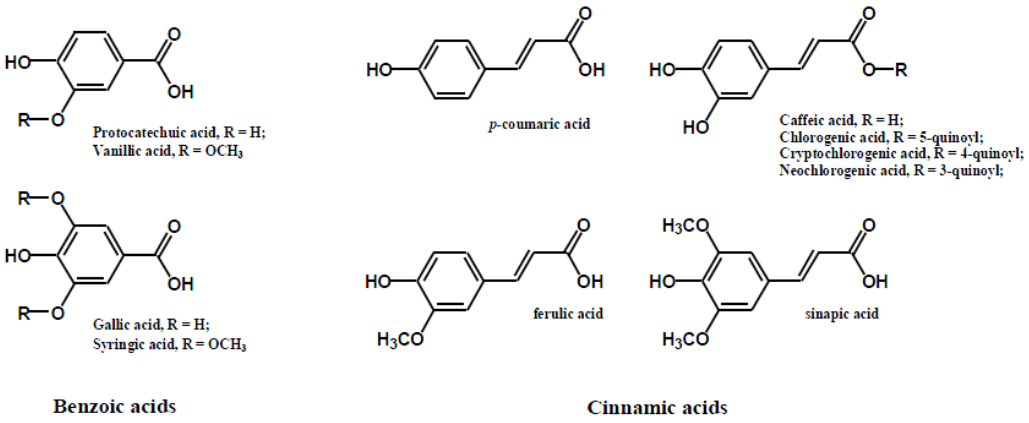
Ι.4.2 Πολυφαινόλες

Οι διαιτητικές φαινόλες ή πολυφαινόλες αποτελούν μια πολυάριθμη και ευρέως διαδεδομένη ομάδα ενώσεων στο βασίλειο των φυτών. Σήμερα είναι γνωστές περισσότερες από 8000 φαινολικές δομές και μεταξύ αυτών έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 4000 φλαβονοειδή.[32] Οι πολυφαινόλες κατέχουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του φυτού, μέσω της συνεισφοράς τους στη μορφολογία αυτού αλλά και της εμπλοκής τους στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή του. Συμβάλλουν στην προστασία των φυτών όχι μόνο από παθογόνα αλλά και από αρπακτικά, μέσω της δράσης τους σαν φυτοαλεξίνες και μέσω της ενίσχυσης της στυφότητας των φυτών, καθιστώντας με τον τρόπο αυτό πιο δυσάρεστη τη γεύση τους.[33]

Σε γενικές γραμμές, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε: i) φαινολικά οξέα, ii) φλαβονοειδή, iii) στιλβένια, iv) κουμαρίνες και v) ταννίνες.

Ι.4.2.1 Φαινολικά οξέα

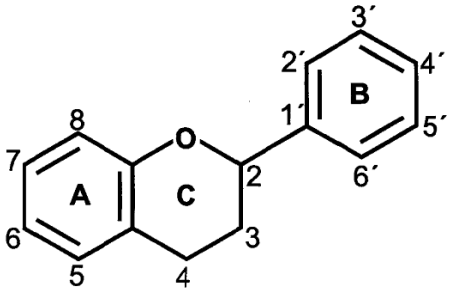
Τα φαινολικά οξέα είναι μη φλαβονοειδείς πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες διαιρούνται σε δύο κατηγορίες: στα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και στα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος.[34] Οι διάφορες μαγειρικές παρασκευές όπως η θερμική επεξεργασία, η παστερίωση, η ζύμωση και η κατάψυξη συμβάλλουν στην απελευθέρωση αυτών των ενώσεων.[35] Σε ό,τι αφορά τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, η συγκέντρωση τους στα εδώδιμα φυτά είναι σχετικά χαμηλή, με εξαίρεση ορισμένα μόνο φρούτα και λαχανικά και συνήθως αποτελούν συστατικά σύνθετων μορίων όπως οι υδρολυμένες ταννίνες ή οι λιγνίνες.[35] Από την άλλη πλευρά, τα υδροξυκινναμωμικά οξέα, απαντώνται συνηθέστερα στα φυτικά τρόφιμα.[34] Σε αυτά ανήκουν το p-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το φερουλικό οξύ και το σιναπτικό οξύ. Τα υδροξυκινναμωμικά οξέα βρίσκονται συχνά συνδεδεμένα μέσω εστερικών δεσμών με δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, όπως η κυτταρίνη, η λιγνίνη και διάφορες πρωτεΐνες.[35]



Εικόνα 2: Χημική δομή φαινολικών οξέων

I.4.2.2 Φλαβονοειδή

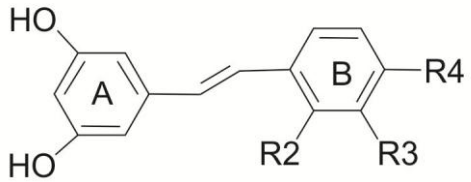
Τα φλαβονοειδή είναι η πιο μελετημένη ομάδα μεταξύ των πολυφαινολών. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερα από 4000 φλαβονοειδή, πολλά από τα οποία είναι υπεύθυνα για το ελκυστικό χρώμα ορισμένων λουλουδιών, φρούτων και φύλλων.[32] Αναφορικά με τη δομή τους, τα φλαβονοειδή αποτελούνται από δύο αρωματικούς δακτυλίους, A και B, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με τρία άτομα άνθρακα, προς σχηματισμό συνήθως ενός οξυγονωμένου ετεροκυκλικού δακτυλίου.[34] (Εικόνα 4) Με βάση διαφορές στη δομή αυτού του ετεροκυκλικού δακτυλίου τα φλαβονοειδή ταξινομούνται περαιτέρω στις εξής κατηγορίες: φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβανόλες (κατεχίνες), ανθοκυανίνες, ισοφλαβονοειδή και τέλος χαλκόνες.[36] Τα πιο άφθονα φλαβονοειδή στη δίαιτα είναι οι φλαβανόλες, στις οποίες ανήκουν οι κατεχίνες.[37] Οι προανθοκυανιδίνες είναι επίσης γνωστές ως συμπυκνωμένες ταννίνες.



Εικόνα 3: Χημική δομή φλαβονοειδών

Ι.4.2.3 Στιλβένια

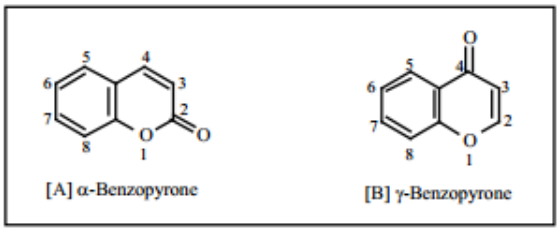
Τα στιλβένια είναι 1,2-διακετυλοαιθένια. Συντίθενται από παράγωγα του κινναμωμικού οξέος.[38] Τα στιλβένια παράγονται από μία ποικιλία φυτών σαν μονομερή, διμερή, τριμερή και πολυμερή ή ως γλυκοζίτες και απαντώνται κυρίως στις ρίζες, τους φλοιούς και τα φύλλα αυτών. Ωστόσο, τα στιλβένια παράγονται κυρίως από φυτά τα οποία συνήθως δεν καταναλώνονται από τον άνθρωπο, ή από μη βρώσιμα τμήματα των φυτών.[39] Κατά συνέπεια, η παρουσία τους στην ανθρώπινη διατροφή είναι μικρή. Στην πλειοψηφία τους δρουν ως φυτοαλεξίνες.[34]



Εικόνα 4: Χημική δομή Στιλβενίων

Ι.4.2.4 Κουμαρίνες

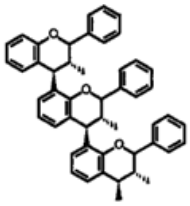
Οι κουμαρίνες είναι φαινολικές ενώσεις, μέλη της οικογένειας των βενζοπυρονών. Οι βενζοπυρόνες διακρίνονται σε α-βενζοπυρόνες, στις οποίες ανήκουν οι κουμαρίνες και σε γ-βενζοπυρόνες, στις οποίες κύρια μέλη είναι τα φλαβονοειδή. Σχετικά με τη δομή τους, οι κουμαρίνες αποτελούνται από έναν βενζοϊκό δακτύλιο ο οποίος συνδέεται με έναν α-πυρονικό δακτύλιο.[3, 40] Στην πλειοψηφία τους, απαντώνται σε όλα τα μέρη των ανώτερων φυτών, είτε στην ελεύθερη μορφή τους είτε σαν γλυκοζίτες. Απαντώνται συχνότερα στις ρίζες, τους μίσχους και τα φύλλα, ενώ οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι εποχιακές αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν την παρουσία των ενώσεων αυτών στα διαφορετικά μέρη του φυτού.[38, 40]



Εικόνα 5: Χημική δομή Βενζοπυρονών

Ι.4.2.5 Ταννίνες

Οι ταννίνες είναι φυσικές, υδατοδιαλυτές, πολυφαινολικές ενώσεις, μοριακού βάρους μεταξύ 500 και 4000. Διακρίνονται σε 2 κατηγορίες: στις υδρολυμένες ταννίνες και τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι υδρολυμένες ταννίνες αποτελούνται από μία πολυυδρική αλκοόλη όπως η γλυκόζη και από υδροξυλομάδες, οι οποίες είναι εστεροποιημένες είτε εν μέρει είτε εξ ολοκλήρου με γαλλικό οξύ ή με εξαϋδροξυ-διφαινικό οξύ ή άλλους υποκαταστάτες. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες (προανθοκυανιδίνες), είναι δομικά πιο περίπλοκες ενώσεις και πιο ευρέως διαδεδομένες στα φυτά συγκριτικά με τις υδρολυόμενες. Οι προανθοκυανιδίνες είναι πολυμερή των φλαβανολών.[37]



Εικόνα 6: Χημική δομή συμπυκνωμένων ταννινών

Ι.4.3 Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή απαντώνται κυρίως στα φυτά, ωστόσο ορισμένα από αυτά απαντώνται επίσης σε μικροοργανισμούς και ζώα. Είναι ετεροκυκλικές ενώσεις οι οποίες περιέχουν άζωτο.[3] Μπορούν να ταξινομηθούν με κριτήριο τη φύση του αζώτου που περιέχουν σε ινδόλια, κινολίνες, πυρρολιδίνες κ.ά και με κριτήριο το πρόδρομο αμινοξύ από το οποίο συντίθενται σε αλκαλοειδή από την ορνιθίνη, τη λυσίνη, το νικοτινικό οξύ, την τυροσίνη, την τρυπτοφάνη, το ανθρανιλικό οξύ και την ιστιδίνη. Στα φυτά τα αλκαλοειδή αποτελούν ίσως την πιο διαδεδομένη ομάδα

αμυντικών μορίων καθώς εμφανίζουν τοξική δράση ενάντια σε ζωικούς κυρίως οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Σε χαμηλή δοσολογία, ωστόσο, χρησιμοποιούνται σαν φάρμακα, διεγερτικά ή καταπραϋντικά.[27]

Ι.4.4 Μέθοδοι παραλαβής φυτοχημικών

Ήδη από την αρχαιότητα χρησιμοποιήθηκαν ποικίλες μέθοδοι για την παραλαβή των βιοδραστικών αυτών συστατικών διαφόρων φυτών. Η πιο κοινή εξ αυτών είναι με διαφορά το βράσιμο των φυτών σε νερό ή άλλα μίγματα υγρών, προς παρασκευή αφεψημάτων ή άλλων ποτών που να περιέχουν είτε αραιωμένες είτε συμπυκνωμένες αυτές τις βιοδραστικές ενώσεις. Σε γενικές γραμμές, η παρασκευή των αφεψημάτων μπορεί να επιτευχθεί με δύο τρόπους. Με τη διαδικασία της «έγχυσης», κατά την οποία ζεστό νερό ή άλλα υγρά αφήνονται να ρέουν για ορισμένα λεπτά πάνω από μία συγκεκριμένη ποσότητα του εκάστοτε φαρμακευτικού φυτού, αφού πρώτα αυτό τεμαχιστεί ή με το βράσιμο και τον εμποτισμό των σκληρότερων τμημάτων του φυτού ή και ολόκληρου του φυτού σε νερό ή σε άλλα υγρά αντίστοιχα. Η θερμική επεξεργασία ενός φυτού εξασφαλίζει όχι μόνο την εκχύλιση των βιοδραστικών συστατικών του αλλά και τη μείωση της συγκέντρωσης πιθανά επικίνδυνων προσμίξεων σε αυτό πριν την κατανάλωσή του.[2]

Επίσης, οι περιεχόμενες στα φυτά βιοδραστικές ενώσεις μπορούν να εκχυλιστούν και με τη βοήθεια οργανικών διαλυτών, συνηθέστερα αιθανόλης και μεθανόλης. Κατά την παρασκευή αλκοολικών διαλυμάτων, τα φυτά αφήνονται για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα σε αιθανόλη ή μεθανόλη, και ακολούθως φιλτράρονται και ξεπλένονται. Στη συνέχεια, μπορεί ακόμη να αποξηρανθούν υπό συνθήκες χαμηλής πίεσης και να επαναδιαλυτοποιηθούν σε αλκοόλη προς επίτευξη μίας συγκεκριμένης συγκέντρωσης.[3]

Στο σημείο αυτό αξίζει να επισημανθεί ότι, τα περιεχόμενα φυτοχημικά συστατικά στα διάφορα εκχυλίσματα ποικίλουν, ανάλογα με το είδος του διαλύτη που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση. Ο **πίνακας Ι** που ακολουθεί συνοψίζει ορισμένα είδη διαλυτών και τις απαντώμενες σε αυτά βιοδραστικές ενώσεις.[3]

Πίνακας Ι: Συνηθέστερα απαντώμενες βιοδραστικές ενώσεις σε διαφορετικά είδη διαλυτών

Water	Ethanol	Methanol	Chloroform	Dichloromethanol	Ether	Acetone
Anthocyanins	Tannins	Anthocyanins	Terpenoids	Terpenoids	Alkaloids	Flavonols
Starches	Polyphenols	Terpenoids	Flavonoids		Terpenoids	
Tannins	**Polyacetylenes**	Saponins			**Coumarins**	
Saponins	Flavonol	Tannins			**Fatty acids**	
Terpenoids	Terpenoids	**Xanthoxyllines**				
Polypeptides	**Sterols**	**Totarol**				
Lectins	Alkaloids	**Quassinoids**				
	Propolis	**Lactones**				
		Flavones				
		Phenones				
		Polyphenols				

Ι.5 Αιθέρια Έλαια

Τα αιθέρια έλαια είναι αρωματικά, πτητικά κλάσματα, τα οποία απομονώνονται με κάποια φυσική διεργασία από φυτικές ύλες. Παραλαμβάνονται από διαφορετικά μέρη ενός φυτού, όπως ενδεικτικά από τα άνθη, τα φύλλα, τους καρπούς, τις ρίζες, τα κλαδιά και τους σπόρους.[41] Είναι πλούσια σε ενώσεις με ισοπρενοειδή δομή, οι οποίες καλούνται τερπένια. Η γενική χημική δομή των τερπενίων είναι $C_{10}H_{16}$ και απαντώνται σαν διτερπένια, τριτερπένια και τετρατερπένια, όπως επίσης και σαν ημιτερπένια και σεσκιτερπένια.[3] Τα αιθέρια έλαια παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, τα οποία εξαρτώνται από τις διαφορετικές χημικές ομάδες που συνδέονται σε αυτά.

Γενικά τα συστατικά των αιθέριων ελαίων μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: στα οξυγονούχα και στα μη οξυγονούχα. Στα οξυγονούχα συστατικά ανήκουν ενώσεις, στις οποίες αποδίδεται το άρωμα των ελαίων, όπως οι αλκοόλες, οι κετόνες, οι αλδεΰδες, οι φαινόλες, οξέα, εστέρες κ.ά. Στα μη οξυγονούχα ανήκουν συστατικά, των οποίων η συμβολή στο άρωμα των ελαίων είναι μηδαμινή.[42] Το ποσοστό των περιεχόμενων ενώσεων στα αιθέρια έλαια ποικίλει μεταξύ διαφορετικών φυτών και διαφορετικών τμημάτων του ίδιου φυτού.[41] Επιπλέον, η σύστασή τους σε οργανικές ενώσεις φαίνεται να εξαρτάται και από παράγοντες όπως οι περιβαλλοντικές και εδαφικές συνθήκες, το κλίμα, ο χρόνος συγκομιδής καθώς και οι μετασυλλεκτικοί χειρισμοί.[43] Τέλος, τα αιθέρια έλαια παραλαμβάνονται κυρίως

τις θερμές ημέρες, ενώ υπάρχουν ποικίλες μέθοδοι εκχύλισής τους, με την απόσταξη με ατμό να συνιστά την πιο κοινή.[41, 44]

ΙΙ. Μύκητες

ΙΙ.1 Γενικά στοιχεία

Οι μύκητες συνιστούν το τρίτο από τα πέντε βασίλεια στα οποία κατατάσσονται τα έμβια όντα, σύμφωνα με το σχήμα Whittaker (1959).[45] Τα πιο πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα αναφέρουν ότι το Βασίλειό τους περιλαμβάνει 7 φύλλα, 35 τάξεις και 129 γένη. [46]

Είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι επιβιώνουν είτε παρασιτώντας σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς, είτε σαπροφυτώντας πάνω σε νεκρά οργανικά υποστρώματα.[47] Ωστόσο, ορισμένοι αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με άλλους οργανισμούς, όπως με ορισμένα φυτά και φύκη. Το σώμα τους καλείται θαλλός και μπορεί να αποτελείται είτε από λεπτές, μικροσκοπικές, νηματοειδείς υφές οι οποίες συνενώνονται σχηματίζοντας το μυκήλιο, είτε από μεμονωμένα κύτταρα.[48] Έτσι, οι μύκητες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στους μυκηλιακούς μύκητες και στους ζυμομύκητες ή ζύμες αντίστοιχα. Παρ' όλα αυτά ορισμένοι μύκητες, κυρίως ευκαιριακά παθογόνα του ανθρώπινου οργανισμού, εμφανίζουν το φαινόμενο του διμορφισμού.[49]

Οι υφές των μυκηλιακών μυκήτων διακρίνονται με τη σειρά τους σε δύο κατηγορίες: στις κοινοκύτταρες υφές με ενιαίο εσωτερικό χώρο, χωρίς διαφράγματα, εντός του οποίου κινούνται ελεύθερα το πρωτόπλασμα και τα οργανίδια και στις πολυκύτταρες υφές με εγκάρσια διαφράγματα (septa), τα οποία συχνά φέρουν στο κέντρο τους οπές. [49, 50].

Κάθε υφή περιβάλλεται από ένα διακριτό κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο διαμορφώνεται από ένα διαρθρωτικό σκελετό ινών, οι οποίες διασταυρώνονται και καθορίζουν τη διατασσιμότητά του και από ένα πηκτώδες ή κρυσταλλώδες πλέγμα, το οποίο επηρεάζει τη διαπερατότητά του. Παρ' ότι όμως η δομή του κυτταρικού τοιχώματος είναι κοινή μεταξύ διαφορετικών μυκήτων, η χημική του σύσταση διαφέρει.[49] Η ανάπτυξή των υφών επιτυγχάνεται με συνεχή επέκταση των άκρων τους. Μια ποικιλία κυστιδίων και μικροκυστιδίων φαίνεται να συσσωρεύεται στην ακραία υφή. Τα κυστίδια αυτά παρέχουν το υλικό για τη σύνθεση νέας κυτταρικής μεμβράνης, ενώ ορισμένα από αυτά μεταφέρουν επίσης κυτταρικές συνθετάσες όπως συνθετάσες χιτίνης.[49]

Όσον αφορά τη δομή των ζυμομυκήτων, αυτή ποικίλει. Οι τυπικές ζύμες δεν σχηματίζουν θαλλό, ωστόσο αυτού του είδους οι ζύμες συνιστούν ένα μικρό ποσοστό του συνόλου των ζυμομυκήτων. Η πλειοψηφία των ζυμομυκήτων εμφανίζει θαλλό, ο οποίος μπορεί να αποτελείται από μία απλή αλυσίδα μη διαφοροποιημένων κυττάρων ή από συμπλέγματα αλυσίδων, σχηματίζοντας υποτυπώδη ψευδομυκήλια. [47] Τα κύτταρα των ζυμών είναι συνήθως σφαιρικού, ωοειδούς ή ελλειψοειδούς σχήματος, με μέγεθος μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των βακτηρίων, γεγονός το οποίο μαζί με την παρουσία εσωτερικών δομών σε αυτά καθιστά δυνατή τη διάκρισή τους στο μικροσκόπιο.[45, 47] Τα περισσότερα είναι μονοπύρηνα και απλοειδή σε όλες τις φάσεις του κύκλου ζωής τους, ωστόσο υπάρχουν και ζύμες οι οποίες απαντώνται και στην απλοειδή και στη διπλοειδή φάση.[48]

Ως προς την αναπαραγωγή τους, οι μύκητες αναπαράγονται εγγενώς και αγενώς. Η αγενής αναπαραγωγή τους στοχεύει στην αύξηση του πληθυσμού ενός είδους και άρα κατέχει σημαντική θέση στη διασπορά των μικροοργανισμών αυτών, ενώ η εγγενής στην αύξηση της γενετικής ποικιλότητας και την εμφάνιση νέων χαρακτήρων.[51] Έτσι η αγενής αναπαραγωγή μπορεί να λαμβάνει χώρα πολλές φορές κατά τη διάρκεια μιας περιόδου, ενώ η εγγενής αναπαραγωγή μπορεί να πραγματοποιείται μόνο μία φορά.[48]

Οι συνηθέστεροι μηχανισμοί αγενούς αναπαραγωγής είναι: ο θρυματισμός του θαλλού, η διχοτόμηση σωματικών κυττάρων του μύκητα σε θυγατρικά, η εκβλάστηση των κυττάρων, ώστε κάθε εκβλάστημα να μπορεί να οδηγήσει σε έναν νέο μύκητα και τέλος η παραγωγή μιτωτικών σπορίων, καθένα από τα οποία βλαστάνει δίνοντας ένα νέο μυκήλιο. Μεταξύ αυτών, η παραγωγή σπορίων είναι η πιο κοινή μέθοδος.[48]

Από την άλλη πλευρά, η εγγενής αναπαραγωγή, σε γενικές γραμμές, προϋποθέτει την ένωση δύο συμβατών πυρήνων αντίθετου «συζευκτικού τύπου» και περιλαμβάνει τα εξής τρία στάδια: την πλασμογαμία, την καρυογαμία και τέλος, τη μειωτική διαίρεση του προκύπτοντος διπλοειδούς πυρήνα.[48, 49] Η καρυογαμία συνήθως ακολουθεί άμεσα τη πλασμογαμία.[49] Η κατάσταση κατά την οποία στο ίδιο κύτταρο συνυπάρχουν δύο πυρήνες καλείται δικαρυωτική φάση και το μυκήλιο δικαρυωτικό ή δικάρυο.[51] Τέλος, και η εγγενής αναπαραγωγή περιλαμβάνει το σχηματισμό σπορίων, τα οποία διακρίνονται σε ωοσπόρια, ζυγοσπόρια, ασκοσπόρια και βασιδιοσπόρια.[48]

Τα όργανα εγγενούς αναπαραγωγής καλλούνται γαμετάγγεια και διακρίνονται σε ισογαμετάγγεια ή ετερογαμετάγγεια. Τα ετερογαμετάγγεια διακρίνονται σε ωογόνια ή θηλυκά όργανα και ανθηρίδια ή αρσενικά.[48]

ΙΙ.2 Ζυγομύκητες

Οι Ζυγομύκητες είναι μία μεγάλη ομάδα σαπροφυτικών ή υποχρεωτικά ή δυνητικά παθογόνων μυκήτων. Ορισμένα είδη της ωστόσο αναπτύσσουν και συμβιωτικές σχέσεις. Ως προς τη δομή τους, είναι μυκηλιακοί μύκητες και η πλειοψηφία τους χαρακτηρίζεται από κοινοκύτταρο μυκήλιο. Στους περισσότερους απαντάται επίσης κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο αποτελείται από χιτίνη, χιτοζάνη και πολυγλυκουρονικό οξύ, αν και σε ορισμένα είδη το κυτταρικό τοίχωμα εκλείπει.[48]

Η αγενής αναπαραγωγή τους πραγματοποιείται με τη βοήθεια σποριαγγειοσπορίων, τα οποία σχηματίζονται εντός σποριαγγείων.[51] Τα σποριάγγεια απαντώνται στα άκρα εξειδικευμένων υφών, των σποριαγγειοφόρων.[48] Σε κάθε σποριάγγειο μπορεί να σχηματίζονται από ένα μέχρι και χιλιάδες σπορειαγγειοσπόρια. Σε ό,τι αφορά τη δομή τους, τα σποριαγγειοσπόρια εμφανίζουν αδύνατα, λεία τοιχώματα, το σχήμα τους μπορεί να είναι είτε κυκλικό είτε ελλειψοειδές, ενώ ως προς το χρώμα τους μπορεί να είναι είτε άχρωμα είτε κίτρινα, λόγω της παρουσίας καροτενοειδών στο κυτταρόπλασμά τους. Είναι μονοκύτταρα, μονοπυρηνικά ή πολυπυρηνικά.[49] Τέλος, ορισμένοι Ζυγομύκητες αναπαράγονται αγενώς και με το σχηματισμό αρθροσπορίων και χλαμυδοσπορίων εκτός από τα σποριαγγειοσπόρια. Σε γενικές γραμμές, η διάδοση των σπορίων αγενούς αναπαραγωγής των μυκήτων αυτών γίνεται είτε μέσω ρευμάτων αέρα, είτε μέσω απευθείας προσκόλλησης των σπορίων σε έμψυχα ή άψυχα όντα.[48]

Η εγγενής αναπαραγωγή των Ζυγομυκήτων πραγματοποιείται με το σχηματισμό ζυγοσπορίων.[51] Συγκεκριμένα, ξεκινά με την ένωση δύο πολυπύρηνων ισογαμεταγγείων, τα οποία μπορεί να προέρχονται από τυπικές σωματικές μυκηλιακές υφές ή όπως συνήθως συμβαίνει από εξειδικευμένες υφές, οι οποίες αναπτύσσονται στα άκρα των υπαρχόντων υφών και οι οποίες καλούνται ζυγοφόρες.[48, 51] Τα ζυγοσπόρια βλαστάνουν με αργό ρυθμό. Ως προς τη δομή τους, τα ζυγοσπόρια είναι συνήθως μεγάλα σπόρια, με παχιά τοιχώματα, έχουν

άφθονα αποθέματα λιπιδίων και είναι ακατάλληλα για διασπορά σε μεγάλες αποστάσεις.[49]

Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο, ότι η παρουσία ενός ζυγοσπορίου δεν συνεπάγεται απαραίτητα ότι έχει πραγματοποιηθεί εγγενής αναπαραγωγή. Για παράδειγμα, τα αζυγοσπόρια τα οποία σχηματίζονται από μύκητες της τάξης Mucorales εξωτερικά ομοιάζουν με τα ζυγοσπόρια αλλά σχηματίζονται χωρίς να έχει προηγηθεί πλασμογαμία και καρυογαμία.[48]

II.2.1 Rhizopus spp.

Το γένος *Rhizopus* ανήκει στην κλάση Zygomycota, στην τάξη Mucorales και στην οικογένεια Absidiaceae.[48] Χαρακτηρίζεται από άφθονο, λευκό, βαμβακώδες μυκήλιο με μαύρα, αραιά σποριάγγεια, το οποίο αναπτύσσεται με γρήγορο ρυθμό. Είναι γένος ψυχρόφιλο και αναπτύσεται σε pH 4,5-6,0 και σε ελάχιστη ενεργότητα ύδατος ίση με 0,93.[47]

Το γένος αυτό προσελκύει το ενδιαφέρον λόγω των πολύπλευρων χρήσεών του στη βιομηχανία των τροφίμων. Ορισμένα είδη του με κυριότερο το είδος *Rh.oligosporus* χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τροφίμων ιδίως στις ανατολικές χώρες εδώ και χιλιάδες χρόνια.[52] Επιπλέον, είδη αυτού του γένους έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή λιπάσης, πηκτινολυτικών ενζύμων, γλυκοαμυλάσης, α-αμυλάσης, καθώς και κορτιζόνης, αλκοόλης, και διαφόρων οργανικών οξέων, μεταξύ των οποίων το γαλακτικό, το κιτρικό, το ηλεκτρικό, το οξαλικό οξύ.[47, 51] Ωστόσο, πολλά είδη του γένους *Rhizopus* είναι αλλοιογόνα των τροφίμων και προσβάλλουν συνηθέστερα τα λαχανικά και τα φρούτα στο μετασυλλεκτικό στάδιο, προκαλώντας τη μαλακή σήψη τους. Ενδεικτικά, το γένος αυτό προσβάλλει τα σταφύλια, ορισμένες ποικιλίες μούρων, τις φράουλες, λιγότερο συχνά τα εσπεριδοειδή και επίσης τις γλυκοπατάτες, τις μελιτζάνες, τα φασόλια, τον αρακά, τα καρότα και τις ντομάτες.[52-55] Επιπλέον, το γένος *Rhizopus* μπορεί να προσβάλει τα αυγά, ορισμένα κρεατικά και γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς και ορισμένα δημητριακά και ξηρούς καρπούς.[47, 52] Το είδος *Rh.nigricans* είναι υπεύθυνο για τη μαύρη μούχλα του ψωμιού και τη μαύρη κηλίδωση του βοδινού και αρνίσιου κρέατος.[47, 52] Επίσης, το γένος αυτό δύναται να προσβάλλει τους ηλιανθούς προκαλώντας σημαντικές απώλειες στους σπόρους και κατά συνέπεια

στην παραγωγή ηλιελαίου.[55] Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι, ορισμένα είδη του συγκεκριμένου γένους συνιστούν ευκαιριακά παθογόνα του ανθρώπινου οργανισμού και φαίνεται μάλιστα να διαθέτουν την ικανότητα διείσδυσης στα αγγεία, γεγογός το οποίο εξασφαλίζει την ταχύτερη διάδοσή τους στον ανθρώπινο οργανισμό.[56] Συγκεκριμένα, το είδος *Rh.microspores*, το οποίο απαντάται κυρίως σε τροπικά τρόφιμα καθώς και το είδος *Rh.oryzae* συνιστούν βασικά αίτια της εκδήλωσης ζυγομυκώσεων, προκαλώντας γαστρεντερικές και δερματικές καθώς και ρινοεγκεφαλικές λοιμώξεις αντίστοιχα.[52]

ΙΙ.3 Ασκομύκητες

Το όνομά τους προέρχεται από την ελληνική λέξη «ασκός» και πρόκειται για την πολυπληθέστερη ίσως ομάδα μυκήτων.[49] Περιλαμβάνει τόσο σαπροφυτικούς μικροοργανισμούς όσο και παράσιτα των φυτών και των ζώων, αλλά και του ανθρώπου.[48, 49, 51] Από δομικής πλευράς, οι Ασκομύκητες μπορούν να απαντώνται είτε μόνο σαν ζύμες είτε μόνο σαν μυκηλιακοί μύκητες, ενώ ορισμένοι εμφανίζουν και το φαινόμενο του διμορφισμού.[49] Όσον αφορά τους μυκηλιακούς Ασκομύκητες, το μυκήλιο είναι καλά διαμερισματοποιημένο με εγκάρσια διαφράγματα τα οποία φέρουν οπές.[48] Το κυτταρικό τοίχωμα των Ασκομυκήτων αποτελείται κυρίως από χιτίνη, αν και σε ορισμένους εξ αυτών φαίνεται να απαντάται και κυτταρίνη.[48, 51] Στις ζύμες, τέλος, απαντώνται μικρές ποσότητες χιτίνης στο κυτταρικό τοίχωμα και μεγάλες ποσότητες από μαννάνες και β-1,3-γλυκάνες. [48]

Οι Ασκομύκητες αναπαράγονται αγενώς με το σχηματισμό είτε χλαμυδιοσπορίων είτε κονιδίων, ανάλογα με το είδος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες.[48] Επίσης, μπορούν να αναπαράγονται και με θραύσματα του μυκηλίου, ενώ οι ζύμες και οι δίμορφοι Ασκομύκητες αναπαράγονται με διχοτόμηση ή με εκβλάστηση.[48] Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ορισμένα είδη Ασκομυκήτων σε αντίθεση με τους Ζυγομύκητες, εμφανίζουν μόνο αγενή αναπαραγωγή.[49]

Τα κονίδια αποτελούν το κύριο είδος σπορίων αγενούς αναπαραγωγής αυτής της κλάσης μυκήτων. Μπορούν να παράγονται είτε απευθείας από τις μυκηλιακές υφές, είτε από εξειδικευμένα κονιδιογόνα κύτταρα, τα οποία απαντώνται στις κονιδιοφόρους υφές.[48]

Σε κάποιους Ασκομύκητες υπάρχουν δομές, οι οποίες συχνά φέρουν το όνομα «σπόρια» και οι οποίες σχηματίζονται πιθανά προκειμένου να βοηθήσουν το μύκητα να επιβιώσει κάτω από δυσμενείς συνθήκες για την ανάπτυξή του. Αυτές οι δομές δεν έχουν σαν πρωταρχικό στόχο τον πολλαπλασιασμό και τη διασπορά των μυκήτων, αν και τελικά κάτι τέτοιο προκύπτει δευτερευόντως. Πρόκειται για τα χλαμυδοσπόρια και τα σκληρώτια.[48]

Κατά την εγγενή αναπαραγωγή των Ασκομυκήτων, δύο πυρήνες αντίθετου συζευκτικού τύπου πλησιάζουν σε ένα κύτταρο με μία από τις ακόλουθες μεθόδους: ένωση δύο ισογαμεταγγείων, ένωση δύο ετερογαμεταγγείων, σπερματίωση ή τέλος σωματογαμία. Ακολουθεί καρυογαμία και σχεδόν αμέσως μετά μείωση και δημιουργία τεσσάρων απλοειδών πυρήνων. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα μία ακόμη μιτωτική διαίρεση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία οκτώ πυρήνων, όσα και τα ασκοσπόρια που θα σχηματιστούν. Γύρω από τους οκτώ πυρήνες που απαντώνται στον ασκό σχηματίζεται μία κύστη σε μορφή σάκκου, η ασκική κύστη με μία διαδικασία, η οποία δεν είναι πλήρως γνωστή. Στη συνέχεια, η ασκική κύστη αναδιπλώνεται ώστε οι εγκολπώσεις που δημιουργούνται να περιβάλλουν τους οκτώ πυρήνες. Δημιουργούνται έτσι οκτώ μονοπύρηνα, απλοειδή κύτταρα τα οποία έχουν μόνο κυτταρική μεμβράνη. Ακολουθεί ο σχηματισμός κυτταρικού τοιχώματος. Και έτσι ολοκληρώνεται ο σχηματισμός των ασκοσπορίων.[51]

II.3.1 *Aspergillus* spp.

Η ταξινόμηση των Ασκομυκήτων εμφανίζει αρκετές δυσκολίες, ακριβώς λόγω του μεγάλου αριθμού μυκήτων που περιλαμβάνονται σε αυτή την κλάση.[51] Ωστόσο, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι το γένος *Aspergillus* ανήκει στην κλάση Ascomycota, στην τάξη Eyrotiales και στην οικογένεια Trichomaceae.[48] Στο γένος αυτό ανήκουν μυκηλιακοί μύκητες, οι οποίοι αναπαράγονται αγενώς με το σχηματισμό κονιδίων σε φιαλιδόμορφες κονιδιοφόρες υφές, οι οποίες παράγονται απευθείας από το μυκήλιο σαν διακλαδώσεις ειδικών κυττάρων, των βασικών κυττάρων.[48] Το συγκεκριμένο γένος έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται ή έστω να επιβιώνει ακόμη και σε περιβάλλοντα υψηλής θερμοκρασίας και μειωμένης συγκέντρωσης ύδατος.[52]

Σε γενικές γραμμές, το γένος αυτό αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα γένη μυκήτων στη γη. Ορισμένα είδη έχουν χρησιμοποιηθεί ωφελιμιστικά, συχνά μαζί με είδη του γένους *Penicillium* καθώς και βακτήρια για την παραγωγή τροφίμων ιδιαίτερα στον ανατολικό κόσμο, καθώς και για τη σύνθεση ενζύμων, οργανικών οξέων και αμινοξέων.[48] Ωστόσο, στο γένος ανήκουν και πολλά είδη, δυνητικά αλλοιογόνα των τροφίμων τα οποία προσβάλλουν μία ποικιλία αγαθών.[57] Περιληπτικά, αναφέρεται ότι το γένος αυτό προσβάλλει συχνά τα τυριά, το κρέας, τα δημητριακά, τα κρεμμύδια, τα σκόρδα και τα φρέσκα φρούτα.[47, 48] Με τη σειρά της, η κατανάλωση μολυσμένων από αυτό το γένος τροφίμων έχει σοβαρές συνέπειες για την υγεία του ανθρώπου και περιλαμβάνει την εκδήλωση ενός μεγάλου φάσματος συμπτωμάτων. Συχνά η κατάσταση αυτή περιγράφεται με τον γενικό όρο «ασπεργιλλίωση» και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι ακόμη και θανατηφόρος.[58, 59] Επιπλέον, το γένος αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ικανότητας ορισμένων ειδών του να παράγουν ποικίλους δευτερογενείς μεταβολίτες, συμπεριλαμβανομένων ουσιών τοξικών για τα ανώτερα σπονδυλωτά. Οι μυκοτοξίνες απαντώνται είτε στο μυκήλιο είτε στα σπόρια του εκάστοτε είδους και η πρόσληψή τους από τα ανώτερα θηλαστικά μπορεί να προκαλέσει μία τοξική αντίδραση, γνωστή σαν μυκοτοξίκωση. Σε γενικές γραμμές, οι μυκοτοξίνες μπορούν να επάγουν την καρκινογένεση, τη μεταλλαξιογένεση, τη νευροτοξικότητα και την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος.[57] Στις μυκοτοξίνες που παράγονται από το συγκεκριμένο είδος ανήκουν οι αφλατοξίνες, η κιτρίνη, οι ωχρατοξίνες, η πατουλίνη, το κυκλοπιαζονικό οξύ.[51]

II.3.1.1 *Aspergillus flavus*

Το είδος αυτό χαρακτηρίζεται από λευκό μυκήλιο με κιτρινοπράσινα και σε σπάνιες περιπτώσεις κίτρινα κονίδια. Τα κονίδιά του ποικίλουν σε μέγεθος και σχήμα, έχουν λεπτό τοίχωμα και η επιφάνειά τους μπορεί να είναι είτε λεία είτε μετρίως τραχιά. Πολλά στελέχη του είδους αυτού είναι ικανά να σχηματίζουν επίσης σκληρώτια. Η θερμοκρασία στην οποία μπορεί να αναπτύσσεται ο *A.flavus* εμφανίζει σημαντικές διακυμάνσεις, με βέλτιστη τιμή, ωστόσο, αυτή των 33° C. Το είδος αυτό αναπτύσσεται επίσης σε ελάχιστη ενεργότητα ύδατος ίση με 0.78 στους 33° C και σε ένα εύρος τιμών pH από 3.4 μέχρι 10, με τη βέλτιστη τιμή κοντά στο 7.5.[52]

Καθότι σαπροφυτικός μύκητας, ο *A.flavus* απαντάται σε ποικίλα οργανικά υποστρώματα. Μπορεί, επίσης, να προσβάλλει μία ποικιλία αγαθών, μεταξύ των οποίων το καλαμπόκι και τα προϊόντα αυτού, οι ξηροί καρποί, τα δημητριακά και τα προϊόντα αυτών, ορισμένα φρούτα και λαχανικά, τα ρεβίθια και τα μπαχαρικά.[52, 59]Είναι παθογόνο του ίδιου του ανθρώπινου οργανισμού και συνιστά μία από τις κυριότερες αιτίες πρόκλησης της ασπεργιλλίωσης, προσβάλλοντας κυρίως τους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, αλλά και τον υγιή πληθυσμό. Στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς η μόλυνση με το συγκεκριμένο είδος μπορεί να προκαλέσει την εκδήλωση πνευμονικής λοίμωξης.[52] Σε γενικές γραμμές, ο A.flavus μπορεί να προσβάλλει ολόκληρο το σώμα, από το δέρμα, τα ιγμόρεια, τους πνεύμονες και τους νεφρούς μέχρι και την καρδιά.[59]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η ικανότητα του συγκεκριμένου είδους να παράγει μία σειρά ουσιών με τοξική δράση. Ορισμένα στελέχη του έχουν την ικανότητα να παράγουν κυκλοπιαζονικό οξύ ενώ άλλα εκκρίνουν τις αφλατοξίνες B1 και B2. Αν και η επίδραση του κυκλοπιαζονικού οξέος στην υγεία του ανθρώπου δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως, φαίνεται να εμπλέκεται σε μηχανισμούς γένεσης νοσηρότητας.[60] Υπάρχουν επίσης αναφορές σύμφωνα με τις οποίες το κυκλοπιαζονικό οξύ έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση ηπατικής νέκρωσης και νέκρωσης του γαστρεντερικού ιστού.[61] Όσον αφορά τις αφλατοξίνες, η χρόνια έκθεση ενός οργανισμού σε αυτές επιδρά αρνητικά στην ηπατική λειτουργία του, οδηγώντας μακροπρόθεσμα στην εκδήλωση ασθενειών όπως η ηπατική ίνωση, η κίρρωση και το λιπώδες ήπαρ. Οι τοξίνες αυτές, επιπλέον, έχουν την ικανότητα να συνδέονται σε πρωτεΐνες, στο DNA και το RNA, μόρια τα οποία εμπλέκονται σε φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες και με τον τρόπο αυτό επάγουν την καρκινογένεση και τη μεταλλαξιογένεση.[60] Εκτός όμως από τη χρόνια έκθεση στις αφλατοξίνες, ακόμη και η απότομη έκθεση σε υψηλές δόσεις αυτών μπορεί να οδηγήσει άμεσα σε οξεία δηλητηρίαση, ηπατική βλάβη και τελικά ακόμη και στο θάνατο.[52, 60] Η αφλατοξίνη B1, θεωρείται η πιο ισχυρή ηπατοκαρκινογόνος φυσική ένωση, ενώ συνιστά και δυνητικό ανοσοκατασταλτικό παράγοντα.[59]

II.3.1.2 *Aspergillus niger*

Το είδος αυτό χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη λευκού μυκηλίου με καφέ ή μαύρα, σφαρικά κονίδια, των οποίων η επιφάνεια είναι είτε τραχιά είτε εμφανίζει γραμμώσεις. Ο *A.niger* αναπτύσσεται σε ελάχιστη θερμοκρασία μεταξύ 6-8°C, μέγιστη μεταξύ 45-47°C και βέλτιστη 35-37°C. Πρόκειται για ξηρόφιλο μικροοργανισμό και αξίζει να σημειωθεί ότι εχει καταγραφεί βλάστηση σε ενεργότητα ύδατος ίση με 0.77 στους 35°C. Τέλος, έχει σημειωθεί ανάπτυξη του συγκεκριμένου είδους ακόμη και σε pH<2 σε συνθήκες υψηλής ενεργότητας ύδατος.[52]

Ο *A.niger* συνιστά έναν από τους σημαντικότερους μικροοργανισμούς στη βιομηχανία των τροφίμων, καθότι έχει χρησιμοποιηθεί πολύ συχνά για την παραγωγή διαφόρων ενζύμων, μεταξύ των οποίων πηκτινασών, πρωτεασών και αμυλασών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, η ικανότητά του να συνθέτει κιτρικό οξύ, το οποίο συνιστά ένα βασικό μέσο οξύνισης στη βιομηχανία των τροφίμων και των ποτών.[47] Σαν παθογόνος μικροοργανισμός, ο *A.niger* ευθύνεται σε γενικές γραμμές για τη φθορά, τόσο στο στάδιο της παραγωγής όσο και της αποθήκευσης, των οπωρολαχανικών όπως ενδεικτικά των μήλων, των αχλαδιών, των σταφυλιών, ορισμένων εσπεριδοειδών, αλλά και της ντομάτας, των σκόρδων, των κρεμμυδιών. Απαντάται επίσης στο κρέας, το τυρί και σε ορισμένους ξηρούς καρπούς. Πολύ συχνά το είδος αυτό έχει απομονωθεί και από αποξηραμένα στον ήλιο προϊόντα όπως οι σταφίδες, από ξηρά, παστά και καπνιστά ψάρια, καρπούς κακαόδεντρου και μπαχαρικά.[52, 53] Ωστόσο, το συγκεκριμένο είδος δεν θεωρείται παθογόνο του ανθρώπινου οργανισμού και υπάρχουν λίγες μόνο περιπτώσεις στις οποίες δύναται να αποικίσει τον οργανισμό του ανθρώπου, σαν ευκαιριακό παθογόνο και οι οποίες αφορούν κυρίως ασθενείς με ιστορικό σοβαρής ασθένειας ή σε ανοσοκατασταλτική θεραπεία.[62] Παρ' όλα αυτά, πρέπει να αναφερθεί ότι κάποια στελέχη του διαθέτουν την ικανότητα σύνθεσης ωχρατοξίνης Α. Η ωχρατοξίνη Α απαντάται συχνά στα σιτηρά, το χοιρινό, τα πουλερικά, τον καφέ, τη μπύρα, το κρασί και μεταξύ άλλων συγκεντρώνει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς φαίνεται να έχει νεφροτοξικές, ανοσοτοξικές, τερατογόνες και πιθανά καρκινογόνες ιδιότητες.[63]

II.3.1.3 *Aspergillus candidus*

Το είδος αυτό χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη λευκού μυκηλίου με λευκά ή υπόλευκα, σφαιρικά συνήθως κονίδια, των οποίων η επιφάνεια είναι λεία. Ο *A.candidus* μπορεί να αναπτύσσεται σε ένα πολύ μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, με ελάχιστη τιμή αυτή των 3-4 ^{o} C, μέγιστη αυτή των 50-55 ^{o} C και βέλτιστη από 20-24 μέχρι 45-50 ^{o} C. Αναπτύσσεται σε ελάχιστη ενεργότητα ύδατος ίση με 0.75 αλλά η βέλτιστη τιμή για την ανάπτυξή του είναι μεγαλύτερη από 0.98. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι αυτό το είδος είναι πιο ανθεκτικό σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης O_2 συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα είδη του γένους *Aspergillus*.[52]

Καθότι μέτρια ξηρόφιλος μικροοργανισμός, ο *A.candidus* απαντάται πολύ συχνά στα αποθηκευμένα δημητριακά και τα προϊόντα αυτών, όπως το αλεύρι ή παρασκευάσματα από αυτό, όπως ορισμένοι τύποι γλυκών.[60] Απαντάται επίσης στους ξηρούς καρπούς αλλά και στο σαλάμι και σε άλλα κρεατικά προϊόντα. Μπορεί να αποτελέσει παθογόνο του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς συνιστά ένα από τα είδη που μπορούν να προκαλέσουν ασπεργιλλίωση. Τέλος, ο *A.candidus*, μπορεί να παράγει μία πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών, εκ των οποίων όμως μόνο το κογικό οξύ φαίνεται να εμφανίζει οριακή τοξικότητα.[52]

II.3.1.4 *Aspergillus carbonarius*

Το είδος αυτό εμφανίζει λευκό μυκήλιο με μαύρα, σφαιρικά ή σχεδόν σφαιρικά κονίδια, η επιφάνεια των οποίων είναι είτε τραχιά είτε αγκαθωτή. Αναπτύσσεται σε βέλτιστη θερμοκρασία κοντά στους 30°C, μέγιστη κοντά στους 40 και ελάχιστη κοντά στους 10°C .Η ελάχιστη ενεργότητα ύδατος στην οποία έχει καταγραφεί ανάπτυξη του συγκεκριμένου είδους είναι κοντά στην τιμή 0.85, ενώ η βέλτιστη ενεργότητα ύδατος για την ανάπτυξή του είναι μεταξύ 0.96-0.98.Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητα του συγκεκριμένου είδους να επιβιώνει σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης CO_2.[52]

Ο *A.carbonarius* απαντάται συνηθέστερα στα σταφύλια και λιγότερο συχνά στα σύκα, τα φυστίκια, το καλαμπόκι και την πάπρικα. Συνιστά την κύρια πηγή προέλευσης της ωχρατοξίνης Α στα σταφύλια και τα προϊόντα που προέρχονται από αυτά, όπως ενδεικτικά οι σταφίδες.[52] Σε μελέτες, μάλιστα, που έχουν πραγματοποιηθεί σε αυτό το πεδίο, ένας πολύ μεγάλος αριθμός δειγμάτων χυμών

σταφυλιών βρέθηκε να περιέχει τη μυκοτοξίνη αυτή, γεγονός το οποίο προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία, δεδομένου ότι οι χυμοί θα μπορούσαν να αποτελέσουν την κύρια πηγή πρόσληψης αυτής της μυκοτοξίνης από τα παιδιά. [64] Μάλιστα, ενώ τα περισσότερα μυκητοκτόνα φάρμακα σε γενικές γραμμές μπορούν να μειώσουν την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μύκητα και την παραγωγή αυτής της ωχρατοξίνης στα σταφύλια, ορισμένα εξ αυτών έχει φανεί να ενισχύουν τη σύνθεση της. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι συνήθως, κατά τις διεργασίες παρασκευής του κρασιού η ωχρατοξίνη αυτή απομακρύνεται. Τέλος, το είδος αυτό συνιστά μία σημαντική πηγή προέλευσης της ωχρατοξίνης Α και σε ορισμένες ποικιλίες καφέ. [52]

II.3.1.5 *Aspergillus parasiticus*

Όπως και ο *A.flavus*, ο *A.parasiticus* χαρακτηρίζεται από την παρουσία λευκού μυκηλίου με κιτρινοπράσινα και σε σπάνιες περιπτώσεις κίτρινα κονίδια, τα οποία διαφέρουν από τα αντίστοιχα του *A.flavus* καθώς είναι σφαιρικά με παχιά και τραχιά τοιχώματα. Ορισμένα στελέχη του αναπτύσσουν και σκληρώτια. Ο *A.parasiticus* αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από 12-42 ^{o}C, με βέλτιστη τιμή ανάπτυξης αυτή των 32° C, σε ένα εύρος pH από 2.4 μέχρι 10.5 και σε ελάχιστη ενεργότητα ύδατος παρόμοια με αυτή του *A.flavus*.[52]

Ο *A.parasiticus* μπορεί να προσβάλει διάφορα είδη καρπών με κέλυφος, όπως οι ξηροί καρποί μεταξύ των οποίων τα φουντούκια, τα καρύδια και τα φιστίκια. Μπορεί επίσης να βρεθεί στο καλαμπόκι, λιγότερο συχνά όμως από τον *A.flavus* και επίσης, λιγότερο συχνά απαντάται και στο ρύζι και τα προϊόντα αυτού, στο επεξεργασμένο κρέας καθώς και στο μαύρο πιπέρι. Όπως και ο *A.flavus*, έτσι και ο *A.parasiticus* έχει την ικανότητα να παράγει αφλατοξίνες, επικίνδυνες για την υγεία του ανθρώπου, όπως περιγράφηκε παραπάνω.[52] Στο είδος αυτό μάλιστα απαντώνται περισσότερα στελέχη ικανά να παράγουν αφλατοξίνες, συγκριτικά με τα στελέχη του *A.flavus*.[61] Συγκεκριμένα παράγει τις αφλατοξίνες G και B αλλά και κογικό οξύ, ενώ σε αντίθεση με τον *A.flavus* δεν παράγει κυκλοπιαζονικό οξύ.[52]

II.3.2 *Penicillium* spp.

Το γένος *Penicillium* ανήκει επίσης στην κλάση Ascomycota, στην τάξη Eurotiales και στην οικογένεια Trichocomaceae.[48] Στο γένος αυτό ανήκουν μυκηλιακοί μύκητες, στους οποίους η ανάπτυξη των κονιδίων γίνεται με παρόμοιο τρόπο με την ανάπτυξη στο γένος *Aspergillus* αλλά διαφέρει η δομή των κονιδιοφόρων υφών, οι οποίες είναι δακτυλιοφόρες.[48]

Πολλά είδη του γένους *Penicillium* έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή διαφόρων τροφίμων, μεταξύ των οποίων και ορισμένοι τύποι τυριών. Επιπλέον, σε βιομηχανική κλίμακα, το γένος χρησιμοποείται συχνά για την παραγωγή οργανικών οξέων, όπως το φουμαρικό, το οξαλικό, το γαλλικό οξύ αλλά και πολλών ενζύμων.[48] Ωστόσο, ορισμένα είδη του είναι σαπροφυτικά και κάποια έχουν επίσης την ικανότητα να αλλοιώνουν ορισμένα αγαθά. Πιο συγκεκριμένα, το γένος αυτό προσβάλλει πολύ συχνά τα σιτηρά αλλά και τα φρούτα.[52] Προσβάλλει ακόμη τα βρεγμένα λαχανικά αλλά και ορισμένα ζωικά προϊόντα, μεταξύ των οποίων το σαλάμι, το ζαμπόν, τα λουκάνικα.[47, 65] Σε γενικές γραμμές, έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε χαμηλή ενεργότητα ύδατος και έχει επίσης λιγοστές διατροφικές απαιτήσεις με αποτέλεσμα να απαντάται σχεδόν παντού, ακόμη και εντός των ψυκτικών θαλάμων.[52]

Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητα ορισμένων ειδών του γένους αυτού να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες, μεταξύ των οποίων αντιβιοτικά όπως η γνωστή πεννικιλίνη αλλά και τοξικές ουσίες.[48] Μάλιστα, όσον αφορά τις μυκοτοξίνες, το γένος αυτό παράγει ίσως το μεγαλύτερο εύρος διαφορετικών μυκοτοξινών. Οι μυκοτοξίνες αυτές διακρίνονται μάλιστα σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το αν επιδρούν στη λειτουργία του ήπατος και των νεφρών ή αν πρόκειται για νευροτοξίνες. Η ωχρατοξίνη Α, η πατουλίνη, η κιτρινίνη, το κυκλοπιαζονικό οξύ είναι από τις πιο γνωστές μυκοτοξίνες που παράγονται από είδη αυτού του γένους.[47, 61] Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το *P.verrucosum* θεωρείται η κυριότερη πηγή παραγωγής ωχρατοξίνης Α στα δημητριακά, όπως το σιτάρι, το κριθάρι, η βρώμη και η σίκαλη, ενώ η πατουλίνη παράγεται κυρίως από το *P. expansum*, το οποίο προκαλεί τη σήψη των μήλων.[65]

II.3.2.1 *Penicillium italicum*

Το είδος αυτό χαρακτηρίζεται από λευκό μυκήλιο με άφθονα, γκριζοπράσινα κονίδια, τα οποία εμφανίζουν αρχικά κυλινδρικό σχήμα και καθώς ωριμάζουν γίνονται σφαιρικά, ελλειψοειδή ως ελαφρώς κυλινδρικά. Το *P.italicum* αναπτύσσεται σε ένα πολύ μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, από -3 ως 32-34 ^{o}C, με τη βέλτιστη ανάπτυξη να σημειώνεται στους 22 με 24° C. Τέλος, το είδος αυτό αναπτύσσεται σε ένα επίσης μεγάλο εύρος τιμών pH από 1.6 μέχρι 9.8.[52]

Μαζί με το *P.digitatum*, το *P.italicum* προσβάλλει πολύ συχνά τα λεμόνια και τα υπόλοιπα εσπεριδοειδή όχι μόνο κατά τη συγκομιδή τους αλλά και κατά τους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς.[52, 66] Οδηγεί στην ανάπτυξη ενός μπλε-γκρι μυκηλίου στην επιφάνειά τους, το οποίο εξαπλώνεται με ταχύτατο ρυθμό προσβάλλοντας και τα υγιή φρούτα που αποθηκεύονται στους ίδιους χώρους με τα μολυσμένα.[66, 67]Τα κονίδιά του μπορούν να διασπείρονται ταχύτατα μέσω του αέρα.[66] Επιπλέον, το είδος αυτό φαίνεται να προκαλεί αλλοιώσεις και σε άλλα τρόφιμα, μεταξύ των οποίων οι χυμοί φρούτων, το αβοκάντο και οι ντομάτες, αλλά πολύ σπανιότερα.[52] Τέλος, αν και σε ορισμένες βιολογικές δοκιμασίες έχει παρατηρηθεί τοξικότητα, το *P.italicum* δεν φαίνεται να είναι τοξικό για τα ανώτερα θηλαστικά. Ωστόσο, επειδή παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα μυκητοκτόνα φάρμακα, εμφανίζεται συχνά σε διάφορα εσπεριδοειδή υποβαθμίζοντας την ποιότητα και την εμφάνισή τους και προκαλώντας σημαντικές οικονομικές απώλειες.[52, 67]

II.3.3 *Candida* spp.

Το γένος *Candida* ανήκει στην κλάση Ascomycota, στην τάξη Saccharomycetales και στην οικογένεια Saccharomycetaceae. Στο γένος αυτό ανήκουν κυρίως ζυμομύκητες, οι οποίοι αναπαράγονται μόνο αγενώς και κυρίως με εκβλάστηση.[48]

Το γένος *Candida* συνιστά ένα από τα πιο κοινά γένη μυκήτων που εμπλέκονται στις ανθρώπινες μυκητιάσεις.[68] Απαριθμεί περισσότερα από 150 είδη αλλά μόνο ορισμένα από αυτά μπορούν να προσβάλλουν τον άνθρωπο, καθώς το 65% δεν μπορεί να επιβιώσει στη θερμοκρασία των 37 ^{o}C που απαντάται στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα είδη που προσβάλλουν τον άνθρωπο είναι ευκαιριακά παθογόνα και μόνο κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορούν να προκαλέσουν

λοιμώξεις, οδηγώντας ορισμένες φορές ακόμη και στο θάνατο.[48] Συνιστούν, μάλιστα, μία από τις τέσσερις συνηθέστερες αιτίες λοιμώξεων στο ενδονοσοκομειακό περιβάλλον.[68] Στο παρελθόν, οι συνηθέστερες λοιμώξεις από είδη του γένους αυτού εμφανίζονταν σε ασθενείς ουδετεροπενικούς, μεταμοσχευμένους ή υπό αγωγή με κορτικοστεροειδή ή κυτταροτοξικούς παράγοντες, ωστόσο τα τελευταία χρόνια οι λοιμώξεις αυτές απαντώνται πιο συχνά μεταξύ των ασθενών στις εντατικές μονάδες θεραπείας και εντονότερα σε ασθενείς υπό παρεντερική αγωγή με κεντρικό φλεβικό καθετήρα, χειρουργημένους, ασθενείς που λαμβάνουν αντιβιοτικά ευρέος φάσματος ή που χρειάζονται αιμοκάθαρση και ασθενείς που σημειώνουν υψηλά σκορ στην κλίμακα APACHE.[56] Οι κλινικές εκδηλώσεις των λοιμώξεων από αυτό το γένος ποικίλουν, από οισοφαγικές και στοματοφαρυγγικές μολύνσεις μέχρι και ενδοκαρδίτιδα, ενδοφθαλμίτιδα, οστεομυελίτιδα και λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος.[68] Στην παθογένεια της *Candida* σημαντικό ρόλο κατέχει η ικανότητα των ειδών της να σχηματίζουν ανθεκτικότητα στα αντιμυκητιασικά φάρμακα μέσα από τη δημιουργία βιοφίλμ (βιοϋμενίου). Τα βιοφίλμ είναι βιολογικές κοινότητες, εξαιρετικά οργανωμένες, αποτελούμενες από ένα ή περισσότερα μικροβιακά είδη, οι οποίες προσκολλώνται σε μία επιφάνεια.[69]

II.3.3.1 *Candida albicans*

Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός απαντάται φυσιολογικά σχεδόν σε όλους τους ανθρώπους, αλλά όπως συμβαίνει και με τα υπόλοιπα είδη του γένους, κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις μπορεί να αποτελέσει μία σοβαρή απειλή για τη υγεία του ατόμου.[70] Συνηθέστερα, αποικίζει το δέρμα, τη στοματοφαρυγγική κοιλότητα, τη γαστρεντερική οδό και το ουροποιητικό και γεννητικό σύστημα.[68]

Το κυριότερο χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου είδους, το οποίο εξασφαλίζει μάλιστα και την παθογένεια του είναι η ικανότητά του να μεταβαίνει από τη μορφή του ζυμομύκητα στη μυκηλιακή μορφή και να εκκρίνει μόρια τα οποία προάγουν την προσκόλλησή του σε διάφορες επιφάνειες.[70] Μελέτες έχουν αποδείξει ότι το συγκεκριμένο είδος αναπτύσσει ανθεκτικότητα απέναντι σε ορισμένα αντιβιοτικά, γεγονός το οποίο καθιστά δυσκολότερη την καταπολέμησή του.[70] Ωστόσο, ενώ το είδος αυτό φαίνεται να αντιπροσωπεύει πάνω από το 80% των απομονώσεων από όλες τις μορφές της ανθρώπινης καντιντίασης, τις τελευταίες δύο

δεκαετίες έχει αυξηθεί ο αριθμός και άλλων ειδών του γένους που εμπλέκονται στην εκδήλωση της νόσου.[71]

II.3.3.2 *Candida glabrata*

Για πολλά χρόνια το είδος αυτό θεωρούταν μη παθογόνος μικροοργανισμός, μέλος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας των υγιών ατόμων. [68] Πράγματι, φυσιολογικά, απαντάται στον οισοφάγο, το έντερο και τον βλεννογόνο του κόλπου.[69] Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, η αυξημένη εφαρμογή ανοσοκατασταλτικών θεραπειών μαζί με τη λήψη ευρέως φάσματος αντιβιοτικών, οδήγησε στην αύξηση της συχνότητας των λοιμώξεων από το συγκεκριμένο είδος.[68] Μάλιστα, το είδος αυτό προσβάλλει συνηθέστερα τους ηλικιωμένους, τους ασθενείς με νεοπλασματική νόσο, τους ουδετεροπενικούς και τους ασθενείς με κακοήθειες συμπαγών οργάνων.[68]

II.3.3.3 *Candida krusei*

Το είδος αυτό αναπτύσσεται σε ελάχιστη θερμοκρασία ίση με 8 ^{o}C και σε μέγιστη ίση με 47 ^{o}C. Πρόκειται για μικροοργανισμό ανθεκτικό στη θέρμανση, ενώ δύο εξαιρετικά ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά του είναι η ικανότητά του να αναπτύσσεται ακόμη και σε εξαιρετικά χαμηλό pH καθώς και παρουσία συντηρητικών ουσιών.[52] Αν και υπάρχουν πολλαπλές δυνατότητες βιοτεχνολογικής αξιοποίησης της *C.krusei*, υπάρχει περιορισμένη βιβλιογραφία γύρω από αυτές. Το είδος αυτό χρησιμοποιείται στην παραγωγή ενζύμων και ορισμένα στελέχη του απαντώνται φυσιολογικά σε μία ποικιλία παραδοσιακών, ζυμωμένων προϊόντων.[72] Ωστόσο, έχουν καταγραφεί αλλοιώσεις σύκων, σαλτσών ντομάτας και σπόρων κακαόδεντρου από το συγκεκριμένο ζυμομύκητα.[52] Είναι ευκαιριακά παθογόνο του ανθρώπινου οργανισμού και απαντάται συχνότερα σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και στους ουδετεροπενικούς ασθενείς με λευχαιμία, οι οποίοι λαμβάνουν αγωγή φλουκοναζόλης.[68]

II.3.3.4 *Candida lipolytica*

Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός εμφανίζει ιδιότητες, οι οποίες βρίσκουν ποικίλες εφαρμογές σχετικές με τα τρόφιμα. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ορισμένα στελέχη του χρησιμοποιούνται για την επίτευξη συγκεκριμένων υφών και γεύσεων σε γαλακτοκομικά και κρεατικά προϊόντα, ενώ το είδος αυτό μεταξύ άλλων χρησιμοποιείται και για την παραγωγή οργανικών οξέων και κιτρικού οξέως.[73] Ωστόσο, ορισμένα στελέχη φαίνεται να προκαλούν οπτικές και οργανοληπτικές αλλοιώσεις σε κάποια τρόφιμα, κυρίως λόγω της λιπολυτικής τους ικανότητας.[52, 73] Πιο συγκεκριμένα, ορισμένα στελέχη καταβολίζουν την τυροσίνη και παράγουν μελανίνη, τροποποιώντας με τον τρόπο αυτό το χρώμα στην επιφάνεια ορισμένων ποικιλιών τυριού. Έχει επίσης αναφερθεί ότι το είδος αυτό δύναται να προσβάλλει τα πουλερικά και τέλος, καθότι ψυχότροφος μικροοργανισμός δύναται να προσβάλλει τρόφιμα ακόμη και εντός των ψυκτικών θαλάμων.[73]

II.3.3.5 *Candida parapsilosis*

Η *C. parapsilosis* μπορεί να αναπτύσσεται μεταξύ 8 και 42 ^{o}C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης αυτή των 35 ^{o}C. Εμφανίζει μέτρια αντοχή στη θέρμανση και καθότι πρόκειται για λιπολυτικό και πρωτεολυτικό μικροοργανισμό, αλλοιώνει συχνά τρόφιμα όπως το τυρί, η μαργαρίνη, το βούτυρο και το γιαούρτι, το ωμό κρέας και τα προϊόντα αυτού, τα ωμά θαλασσινά και τα οστρακοειδή, αλλά απαντάται και στα λαχανικά, τα προϊόντα φρούτων, τα αναψυκτικά και το ψωμί. Έχει, επίσης, απομονωθεί από το ανθρώπινο μητρικό γάλα.[52]Είναι ευκαιριακά παθογόνο του ανθρώπινου οργανισμού και προσβάλλει συχνά ουδετεροπενικούς ασθενείς, ασθενείς σε χημειοθεραπεία, σε θεραπεία με αντιβιοτικά, ασθενείς που λαμβάνουν παρεντερική διατροφή, χειρουργημένους, καρκινοπαθείς και εγκαυματίες.[52, 71] Φαίνεται μάλιστα να είναι υπεύθυνη για το 30% των περιστατικών καντιντίασης μεταξύ των νεογνών και για το 10-15% στους ενήλικες.[68] Η μόλυνση ξεκινά με τον αποικισμό του δέρματος ή της γαστρεντερικής οδού, ενώ αξίζει επίσης να τονιστεί ότι τα τελευταία χρόνια ο αριθμός των λοιμώξεων που οφείλεται σε αυτό το είδος έχει αυξηθεί σημαντικά.[68, 71]

III. Αντιμυκητιασική δράση βοτάνων

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, οι μύκητες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της πολύπλευρης επίδρασής τους στη διατροφή του ανθρώπου. Πέρα από την ωφελιμιστική χρήση ορισμένων μυκήτων στην παραγωγή τροφίμων, ενζύμων, αντιβιοτικών, βελτιωτικών και προσθέτων, ορισμένα είδη είναι επίσης υπεύθυνα για τη μόλυνση διαφόρων προϊόντων διατροφής. Συνοψίζοντας, η προσβολή τροφίμων από μύκητες οδηγεί στην αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους και στην υποβάθμιση της ποιότητάς τους και προκαλεί έτσι σημαντικές οικονομικές απώλειες. Επιπλέον, ενέχει σοβαρούς κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών, ιδίως λόγω της ικανότητας πολλών μυκήτων να παράγουν επικίνδυνες για τον άνθρωπο τοξίνες. Οι τοξίνες αυτές παραμένουν σε πολλά από τα διατροφικά αυτά είδη ακόμη και μετά τη συνήθη βιομηχανική επεξεργασία, ενώ αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι πολλές φορές η σύνθεσή τους αυξάνεται στο πλαίσιο της προσπάθειας καταπολέμησης των μυκήτων, κυρίως ως απόκρισης του μικροοργανισμού στο στρες. Ακόμη, τα τελευταία είκοσι χρόνια, λόγω της αύξησης του αριθμού των ηλικιωμένων ατόμων του πληθυσμού, των μεταμοσχευμένων αλλά και λόγω της αύξησης του επιπολασμού του συνδρόμου επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας και του καρκίνου, έχει καταγραφεί επίσης μία σημαντική αύξηση του αριθμού των μικροβιακών λοιμώξεων. Όλα αυτά, καθιστούν αναγκαία την εξεύρεση ικανοποιητικών στρατηγικών καταπολέμησης των μικροοργανισμών αυτών.

Στο πλαίσιο αυτής της προσπάθειας, έχουν χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά πολλά μυκητοκτόνα φάρμακα. Ωστόσο, η χρήση αυτών των φαρμάκων σε καλλιέργειες ενέχει επίσης κινδύνους για την υγεία του ανθρώπου. Πολλά από αυτά τα φάρμακα, καθότι μη βιοδιασπώμενα, συσσωρεύονται στο έδαφος, τα φυτά και το νερό και τελικά, μέσω της τροφικής αλυσίδας μεταφέρονται στους ανθρώπους.[74] Ορισμένα είναι τοξικά για το ήπαρ, το αιμοποιητικό και το κεντρικό νευρικό σύστημα και φαίνεται επίσης, να αυξάνουν τον κίνδυνο καρκινογένεσης, τερατογένεσης, ορμονικής ανισορροπίας και σπερματοτοξικότητας. [74, 75] Επιπλέον, η ανεξέλεγκτη χρήση τέτοιου είδους φαρμάκων τα τελευταία χρόνια έχει προκαλέσει την αύξηση του αριθμού των ανθεκτικών παθογόνων πληθυσμών, γεγονός το οποίο με τη σειρά του καθιστά δυσκολότερη την καταπολέμησή τους και οδηγεί στην ανάγκη χρήσης υψηλότερων συγκεντρώσεων των εν λόγω μυκητοκτόνων ουσιών.[74]

Από την άλλη πλευρά, τα εκχυλίσματα πολλών φυτών και βοτάνων αλλά και τα αιθέρια έλαια αυτών φαίνεται να εμφανίζουν αντιμικροβιακές δράσεις έναντι ορισμένων βακτηρίων και μυκήτων. Έτσι, τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στη διερεύνηση της χρήσης τους ως πιθανές πηγές νέων αντιμικροβιακών ουσιών, ως εναλλακτικές μορφές θεραπείας για την ίαση μολυσματικών ασθενειών και ως παράγοντες που συμβάλλουν στη συντήρηση των τροφίμων.[41] Εκχυλίσματα και αιθέρια έλαια από φυτά όπως το χαμομήλι, το λεμονόχορτο, η ρίγανη, το δεντρολίβανο, το θυμάρι και πολλά άλλα έχει φανεί να διαθέτουν αντιμυκητιασικές ιδιότητες, ενώ όσον αφορά τους μύκητες τα γένη *Penicillium, Aspergillus* και *Fusarium* μελετώνται συνηθέστερα σε τέτοιου είδους δοκιμές.

Η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων οφείλεται στα περιεχόμενα φυτοχημικά συστατικά τους και συγκεκριμένα καθορίζεται από τη χημική δομή αυτών, τη συγκέντρωση στην οποία απαντώνται αλλά και από τις πιθανές αλληλεπιδράσεις τους με άλλες ενώσεις, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν τις βιοδραστικές τους ιδιότητες. Σε γενικές γραμμές, η χρήση αυτών των φυτικών εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων ως αντιμικροβιακές ουσίες εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα συγκριτικά με τη χρήση των κοινών μυκητοκτόνων. Το σημαντικότερο εξ αυτών είναι ότι στα φυτικά εκχυλίσματα και στα αιθέρια έλαια απαντάται μία ποικιλία διαφορετικών βιοδραστικών ενώσεων και επομένως εμφανίζεται διαφορετικός μηχανισμός δράσης ανάλογα με την ένωση που δρα σε κάθε περίπτωση. Κατά συνέπεια, τα φυτικά εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια μπορούν να είναι αποτελεσματικά έναντι διαφορετικών μικροοργανισμών χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας στο παθογόνο.[74] Επιπλέον, τα περιεχόμενα φυτοχημικά εμφανίζουν μικρότερη κυτταροτοξικότητα και επομένως είναι περισσότερο ασφαλή για τον ανθρώπινο οργανισμό. Τέλος, είναι πιο οικονομικά και καθότι αποσυντίθενται ευκολότερα, είναι και πιο φιλικά προς το περιβάλλον. [7, 74]

Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης των βιοδραστικών ενώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων έναντι των μικροβιακών κυττάρων δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως. Ορισμένες υδρόφοβες, βιοδραστικές ενώσεις που απαντώνται σε αυτά φαίνεται να μπορούν να διαπερνούν τα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων και να διαχέονται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, τροποποιώντας τη

διαπερατότητά τους σε κατιόντα H^+ και K^+ και μεταβάλλοντας με τον τρόπο αυτό τη ροή πρωτονίων και το κυτταρικό pH. Το γεγονός αυτό μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη χημική σύσταση των μικροβιακών κυττάρων και κατά συνέπεια τροποποίηση της δραστηριότητάς τους. Οι αλλαγές στη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών μπορούν επίσης να προκαλέσουν αλλαγές στην ωσμωτική πίεση με συνέπεια τη διαρροή κυτταρικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων μορίων ATP, και τελικά τον κυτταρικό θάνατο.[74] Ορισμένες βιοδραστικές ενώσεις που απαντώνται στα αιθέρια έλαια, αφού διαπεράσουν το κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταρική μεμβράνη, επιδρούν επίσης στις μιτοχονδριακές μεμβράνες, τροποποιώντας τη ροή ηλεκτρονίων στο σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων και καταστρέφοντας έτσι τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα που περιέχονται στα κύτταρα των μυκήτων.[76] Επίσης, σε μία ποικιλία βιοδραστικών ενώσεων απαντώνται υδροξυλομάδες, οι οποίες φαίνεται ότι μπορούν να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με ένζυμα που εντοπίζονται στα κύτταρα των μυκήτων, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό μία ποικιλία ενδοκυτταρικών λειτουργιών. Τέλος, αυτές οι βιοδραστικές ενώσεις μπορούν να αλληλεπιδρούν με μεμβρανικά ένζυμα προκαλώντας τελικά απώλεια της ακαμψίας και της ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος των υφών των μυκηλιακών μυκήτων.[74]

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ικανότητα των υδρόφοβων βιοδραστικών ενώσεων να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη αποτελεί έναν πιθανό μηχανισμό δράσης των φυτικών εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων, ωστόσο πρέπει να επισημανθεί ότι η υψηλότερη διαλυτότητα μιας ένωσης στη λιπιδική διπλοστιβάδα δεν συνεπάγεται απαραίτητα και ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση.[74] Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένα από τα φυτικά εκχυλίσματα και αιθέρια έλαια φαίνεται να αναστέλλουν και την ανάπτυξη μυκήτων ικανών να παράγουν μυκοτοξίνες ή/και τη βιοσύνθεση των ίδιων των μυκοτοξινών.[77]

Όσον αφορά την απόδοση των αντιμυκητιασικών ιδιοτήτων των φυτικών εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων σε μεμονωμένες ομάδες ενώσεων, στην υπάρχουσα βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές. Έτσι, τα φλαβονοειδή, μεταξύ των οποίων και οι κατεχίνες, οι οποίες απαντώνται σε μία ποικιλία πράσινων τσαγιών εμφανίζουν αντιμικροβιακές δράσεις *in vitro* ενάντια σε διάφορους μικροοργανισμούς. Οι ταννίνες, φαίνεται επίσης να είναι δραστικές ενάντια τόσο σε μυκηλιακούς μύκητες όσο και σε ζύμες. Υπάρχουν ακόμη αναφορές σχετικά με την

ικανότητα ορισμένων κουμαρινών να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη της *Candida albicans*.[3] Επιπλέον, έχει γίνει προσπάθεια απόδοσης των δράσεων αυτών και σε μεμονωμένες ενώσεις. Έτσι, η θυμόλη, η ανηθόλη, η μενθόλη, η κιτράλη, η καρβακρόλη, η καρβόνη, τα βενζοϊκά οξέα είναι επίσης ενώσεις, οι οποίες μελετώνται σε βάθος για τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες ενάντια σε μύκητες και βακτήρια.[74] Μάλιστα, τα αιθέρια έλαια της ρίγανης και του θυμαριού θεωρείται ότι ανήκουν στους ισχυρότερους αναστολείς της ανάπτυξης των μυκήτων ακριβώς λόγω της παρουσίας σε αυτά φαινολικών ενώσεων όπως η καρβακρόλη και η θυμόλη, οι οποίες επιδρούν στην κυτταρική μεμβράνη των μικροβιακών κυττάρων.[76] Το καφεϊκό οξύ, η κατεχόλη και η πυρογαλλόλη εμφανίζουν και αυτές αντιμικροβιακές ιδιότητες, οι οποίες στην περίπτωση της κατεχόλης και της πυρογαλλόλης θα μπορούσαν να αποδοθούν και στις περιεχόμενες σε αυτές τις ενώσεις υδροξυλομάδες .[3] Η ευγενόλη είναι μία ακόμη φαινολική ένωση με αντιμικροβιακή δράση και μάλιστα φαίνεται να είναι δραστική έναντι όχι μόνο των μυκήτων αλλά και των αφλατοξινών τους, αναστέλλοντας της παραγωγή τους.[3, 74] Ωστόσο, πρέπει να επισημανθεί ότι ακριβώς επειδή τα φυτικά εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια περιέχουν μία μεγάλη ποικιλία ενώσεων, η ακριβής συσχέτιση μεταξύ μεμονωμένων συστατικών τους και συγκεκριμένων δράσεων στα μικροβιακά κύτταρα είναι εξαιρετικά δύσκολη. Οι παρατηρούμενες αντιμυκητιασικές ιδιότητες φαίνεται να είναι, με άλλα λόγια, αποτέλεσμα της συνεργιστικής δράσης των περιεχόμενων στα εκχυλίσματα και έλαια ενώσεων.[74]

Πρέπει, επίσης, να επισημανθεί ότι η συγκέντρωση των παραπάνω ουσιών στα εκχυλίσματα και αιθέρια έλαια φαίνεται να επηρεάζει καθοριστικά την ανάπτυξη των μυκήτων και την πιθανά παρατηρούμενη αντιμυκητιασική δράση, παράλληλα όμως και με άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η ενεργότητα ύδατος, το pH καθώς και οι αλληλεπιδράσεις αυτών.[73]

Τέλος, η πλειοψηφία των παρατηρούμενων αντιμικροβιακών δράσεων των φυτικών εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων αφορά πειράματα *in vitro*. Οι ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους σπανίζουν.[3] Ωστόσο, στα πλαίσια της αναζήτησης εναλλακτικών αντιμυκητιασικών ουσιών για εφαρμογή σε προϊόντα που προορίζονται για βρώση έχουν γίνει ορισμένες in vivo δοκιμές σε τρόφιμα. Σε *in vivo* συνθήκες οι βιοδραστικές ενώσεις των εκχυλισμάτων και των αιθέριων ελαίων πιθανά αλληλεπιδρούν με συστατικά των τροφίμων με συνέπεια η

αποτελεσματικότητά τους να μειώνεται. Έτσι, προκειμένου να επιτευχθούν τα ίδια αποτελέσματα με τις *in vitro* δοκιμασίες απαιτείται η εφαρμογή μεγαλύτερων συγκεντρώσεων των εν λόγω εκχυλισμάτων και ελαίων, η οποία όμως ενέχει τον κίνδυνο αλλοίωσης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τροφίμου.[74]

IV. Σκοπός της μελέτης

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εργασίας διερευνήθηκε η αντιμυκητιασική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων 13 βοτάνων της ελληνικής χλωρίδας έναντι 14 στελεχών μυκήτων, δυνητικά αλλοιογόνων των τροφίμων ή ευκαιριακά παθογόνων του ανθρώπινου οργανισμού.

Είναι γεγονός ότι η Ελλάδα χαρακτηρίζεται από μία εξαιρετικά πλούσια χλωρίδα στην οποία ανήκουν πολυάριθμα αρωματικά φυτά. Τα τελευταία χρόνια σημειώνεται, μάλιστα, μία στροφή του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας σε τέτοιου είδους φυτά και στις πιθανές δράσεις τους για την προάσπιση της υγείας του ατόμου. Όσον αφορά τη χώρα μας, τα βότανα αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής μας και καταναλώνονται από ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού, κυρίως υπό τη μορφή αφεψημάτων. Η κατανάλωσή τους μάλιστα, συστήνεται και από τη Μεσογειακή διατροφή καθώς τα αφεψήματα βοτάνων απαντώνται στη βάση της Μεσογειακής Πυραμίδας μαζί με το νερό, στα πλαίσια της ενυδάτωσης.

Από την άλλη πλευρά οι μύκητες συνιστούν ένα σημαντικό παράγοντα αλλοίωσης ποικίλων ειδών διατροφής. Δεδομένου ότι είναι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να επιβιώνουν σε ένα μεγάλο εύρος τιμών θερμοκρασίας και pH, ότι τα σπόριά τους διαδίδονται ταχύτατα καθώς και ότι πολλοί εξ αυτών αναπτύσσουν ανθεκτικότητα σε ορισμένα αντιμυκητιασικά φάρμακα η καταπολέμησή τους είναι εξαιρετικά δύσκολη και η εξεύρεση εναλλακτικών μορφών αντιμετώπισής τους εξαιρετικά αναγκαία.

Αν και υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία γύρω από τις αντιμυκητιασικές δράσεις πολλών φυτών και βοτάνων, οι περισσότερες μελέτες δεν αφορούν τα υδατικά εκχυλίσματα αυτών και υπάρχουν μόνο λίγες αναφορές στα αφεψήματα αυτών των φυτών και βοτάνων, τη μορφή δηλαδή με την οποία αυτά καταναλώνονται συνηθέστερα. Επομένως σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνήσει την δυνατότητα αυτών των αφεψημάτων να αναστείλουν την ανάπτυξη ή τη σποριογονία αυτών των μικροοργανισμών και να αναδείξει τα συγκεκριμένα βότανα σαν λειτουργικά στοιχεία της διατροφής μας, αυξάνοντας την πρόσληψή τους από τους καταναλωτές.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

V.1 Προετοιμασία Εκχυλισμάτων Βοτάνων και Διαδικασία Παραλαβής Αφυδατωμένων Αφεψημάτων

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 13 βότανα της ελληνικής χλωρίδας. Όλα τα βότανα προήλθαν από τη Νύβριτο Ηρακλείου Κρήτης, με εξαίρεση το Σπαθόχορτο, το οποίο παραλήφθηκε από το Σύλλογο Γυναικών Άνω Πορρόιας του νομού Σερρών και το Μελισσόχορτο, το οποίο προήλθε από βιολογικές καλλιέργειες της Αιτωλοακαρνανίας. Όλα τα βότανα παραλήφθηκαν τυποποιημένα σε συσκευασίες των 250 g.

Στον **Πίνακα ΙΙ** παρουσιάζονται αναλυτικά τα βότανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη:

Πίνακας ΙΙ: Βότανα

	Κοινή ονομασία	Επιστημονική ονομασία	Οικογένεια
1	Αντωναΐδα	*Origanum microphyllum*	Lamiaceae
2	Δενδρολίβανο	*Rosmarinus officinalis*	Lamiaceae
3	Δίκταμο	*Origanum dictamnus*	Lamiaceae
4	Θρύμπα	*Satureja thymbra*	Lamiaceae
5	Θυμάρι	*Thymus vulgaris*	Lamiaceae
6	Μαντζουράνα	*Origanum majorana*	Lamiaceae
7	Ρίγανη	*Origanum vulgare*	Lamiaceae
8	Σπαθόχορτο	*Hypericum perforatum*	Clusiaceae
9	Τσάι του Βουνού	*Sideritis syriaca*	Lamiaceae
10	Φασκόμηλο	*Salvia officinalis*	Lamiaceae

11	Φλισκούνι	*Mentha pulegium*	Lamiaceae
12	Χαμομήλι	*Matricaria chamomilla*	Asteraceae
13	Μελισσόχορτο	*Melissa officinalis*	Lamiaceae

Η διαδικασία που ακολουθείται για την παρασκευή και αφυδάτωση των αφεψημάτων είναι κοινή για όλα τα βότανα. Αρχικά, ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων 3 g βοτάνου και εν συνεχεία, ογκομετρούνται 250 mL μεταλλικού νερού Ζαγόρι, τα οποία τοποθετούνται μαζί με την ποσότητα βοτάνου που ζυγίστηκε προηγουμένως σε γυάλινο σκεύος βρασμού από βιοπυριτικό γυαλί. Το γυάλινο σκεύος τοποθετείται σε προθερμασμένη θερμαντική πλάκα και απομακρύνεται από αυτήν 3 min μετά από την έναρξη του βρασμού. Το αφέψημα ψύχεται για 2 min σε περιβάλλον θερμοκρασίας δωματίου και έπειτα διηθείται σε ογκομετρικό κύλινδρο των 250 mL. Η απώλεια όγκου κατά το βρασμό έχει εκτιμηθεί στα 50 mL περίπου. Εάν ο όγκος στον ογκομετρικό κύλινδρο μετά τη διήθηση είναι μικρότερος των 200 mL, γίνεται συμπλήρωση με ανάλογο όγκο μεταλλικού νερού. Εν συνεχεία, το αφέψημα μεταφέρεται σε πλαστικά δοχεία των 100 mL, τα οποία καλύπτονται με parafilm και τοποθετούνται σε καταψύκτη στους -80 ºC για 24 h. Μετά το πέρας των 24 h τα αφεψήματα τοποθετούνται στη συσκευή λυοφιλίωσης (Heto, Lyolab 3000) για 4 ημέρες περίπου, από όπου παραλαμβάνονται αφυδατωμένα. Προκειμένου τα αποτελέσματα να διορθωθούν ως προς τα διαλυμένα άλατα του νερού, γίνεται παράλληλα λυοφιλίωση ίσου όγκου νερού σε πλαστικά δοχεία αντίστοιχα με εκείνα που τοποθετήθηκαν τα αφεψήματα. Το στερεό υπόλειμμα κάθε αφεψήματος παραλαμβάνεται μετά τη λήξη της λυοφιλίωσης και αφού ζυγισθεί σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας δύο δεκαδικών ψηφίων, τοποθετείται σε γυάλινο φιαλίδιο. Τα φιαλίδια τοποθετούνται για ψύξη στους -40 ºC υπό συνθήκες σκότους.

V.2 Διαλυτοποίηση και φιλτράρισμα στερεού υπολείμματος αφεψημάτων

Η διαδικασία που ακολουθείται για τη διαλυτοποίηση και το φιλτράρισμα του στερεού υπολείμματος των αφεψημάτων είναι επίσης κοινή και για τα 13 βότανα

της εργασίας. Αρχικά, τα δείγματα αποψύχονται σε συνθήκες σκότους, μεταφέρονται σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες και ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Ανάλογα με τη ζυγισθείσα ποσότητα στερεού υπολείμματος του κάθε αφεψήματος προστίθεται στους πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες ανάλογη ποσότητα απιονισμένου νερού ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 200 μg/μL. Προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη διαλυτοποίηση, ο δοκιμαστικός σωλήνας μεταφέρεται στη συσκευή sonicator (Elmasonic S60) για 5 min. Στη συνέχεια, εντός του θαλάμου κάθετης νηματικής ροής, με αποστειρωμένη σύριγγα των 5 mL λαμβάνεται το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα. Το διάλυμα διέρχεται μέσω αποστειρωμένου πλαστικού φίλτρου με διάμετρο πόρων 0.20 μm και συλλέγεται σε αποστειρωμένα φιαλίδια eppendorf των 1.5 mL. Στη συνέχεια τα eppendorf μεταφέρονται για ψύξη στους -20 ºC.

V.3 Επιλογή στελεχών μυκήτων και απομονώσεις ζυμών γένους *Candida*

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής μελέτης διερευνήθηκε η πιθανή αντιμυκητιασική δράση των αφεψημάτων των παραπάνω βοτάνων σε 14 στελέχη μυκήτων.

Στον **Πίνακα ΙΙΙ** που ακολουθεί παρατίθενται αναλυτικά τα στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Πίνακας ΙΙΙ: Μύκητες

	Γένος	Στέλεχος
1	*Aspergillus*	*A.niger*
2	*Aspergillus*	*A.parasiticus 15517 ATTC*
3	*Aspergillus*	*A.flavus*
4	*Aspergillus*	*A.candidus*
5	*Aspergillus*	*A.carbonarius*
6	*Aspergillus*	*A.flavus*
7	*Penicillium*	*Penicillium* spp.

8	*Penicillium*	*P.italicum*
9	*Rhizopus*	*Rhizopus* spp.
10	*Candida*	*C. lipolytica*
11	*Candida*	*C.albicans*
12	*Candida*	*C.glabrata*
13	*Candida*	*C.parapsilosis*
14	*Candida*	*C.krusei/incospicua*

Εξ αυτών, τα στελέχη που σημειώνονται στον πίνακα ΙΙΙ με τους αριθμούς 1-4, καθώς και 7-10 είναι στελέχη τα οποία παραλήφθηκαν από τη συλλογή του εργαστηρίου Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του ανθρώπου και των μικροοργανισμών του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα στελέχη που σημειώνονται με τους αριθμούς 5 και 6 παραλήφθηκαν από τη συλλογή του εργαστηρίου φυτοπαθολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τέλος, τα στελέχη του γένους *Candida* με αριθμούς 11-14 ήταν απομονώσεις από δείγματα κοπράνων υγιών ενηλίκων εθελοντών. Οι εθελοντές αυτοί δεν είχαν λάβει αντιβίωση για τουλάχιστον 2 μήνες πριν τη δειγματοληψία και δεν αντιμετώπιζαν χρόνιο πρόβλημα υγείας. Η απομόνωση των στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση έτοιμων τρυβλίων του καλλιεργητικού υλικού Candida elective agar acc. to NICKERSON (Merckoplate®, Merck, 1.10412.0001) και η ταυτοποίησή τους σε επίπεδο είδους πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια έτοιμων τρυβλίων του χρωμογόνου θρεπτικού υποστρώματος CHROMAGAR CANDIDA (Bioprepare, 010028) και με τη χρήση του συστήματος ταυτοποίησης Api® 20C AUX (Biomérieux, Ref. 20210) με ταυτόχρονη παρατήρηση σχηματισμού ψευδοϋφών στο θρεπτικό υλικό Rice extract agar (Merck, 1.10912.0500) εμπλουτισμένο με 1% Tween® 80 (Pancreac, 162050). Αναλυτικά, τα χαρακτηριστικά των απομονώσεων *Candida* spp. που αξιοποιήθηκαν παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα **(Πίνακας IV).**

Όλα τα στελέχη, πριν την πειραματική διαδικασία φυλάσσονταν σε 1,5% γλυκερόλη σε θερμοκρασία -80 ^{o}C.

Πίνακας IV: Χαρακτηριστικά απομονώσεων *Candida* spp

Στέλεχος	**CHROMAGAR (φαινοτυπικά χαρακτηριστικά)**	**Ταυτοποίηση (Api)**	**Παρουσία ψευδοϋφών**
ΜΑΡΓ. CAN 1^{ος}	Round, convex, πράσινες αποικίες, d=1 mm	*Candida albicans* 1, good identification % i.d.=97.3, T=1.00	Θετικό
ΜΑΡΓ. CAN 3^{ος}	Round, convex, ροζ-μωβ αποικίες, d=1 mm	*Candida glabrata*, very good identification %i.d.=99.3, T=1.00	Αρνητικό
ΨΥΧ. CAN 1^{ος}	Round, convex, ροζ αποικίες, d=1 mm	*Candida parapsilosis* excellent identification %i.d.=99.9, T=0.86	Θετικό
ΖΕΡΒ. CAN 2^{ος}	Flat, wavy, χνουδωτές, ροζ αποικίες, d= 2cm	*Candida krusei/incospicua* good identification % i.d.=98.9, T=0.91	Αρνητικό

V.4 Προετοιμασία στελεχών προς μελέτη

Ο μικροοργανισμός που πρόκειται να μελετηθεί ανακαλλιεργείται από τις stock καλλιέργειες που φυλάσσονται σε 1,5% γλυκερόλη στους -80 ^{o}C. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργειά του επιλέγεται με κριτήριο τη βέλτιστη ανάπτυξή του σε αυτό. Έτσι για την καλλιέργεια των μυκήτων που σημειώνονται με τους αριθμούς 1-6 στον Πίνακα III χρησιμοποιείται το θρεπτικό υλικό Potato Dextrose Agar (LABM, LAB098), ενώ για την καλλιέργεια των μυκήτων που σημειώνονται με τους αριθμούς 7-14 χρησιμοποιείται το θρεπτικό υλικό Sabouraud Dextrose Agar (LABM, LAB009). Ακολουθούν διαδοχικές ανακαλλιέργειες και τα τρυβλία με τον προς μελέτη μικροοργανισμό επωάζονται πριν

από την πειραματική διαδικασία σε κατάλληλη θερμοκρασία, για ορισμένο χρόνο. Συγκεκριμένα, οι μυκηλιακοί μύκητες επωάζονται στους 25°C για πέντε 24ωρα, ενώ οι ζύμες του γένους Candida στους 37°C για 24 ώρες.

V.5 Παραλαβή σπορίων/κυττάρων-Παρασκευή εμβολίου

Μετά το πέρας των 5 ημερών επώασης στην περίπτωση των μυκηλιακών μυκήτων και των 24 ωρών στην περίπτωση των ζυμομυκήτων του γένους *Candida*, τα τρυβλία απομακρύνονται από τον επωαστικό θάλαμο. Το εμβόλιο παρασκευάζεται με απομάκρυνση των σπορίων από την επιφάνεια του μυκηλίου ή των κυττάρων στην περίπτωση των ζυμομυκήτων, με τη βοήθεια του βακτηριολογικού κρίκου. Και στις δύο περιπτώσεις η απομάκρυνση επιτυγχάνεται με τη βοήθεια 5 mL στείρου υδατικού διαλύματος Ringer's-Tween® 80.[25, 75] Το εναιώρημα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο φιαλίδιο McCartney. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex, ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή των σπορίων/κυττάρων σε αυτό.

Το υδατικό διάλυμα Ringer's-Tween® 80 που χρησιμοποιείται για την παραλαβή των σπορίων/κυττάρων παρασκευάζεται με αρχική ανάμιξη 495 mL απιονισμένου νερού με 1 δισκίο 1/4 Ringer's, ανάδευση σε μαγνητική πλάκα και εν συνεχεία προσθήκη 5 mL Tween® 80. Ακολουθεί ανάδευση, βρασμός σε θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα και αποστείρωση του τελικού διαλύματος σε θερμοκρασία 121 ºC για 15 min.

Η εκτίμηση του αριθμού των σπορίων/κυττάρων στο εμβόλιο γίνεται με τη μέθοδο της άμεσης μικροσκόπισης, με τη βοήθεια της αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer.Αν το εναιώρημα είναι πολύ πυκνό ακολουθούν διαδοχικές περαιτέρω αραιώσεις με το υδατικό διάλυμα Ringer's-Tween® 80, ώστε ο αριθμός των σπορίων/κυττάρων στο τελικό εμβόλιο να είναι της τάξης των 10^6 σπόρια/κύτταρα ανά mL. [25, 78]

V.6 Παρασκευή θρεπτικών υλικών

Αρχικά, επιλέγεται κατάλληλο θρεπτικό υλικό με κριτήριο τη βέλτιστη ανάπτυξη του μύκητα σε αυτό.*(βλ.Ενότητα V.4)* Στη συνέχεια, ζυγίζεται η απαιτούμενη ποσότητα του εκάστοτε θρεπτικού υλικού σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας δύο δεκαδικών ψηφίων και ογκομετρείται κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού. Συγκεκριμένα ζυγίζονται 39 gr σκόνης PDA/ 1L απιονισμένου νερού και 62 gr σκόνης SDA/1L απιονισμένου νερού. Η σκόνη διαλύεται στο απιονισμένο νερό εντός της κωνικής φιάλης και στη συνέχεια, το διάλυμα μεταφέρεται σε θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα, με παράλληλη ανάδευση, όπου αφήνεται μέχρι βρασμού. Ακολούθως, και αφού το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου, με γυάλινη πιπέτα των 20 mL μοιράζεται σε γυάλινα φιαλίδια McCartney. Τοποθετούνται 19,8 mL σε κάθε φιαλίδιο. Το περιεχόμενο των φιαλιδίων αποστειρώνεται σε θερμοκρασία 121 ºC για 15 min. Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης τα φιαλίδια αφήνονται σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία περίπου 50 ºC.

V.7 Παρασκευή θετικών μαρτύρων

Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή αντιμυκητιασική δράση των αφεψημάτων παρασκευάζονται διαλύματα ουσιών με γνωστή αντιμυκητιασική δράση τα οποία χρησιμοποιούνται σαν θετικοί μάρτυρες. Οι θετικοί μάρτυρες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα πτυχιακή εργασία είναι οι εξής: διάλυμα fluconazole σε απόλυτη αιθανόλη 1% w/v, υδατικό διάλυμα ketoconazole σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (Applichem, A3672) 0.003 % w/v και υδατικό διάλυμα griseofulvin σε DMSO (Applichem, A3672) 0.003 % w/v. [16, 79, 80]

Πιο συγκεκριμένα το διάλυμα fluconazole σε απόλυτη αιθανόλη παρασκευάζεται με διάλυση μίας κάψουλας fluconazole 100 mg σε 10 ml απόλυτης αιθανόλης. Το υδατικό διάλυμα ketoconazole σε DMSO και το υδατικό διάλυμα griseofulvin σε DMSO παρασκευάζονται με διάλυση 1.5 mg ketoconazole ή griseofulvin αντίστοιχα σε 1 mL DMSO και αραίωση του προκύπτοντος διαλύματος με 49 mL στείρου απιονισμένου νερού.

Το διάλυμα fluconazole σε απόλυτη αιθανόλη χρησιμοποιείται σαν θετικό control σε όλα τα πειράματα, ενώ τα υδατικά διαλύματα ketoconazole σε DMSO και

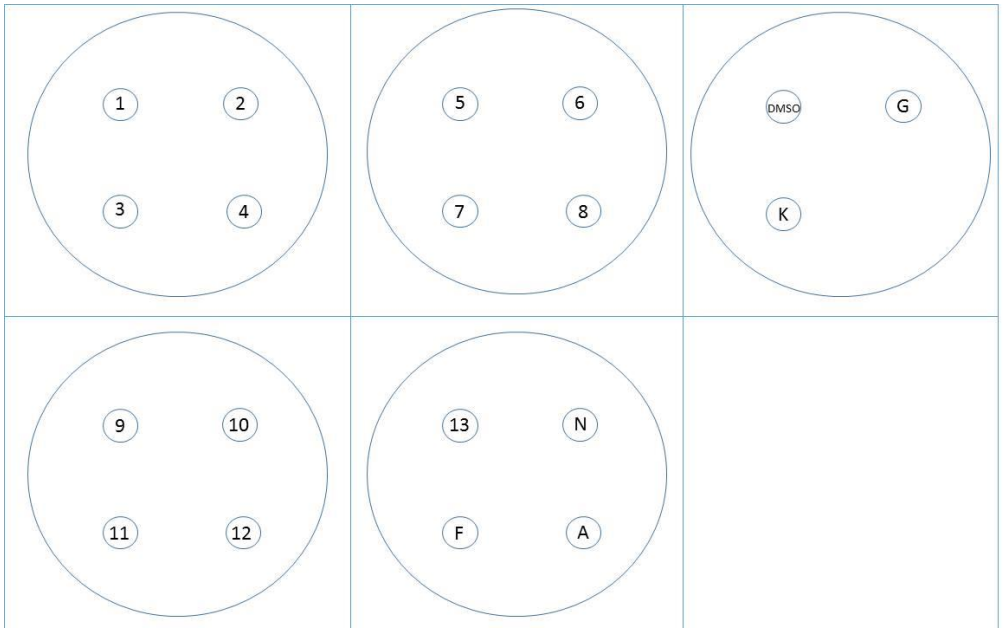
griseofulvin σε DMSO χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες στα πειράματα στα οποία διερευνάται η πιθανή αντιμυκητιασική δράση των αφεψημάτων έναντι των μυκήτων που σημειώνονται με τους αριθμούς 2,3 και 11-14 στον Πίνακα ΙΙΙ.

V.8 Εμβολιασμός θρεπτικού υλικού και επίστρωση τρυβλίων Petri

Κάθε φιαλίδιο McCartney με υγρό θρεπτικό υλικό απομακρύνεται από το υδατόλουτρο. Εντός του θαλάμου κάθετης νηματικής ροής το θρεπτικό υλικό του φιαλιδίου εμβολιάζεται με 0.2 mL σπορίων/κυττάρων από το εναιώρημα *(βλ.Ενότητα V.5),* το οποίο έχει προηγουμένως εκ νέου αναδευτεί σε vortex. Στη συνέχεια, με το περιεχόμενο του φιαλιδίου γίνεται επίστρωση ενός τρυβλίου Petri διαμέτρου 90 mm. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τα υπόλοιπα φιαλίδια McCartney. Για κάθε ένα στέλεχος που πρόκειται να μελετηθεί χρειάζονται 4 τρυβλία Petri με το εμβολιασμένο θρεπτικό υλικό. Το πείραμα πραγματοποιείται σε 3 επαναλήψεις, με αποτέλεσμα για κάθε ένα στέλεχος να απαιτούνται τελικά 12 τρυβλία. Στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω του ενός θετικοί μάρτυρες, απαιτείται ένα ακόμη τρυβλίο με το εμβολιασμένο θρεπτικό υλικό και έτσι τα τρυβλία που προκύπτουν είναι τελικά 15. Μετά τον εμβολιασμό, τα τρυβλία αφήνονται εντός του θαλάμου κάθετης νηματικής ροής μέχρι το θρεπτικό υλικό να στεγνώσει.

V.9 Διερεύνηση της αντιμυκητιασικής δράσης των εκχυλισμάτων

Τα διαλύματα των στερεών υπολειμμάτων των αφεψημάτων απομακρύνονται από τους -20 ºC όπου φυλάσσονταν και αφήνονται να ξεπαγώσουν σε περιβάλλον θερμοκρασίας δωματίου. Στη συνέχεια, λαμβάνονται 4 εμβολιασμένα τρυβλία Petri και με τη βοήθεια φελοτρυπητήρα, δημιουργούνται 4 πηγαδάκια ανά τρυβλίο διαμέτρου 6 mm το καθένα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1 που ακολουθεί.[25, 78] Από τα 16 πηγαδάκια που δημιουργούνται συνολικά, τα 13 πληρώνονται με 40 μL από κάθε αφέψημα και τα υπόλοιπα 3 πληρώνονται με 40 μL αποστειρωμένου, απιονισμένου νερού, 40 μL διαλύματος fluconazole σε απόλυτη αιθανόλη και 40 μL απόλυτης αιθανόλης.(**Σχήμα 1**)[81]



Σχήμα 1

όπου N: Νερό, A: Αιθανόλη, F: Fluconazole, G: Griseofulvin, K:Ketoconazole

Το απιονισμένο νερό χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας ώστε να εξασφαλισθεί ότι η πιθανά παρατηρούμενη αντιμυκητιασική δράση των αφεψημάτων δεν οφείλεται στην παρουσία αυτού. Η απόλυτη αιθανόλη χρησιμοποιείται ώστε να εξασφαλιστεί ότι η παρατηρούμενη ζώνη παρεμπόδισης της ανάπτυξης του μικροοργανισμού γύρω από το διάλυμα fluconazole σε απόλυτη αιθανόλη οφείλεται στην ίδια τη fluconazole και όχι στην απόλυτη αιθανόλη.

Τέλος, στους μύκητες που σημειώνονται με τους αριθμούς 2,3 και 11-14 στον Πίνακα ΙΙΙ, χρησιμοποιήθηκαν όπως αναφέρθηκε παραπάνω και οι 3 θετικοί μάρτυρες. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται ένα πέμπτο εμβολιασμένο με τον προς μελέτη μικροοργανισμό τρυβλίο, στο οποίο 3 πηγαδάκια διαμέτρου 6 mm το καθένα πληρώνονται με τους εναπομείναντες 2 θετικούς μάρτυρες και τον κοινό τους διαλύτη, DMSO. (Σχήμα 1)

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται εις τριπλούν. Τα τρυβλία επωάζονται σε συνθήκες κατάλληλες για την ανάπτυξη του μύκητα που μελετάται κάθε φορά. (θ=37 ^{o}C για τους ζυμομύκητες και θ=25°C για τους μυκηλιακούς μύκητες)

Ακολουθεί μακροσκοπική παρατήρηση της ανάπτυξης των μυκήτων ανά 24ωρο και καταγραφή των αποτελεσμάτων. Στην περίπτωση των μυκηλιακών

μυκήτων, η καταγραφή των αποτελεσμάτων λαμβάνει χώρα μετά από 48 ώρες επώασης, ενώ στην περίπτωση των ζυμομυκήτων μετά από 24 ώρες. Η αντιμικροβιακή δράση προσδιορίζεται με μέτρηση των ζωνών παρεμπόδισης γύρω από τα πηγαδάκια και σύγκριση με τις ζώνες παρεμπόδισης γύρω από τα πηγαδάκια που περιέχουν τους θετικούς μάρτυρες.[25, 78]

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

VI.1 Παραλαβή στερεού υπολείμματος αφεψημάτων

Όπως αναφέρθηκε στο πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας, αφού παρασκευάστηκαν τα προς μελέτη αφεψήματα των βοτάνων, στη συνέχεια λυοφιλιώθηκαν, ώστε να γίνει παραλαβή του στερεού υπολείμματός τους. Στον **Πίνακα V** που ακολουθεί παρουσιάζεται η απόδοση των αφεψημάτων των βοτάνων σε στερεό υπόλειμμα ανά φλιτζάνι.

Πίνακας V: Απόδοση αφυδατωμένου αφεψήματος ανά φλιτζάνι

Βότανο	**Μάζα αφυδατωμένου αφεψήματος (mg) ανά φλιτζάνι (200 mL)**
Αντωναΐδα	421.2 ± 39
Δενδρολίβανο	85.3 ± 14
Δίκταμο	562.3 ± 65
Θρύμπα	448.3 ± 27
Θυμάρι	449.8 ± 19
Μαντζουράνα	508.8 ± 40
Ρίγανη	710.2 ± 19
Σπαθόχορτο	678.4 ± 51
Τσάι του Βουνού	379.3 ± 24
Φασκόμηλο	199.8 ±7
Φλισκούνι	427.0 ± 19
Χαμομήλι	668.5 ± 6
Μελισσόχορτο	904.3 ± 23

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το βότανο με τη μεγαλύτερη απόδοση σε στερεό υπόλειμμα ανά φλιτζάνι είναι το Μελισσόχορτο, με απόδοση 904.3 ± 23 mg, ενώ ακολουθεί η Ρίγανη με απόδοση 710.2 ± 19 mg και τα Σπαθόχορτο και Χαμομήλι με αποδόσεις 678.4 ± 51 mg και 668.5 ± 6 αντίστοιχα. Αντιθέτως, το

βότανο με τη μικρότερη απόδοση ανά φλιτζάνι είναι το Δενδρολίβανο με απόδοση 85.3 ± 14 mg και ακολουθεί το Φασκόμηλο με απόδοση 199.8 ±7 mg.

Η απόδοση των βοτάνων ποικίλει ανάλογα με το είδος του διαλύτη που χρησιμοποιείται κάθε φορά.[25, 74] Σε γενικές γραμμές, οι πολικοί διαλύτες αυξάνουν την απόδοση σε φυτοχημικά κατά την εκχύλιση καθώς φαίνεται να διαθέτουν μεγαλύτερη ικανότητα διείσδυσης στον φυτικό ιστό συγκριτικά με τους μη πολικούς, ενώ μειώνουν την αντίστοιχη απόδοση κατά τη λυοφιλίωση, λόγω της αυξημένης διαλυτότητας των φυτοχημικών στο διαλύτη.[74, 82] Επομένως, δεδομένου ότι το νερό αποτελεί ένα εξαιρετικά πολικό μόριο, η εκχύλιση με αυτό αναμένεται να οδηγεί σε μικρότερη απόδοση στερεού υπολείμματος μετά το πέρας της λυοφιλίωσης.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν αναφορές σύμφωνα με τις οποίες, οι οργανικοί διαλύτες είναι οι καλύτεροι διαλύτες για την εκχύλιση ενώσεων με αντιμυκητιασική δράση από ορισμένα φυτά, στην παρούσα πτυχιακή εργασία επιλέχθηκε ως διαλύτης το νερό, καθώς στόχος της ήταν η παρασκευή των εκχυλισμάτων των βοτάνων που θα χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση της αντιμυκητιασικής τους δράσης να προσομοιώνει όσο το δυνατόν περισσότερο τη διαδικασία παρασκευής και κατανάλωσης των αντίστοιχων αφεψημάτων από τους καταναλωτές.

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από το είδος του διαλύτη, η απόδοση σε στερεό υπόλειμμα επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, μεταξύ των οποίων η αναλογία διαλύτη-δείγματος, η μέθοδος αλλά και ο χρόνος της εκχύλισης, ο οποίος μπορεί να ποικίλει από 1 λεπτό ως και 24 ώρες ή και παραπάνω.[82] Επηρεάζεται επίσης και από το είδος του βοτάνου και την περιεκτικότητά του σε φυτοχημικά συστατικά, από το μέρος που χρησιμοποιείται στη διαδικασία της εκχύλισης, τις περιβαλλοντικές και κλιματικές συνθήκες κατά την ανάπτυξη του φυτού καθώς και τέλος, από τις συνθήκες αποθήκευσής του.[16, 74, 82]

VI.2 Αντιμυκητιασική δράση αφεψημάτων

VI.2.1 *Aspergillus* spp.

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης εργασίας διερευνήθηκε η πιθανή αντιμυκητιασική δράση και των 13 αφεψημάτων σε 6 στελέχη του γένους *Aspergillus*. Ακολούθως, παρατίθεται ο ακριβής αριθμός σπορίων με τον οποίο εμβολιάστηκε το θρεπτικό υλικό σε κάθε περίπτωση.

A.niger → 6.05 x 10^6 σπόρια/mL

A.parasiticus 15517 ATTC →8.05 x 10^6 σπόρια/mL

A.flavus →6.37 x 10^6 σπόρια/mL

A.candidus →2.33 x 10^6 σπόρια/mL

A.carbonarius → 6.08 x 10^6 σπόρια/mL

A.flavus →2.72 x 10^6 σπόρια/mL

Στον **Πίνακα VI** που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διερεύνησης της ύπαρξης ή μη αντιμυκητιασικής δράσης των αφεψημάτων εναντίον των στελεχών του γένους *Aspergillus* που μελετήθηκαν.

Πίνακας VI: Διερεύνηση αντιμυκητιασικής δράσης αφεψημάτων σε στελέχη του *Aspergillus* spp.

	Ζώνη Παρεμπόδισης* (mm)					
Βότανα	*A.niger*	*A.parasiticus 15517 ATTC*	*A.flavus*	*A.candidus*	*A.carbonarius*	*A.flavus*
Αντωναΐδα	-	-	-	-	-	-
Δενδρολίβανο	-	-	-	-	-	-
Δίκταμο	-	-	-	-	-	-
Θρύμπα	-	-	-	-	-	-
Θυμάρι	-	-	-	-	-	-
Μαντζουράνα	-	-	-	-	-	-
Ρίγανη	-	-	-	-	-	-
Σπαθόχορτο	-	-	-	-	-	-
Τσάι του Βουνού	-	-	-	-	-	-
Φασκόμηλο	-	-	-	-	-	-

Φλισκούνι	-	-	-	-	-	-
Χαμομήλι	-	-	-	-	-	-
Μελισσόχορτο	-	-	-	-	-	-
Νερό	-	-	-	-	-	-
Fluconazole	18	23	14	-	17	20
Αιθανόλη	-	-	-	-	-	-
Ketoconazole		19	12			
Griseofulvin		-	-			
DMSO		-	-			

*Μέσος όρος 3 επαναλήψεων, (-): Μη παρεμπόδιση της ανάπτυξης

Όπως παρατηρείται τα υδατικά εκχυλίσματα των παραπάνω αφεψημάτων σε συγκέντρωση 200 μg/μL δεν δύναται να αναστείλουν την ανάπτυξη των μυκήτων του συγκεκριμένου γένους. Παρατηρείται, ακόμη, ότι το διάλυμα fluconazole σε απόλυτη αιθανόλη 1% (w/v) δεν λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας στην περίπτωση του *A.candidus*, καθώς δεν παρεμπόδισε την ανάπτυξή του. Στην περίπτωση των *A.parasiticus ATTC 15517* και *A.flavus* χρησιμοποιήθηκαν δύο ακόμη θετικοί μάρτυρες, το υδατικό διάλυμα ketoconazole και το υδατικό διάλυμα griseofulvin σε DMSO 0.003% w/v. Παρατηρείται ότι και τα δύο στελέχη ήταν ανθεκτικά στο διάλυμα griseofulvin.

Σύμφωνα με τους Magro et al., το υδατικό εκχύλισμα του χαμομηλιού (*Anthemis nobilis L.*) σε συγκέντρωση 0.92 g/mL μπορεί να παρεμποδίσει ολοκληρωτικά την ανάπτυξη του *A.candidus* και του *A.niger*. Ωστόσο, η συγκέντρωση του εκχυλίσματος στην οποία παρατηρείται το φαινόμενο αυτό είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.[83] Οι Magro et al. παρατήρησαν επίσης, μία μικρότερη παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *A.candidus*, όταν χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση ίση με 0.69 g/mL, ενώ ακόμη πιο μικρή ήταν η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *A.niger* σε αυτή τη συγκέντρωση.[83] Από τα παραπάνω θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η χρήση υδατικών εκχυλισμάτων υψηλότερης συγκέντρωσης στην παρούσα εργασία θα οδηγούσε πιθανά σε αναστολή ή παρεμπόδιση της ανάπτυξης ορισμένων μυκήτων του γένους αυτού. Κάτι τέτοιο θα ήταν αποδεκτό για τα υδατικά εκχυλίσματα ορισμένων βοτάνων αλλά όχι όλων, καθώς σε υψηλές συγκεντρώσεις ορισμένα εξ αυτών φαίνεται να προκαλούν κυτταροτοξικότητα σε ανθρώπινα κύτταρα. Συγκεκριμένα, σε μελέτη της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων των υδατικών εκχυλισμάτων των εν λόγω βοτάνων στα επίπεδα βιωσιμότητας των περιφερικών μονοπύρηνων (PBMCs), παρατηρήθηκε ότι το χαμομήλι είναι το μόνο από τα βότανα το οποίο δεν φαίνεται να επιδρά στον κυτταρικό πληθυσμό, καθώς ακόμη και στη δόση των 2000 μg δεν προκάλεσε κυτταροτοξικότητα. Όσον αφορά τα αφεψήματα από το Φλισκούνι, το Μελισσόχορτο, τη Ρίγανη, τη Μαντζουράνα και το Σπαθόχορτο η επίδρασή τους στον κυτταρικό πληθυσμό σε όλες τις χορηγούμενες δόσεις (200 μg, 500 μg, 1000 μg, 2000 μg) δεν προκάλεσε τοξικότητα μεγαλύτερη του 5%. Τα αφεψήματα από το Δενδρολίβανο και τη Θρύμπα μέχρι και τη δόση των 500μg και το αφέψημα από το Δίκταμο μέχρι και τη δόση των 1000 μg προκάλεσαν

κυτταροτοξικότητα επίσης μέχρι 5%. Επιπλέον, ενώ η βιωσιμότητα των κυττάρων ελάχιστα επηρεάστηκε από τη δόση των 500 μg της αντωναϊδας,μειώθηκε καθώς η δόση αυξήθηκε στα 1000 και 2000 μg. Ο κυτταρικός πληθυσμός, τέλος, μειώθηκε όταν η δόση του φασκόμηλου ήταν πάνω από τα 500 μg, του τσαγιού του βουνού στα 2000 μg και του θυμαριού στα 2000 μg. [9]

Σύμφωνα με τους Ličina et al., τα υδατικά εκχυλίσματα της ρίγανης (*Origanum vulgare L.*), ενώ εμφανίζουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση, σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0.16 και 20 mg/mL δεν δύνανται να αναστείλουν την ανάπτυξη του *A.flavus* και *A.niger*.[16] Ωστόσο, τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με οργανικούς διαλύτες από το φυτό αυτό και συγκεκριμένα με χρήση αιθανόλης, ακετόνης, αιθανικού αιθυλεστέρα και διαιθυλαιθέρα παρεμπόδισαν την ανάπτυξη του *A.flavus*, εμφανίζοντας ελάχιστες συγκεντρώσεις παρεμπόδισης (MIC) μεταξύ 10 και 20 mg/mL. Τα ίδια εκχυλίσματα, με εξαίρεση αυτό της αιθανόλης, παρεμπόδισαν επίσης την ανάπτυξη του *A.niger*, εμφανίζοντας ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) στα 20 mg/mL.[16] Συγκρίνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, παρατηρείται ότι τα οργανικά εκχυλίσματα εμφανίζουν αντιμυκητιασική δράση ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, σε αντίθεση με τα υδατικά εκχυλίσματα. Ωστόσο, αξίζει να επισημανθεί ότι στην εργασία των Ličina et al., ο χρόνος εκχύλισης και η αναλογία δείγματος-διαλύτη ήταν σημαντικά μεγαλύτερα συγκριτικά με την παρούσα εργασία.

Επιπλέον, σύμφωνα με τους Bluma et al. τα παραληφθέντα από την υδροαπόσταξη υδατικά εκχυλίσματα του χαμομηλιού (*Matricaria chamomilla*), της μαντζουράνας (*Origanum marjorana*), του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*), της ρίγανης (*Origanum vulgare*), του δεντρολίβανου (*Rosemarinus officinalis*), του θυμαριού *(Hedeoma multiflora*) και του φασκόμηλου (*Salvia officinalis*) δεν δύνανται να αναστείλουν την ανάπτυξη και σποριογονία των *A.flavus* και *A.parasiticus*. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι Bluma et al. παρατήρησαν μία μικρή μείωση της σποριογονίας και της ανάπτυξης του μυκηλίου γύρω από το πηγαδάκι με το υδατικό εκχύλισμα του χαμομηλιού καθώς και μία ενίσχυση γύρω από τα πηγαδάκια με τα υδατικά εκχυλίσματα άλλων φυτών που μελετήθηκαν στα πλαίσια της εργασίας τους, ωστόσο περισσότερα δεδομένα σχετικά με αυτή τους την παρατήρηση δεν αναφέρονται. Όσον αφορά τα αιθανολικά εκχυλίσματα των ίδιων φυτών, σε συγκεντρώσεις μεταξύ 50 και

300 mg/mL δεν προκάλεσαν ανιχνεύσιμη αναστολή της σποριογονίας ή της ανάπτυξης των μυκήτων που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της ίδιας εργασίας.[84]

Από όλα τα παραπάνω, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η παρατηρούμενη δράση των εκχυλισμάτων σχετίζεται με τη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων αλλά και με την ικανότητα του κάθε διαλύτη να εκχυλίζει ουσίες με αντιμυκητιασική δράση, καθώς είναι γνωστό ότι οι οργανικοί διαλύτες διαθέτουν μεγαλύτερη ικανότητα εκχύλισης αυτών των ενώσεων συγκριτικά με το νερό. Η αντιμυκητιασική δράση φαίνεται να επηρεάζεται, επίσης, από το χρόνο εκχύλισης, καθώς στην πλειοψηφία αντίστοιχων ερευνών ο χρόνος αυτός είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο χρόνο κατά την παρασκευή των αφεψημάτων στην παρούσα εργασία.

Τέλος, σε αρκετές έρευνες εξετάζεται η δράση των αιθέριων ελαίων αρωματικών φυτών και βοτάνων έναντι μυκήτων του γένους αυτού. Για παράδειγμα, το αιθέριο έλαιο της θρύμπας (*S.thrympa*) φαίνεται να εμφανίζει ισχυρή δράση έναντι μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Aspergillus*. Συγκεκριμένα, παρεμποδίζει την ανάπτυξη των *A.niger* και *A.flavus*, εμφανίζοντας ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) στα 0.025 mg/mL.[85] Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο του θυμαριού (*Thymus vulgaris*) σε συγκέντρωση 1500 μL/L φαίνεται να παρεμποδίζει κατά 42.4 ως 100% την ανάπτυξη των *A.niger* και *A.carbonarius*.[86] Τέλος, τα αιθέρια έλαια της ρίγανης (*Origanum vulgare*) σε συγκεντρώσεις 150, 300 και 500 μg/g και του θυμαριού *(Hedeoma multiflora*) σε συγκεντρώσεις 300 και 500 μg/g φαίνεται να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των *A.flavus* και *A.parasiticus*. Επιπλέον, τα αιθέρια έλαια του χαμομηλιού (*Matricaria chamomilla*), της μαντζουράνας (*Origanum marjorana*) και του δεντρολίβανου (*Rosemarinus officinalis*) σε συγκεντρώσεις 150, 300 και 500 μg/g φαίνεται να παρεμποδίζουν την ορατή σποριογονία των μυκήτων αυτών, με την υψηλότερη αναστολή σε όλες τις περιπτώσεις να παρατηρείται στη μικρότερη αραίωση του ελαίου.[84] Οι παρατηρούμενες διαφορές στα αποτελέσματα όταν στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιούνται αιθέρια έλαια θα μπορούσαν να ερμηνευτούν λόγω των λιπόφιλων ιδιοτήτων των αιθέριων ελαίων, οι οποίες φαίνεται να διευκολύνουν τη διείσδυση αυτών στις κυτταρικές μεμβράνες των μυκήτων.[86]

VI.2.2 *Rhizopus* spp.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας διερευνήθηκε επίσης η πιθανή αντιμυκητιασική δράση των 13 αφεψημάτων έναντι του γένους *Rhizopus*. Το θρεπτικό υλικό σε αυτή την περίπτωση εμβολιάστηκε με 5.75×10^6 σπόρια/mL από το *Rhizopus* spp.

Στον **Πίνακα VII** που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διερεύνησης της ύπαρξης ή μη αντιμυκητιασικής δράσης των αφεψημάτων έναντι του γένους αυτού.

Πίνακας VII: Διερεύνηση αντιμυκητιασικής δράσης αφεψημάτων σε στελέχη του *Rhizopus* spp.

	Ζώνη παρεμπόδισης* (mm)
Βότανα	*Rhizopus* spp.
Αντωναΐδα	-
Δενδρολίβανο	-
Δίκταμο	-
Θρύμπα	-
Θυμάρι	-
Μαντζουράνα	-
Ρίγανη	-
Σπαθόχορτο	-
Τσάι του Βουνού	-
Φασκόμηλο	-
Φλισκούνι	-
Χαμομήλι	-
Μελισσόχορτο	-

Νερό	-
Fluconazole	-
Αιθανόλη	-
Ketoconazole	
Griseofulvin	
DMSO	

*Μέσος όρος 3 επαναλήψεων, (-): Μη παρεμπόδιση της ανάπτυξης

Όπως παρατηρείται, τα υδατικά εκχυλίσματα των παραπάνω φυτών σε συγκέντρωση 200 μg/μL δεν δύναται να αναστείλουν την ανάπτυξη του *Rhizopus spp*. Παρατηρείται επίσης ότι το διάλυμα fluconazole σε απόλυτη αιθανόλη 1% (w/v) δεν λειτούργησε σαν θετικός μάρτυρας, καθώς δεν παρεμπόδισε την ανάπτυξη του *Rhizopus* spp., γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες.[87, 88]

Συγκριτικά με τους υπόλοιπους μύκητες που εξετάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, το γένος *Rhizopus* είναι το λιγότερο μελετημένο ως προς την επίδραση εκχυλισμάτων και αιθέριων ελαίων αρωματικών φυτών και βοτάνων στην ανάπτυξή του. Οι López et al. μελέτησαν 18 αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά της οικογένειας Lamiaceae, στην οποία ανήκει και η πλειοψηφία των βοτάνων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία και διαπίστωσαν επίσης ότι τα υδατικά και μεθανολικά εκχυλίσματα των φυτών αυτών σε συγκέντρωση 250 ppm δεν μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη του *Rhizopus stolonifer*.[89] Αντιθέτως, τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με τη βοήθεια διχλωρομεθάνιου και αιθανικού αιθυλεστέρα από 8 φυτά αυτής της οικογένειας, στην ίδια συγκέντρωση παρεμπόδισαν την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μύκητα πάνω από 20%. Μεταξύ αυτών ήταν το διχλωρομεθανικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis)* καθώς και το εκχύλισμα του θυμαριού (*Thymus vulgaris)*, το οποίο παραλήφθηκε με τη βοήθεια αιθανικού αιθυλεστέρα.[89] Από τα παραπάνω επισημαίνεται ξανά η σημασία του διαλύτη για την εμφάνιση παρεμπόδισης στην ανάπτυξη του μύκητα.

Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο του φυτού Lippia graveolens ή Lippia berlandieri, γνωστό ως μεξικάνικη ρίγανη, φαίνεται να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του *Rhizopus* spp. σε συγκεντρώσεις 100 και 150 mg/kg.[90]

VI.2.3 *Candida* spp.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε επίσης η πιθανή αντιμυκητιασική δράση των 13 βοτάνων έναντι 5 στελεχών του γένους *Candida*. Ακολούθως, παρατίθεται ο ακριβής αριθμός σπορίων με τον οποίο εμβολιάστηκε το θρεπτικό υλικό σε κάθε περίπτωση.

C.albicans → 5.30×10^6 σπόρια/mL

C.lypolitica → 6.40×10^6 σπόρια/mL

C.glabrata → 3.94×10^6 σπόρια/mL

C.parapsilosis → 6.83×10^6 σπόρια/mL

C.krusei/incospicua → 7.53×10^6 σπόρια/mL

Στον **Πίνακα VIII** που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διερεύνησης της ύπαρξης ή μη αντιμυκητιασικής δράσης όλων των αφεψημάτων έναντι του γένους αυτού.

Πίνακας VIII: Διερεύνηση αντιμυκητιασικής δράσης αφεψημάτων σε στελέχη του *Candida* spp.

	Ζώνη παρεμπόδισης* (mm)				
Βότανα	*C.albicans*	*C.lypolitica*	*C.glabrata*	*C.parapsilosis*	*C.krusei /incospicua*
Αντωναΐδα	-	-	-	-	-
Δενδρολίβανο	-	-	-	-	-
Δίκταμο	-	-	-	-	-
Θρύμπα	-	-	-	-	-
Θυμάρι	-	-	-	-	-
Μαντζουράνα	-	-	-	-	-
Ρίγανη	-	-	-	-	-
Σπαθόχορτο	-	-	-	-	-
Τσάι του Βουνού	-	-	-	-	-
Φασκόμηλο	-	-	-	-	-
Φλισκούνι	-	-	-	-	-
Χαμομήλι	-	-	-	-	-
Μελισσόχορτο	-	-	-	-	-
Νερό	-	-	-	-	-
Fluconazole	28	32	34	34	28
Αιθανόλη	-	-	-	-	-
Ketoconazole	24		15	27	-
Griseofulvin	-		-	-	-

DMSO	-		9	-	-

*Μέσος όρος 3 επαναλήψεων, (-): Μη παρεμπόδιση της ανάπτυξης

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα υδατικά εκχυλίσματα των αφεψημάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία σε συγκέντρωση 200 μg/μL δεν δύναται να αναστείλουν την ανάπτυξη των μυκήτων του γένους αυτού. Το στέλεχος της *C.krusei/incospicua* ήταν ανθεκτικό στο υδατικό διάλυμα ketoconazole σε DMSO 0.003% w/v, καθώς η ανάπτυξή του δεν παρεμποδίστηκε από αυτό. Το υδατικό διάλυμα griseofulvin σε DMSO 0.003% w/v δεν λειτούργησε ως θετικός μάρτυρας για κανένα από τα στελέχη *Candida* που μελετήθηκαν.

Σύμφωνα με τους Ličina et al. τα εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται με οργανικούς διαλύτες από τη ρίγανη (*Origanum vulgare L.*) και συγκεκριμένα με χρήση αιθανόλης, ακετόνης, αιθανικού αιθυλεστέρα και διαιθυλαιθέρα παρεμποδίζουν την ανάπτυξη της *C.albicans* εμφανίζοντας ελάχιστες συγκεντρώσεις παρεμπόδισης (MIC) μεταξύ 2.5 και 10 mg/mL.[16] Στην ίδια εργασία διερευνήθηκε η επίδραση και του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού αυτού σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0.16 και 20 mg/mL σε δύο στελέχη *C.albicans.* Το υδατικό εκχύλισμα φάνηκε να επιδρά στο ένα εξ αυτών, εμφανίζοντας ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης στα 20 mg/mL, ενώ καμία επίδραση δεν παρατηρήθηκε στο δεύτερο στις δοκιμασθείσες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να οφείλεται σε γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των δύο στελεχών. Παρ' όλα αυτά, ο χρόνος εκχύλισης και η αναλογία διαλύτη-δείγματος για την παρασκευή του υδατικού εκχυλίσματος σε αυτή τη μελέτη ήταν σημαντικά μεγαλύτερα συγκριτικά με το χρόνο εκχύλισης για την παρασκευή των αφεψημάτων στην παρούσα πτυχιακή εργασία.[16] Η *C.albicans* είναι επίσης ευαίσθητη στο αιθανολικό εκχύλισμα του φασκόμηλου (*Salvia officinalis*) καθώς η ανάπτυξή της παρεμποδίζεται από την παρουσία του εκχυλίσματος σε συγκεντρώσεις από 50 ως 250 mg/mL, εμφανίζοντας ζώνες παρεμπόδισης από 8.25 ως 11.25 mm.[91] Από την άλλη πλευρά τα υδρομεθανολικά εκχυλίσματα του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*) και του χαμομηλιού (*Matricaria recutita L.*) (20:80 v/v) σε συγκέντρωση 50 mg/mL δεν μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των *C.albicans, C.glabrata* και *C.parapsilosis.*[92]

Όσον αφορά τα αιθέρια έλαια, στη συντριπτική πλειοψηφία τους φαίνεται να είναι δραστικά εναντίον μυκήτων του γένους αυτού. Μεταξύ αυτών, αξίζει να αναφερθεί ότι το αιθέριο έλαιο του δεντρολίβανου (*Rosmarinus officinalis*) δύναται να παρεμποδίσει μέτρια την ανάπτυξη της *C.albicans,* προκαλώντας ζώνη παρεμπόδισης γύρω από το εμποτισμένο με το έλαιο δισκίο ίση με 30 mm, όταν οι αντίστοιχες ζώνες για τους θετικούς μάρτυρες, ketoconazole, nystatin και amphotericin B ήταν 30, 28 και 16 mm, αντίστοιχα.[93]

VI.2.4 *Penicillium* spp.

Τέλος, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η δράση των 13 υδατικών εκχυλισμάτων έναντι στελεχών του γένους *Penicillium*. Στη συνέχεια παρατίθεται ο ακριβής αριθμός σπορίων με τον οποίο εμβολιάστηκε το θρεπτικό υλικό σε κάθε περίπτωση.

P.italicum → 9.84 x 10^6 σπόρια/mL

Penicillium spp. → 4.09 x 10^6 σπόρια/mL

Στον **Πίνακα IX** που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διερεύνησης της ύπαρξης ή μη αντιμυκητιασικής δράσης των αφεψημάτων έναντι του γένους αυτού.

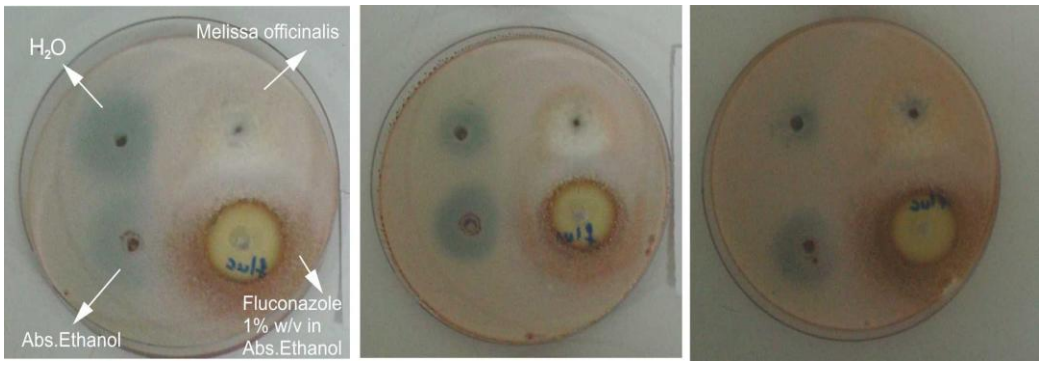
Πίνακας IX: Διερεύνηση αντιμυκητιασικής δράσης αφεψημάτων σε στελέχη του *Penicillium* spp.

	Ζώνη παρεμπόδισης* (mm)	
Βότανα	*P.italicum*	*Penicillium* spp.
Αντωναΐδα	-	-
Δενδρολίβανο	-	-
Δίκταμο	-	-
Θρύμπα	-	-
Θυμάρι	-	-
Μαντζουράνα	-	-
Ρίγανη	-	-
Σπαθόχορτο	-	-
Τσάι του Βουνού	-	-
Φασκόμηλο	-	-
Φλισκούνι	-	-
Χαμομήλι	-	-
Μελισσόχορτο	-	-
Νερό	-	-
Fluconazole	24	18
Αιθανόλη	-	-
Ketoconazole		
Griseofulvin		
DMSO		

*Μέσος όρος 3 επαναλήψεων, (-): Μη παρεμπόδιση της ανάπτυξης

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα υδατικά εκχυλίσματα των αφεψημάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία σε συγκέντρωση 200 μg/μL δεν δύναται να αναστείλουν την ανάπτυξη των μυκήτων του γένους *Penicillium.* Ωστόσο, όπως φαίνεται στις Εικόνες 7, 8, 9 και 10 ορισμένα εξ αυτών φαίνεται να επιδρούν στη σποριογονία των μυκήτων αυτών.

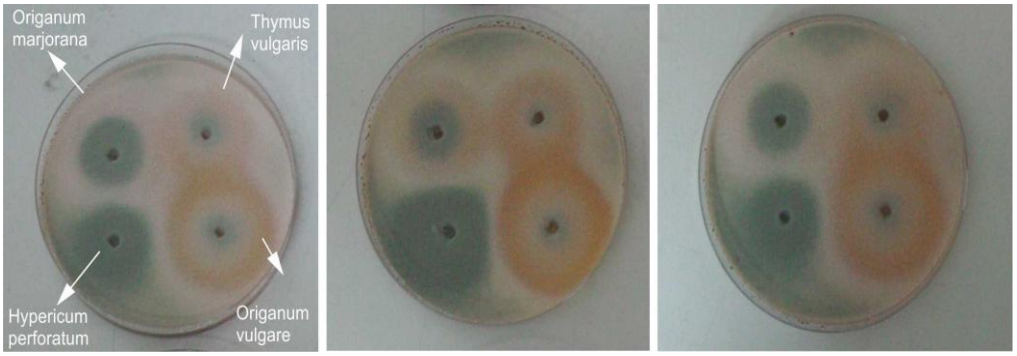
Πιο συγκεκριμένα, και σε ό,τι αφορά το *P.italicum*, γύρω από το πηγαδάκι με το υδατικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου (*Melissa officinalis*), παρατηρήθηκε μία καθυστέρηση της ανάπτυξης των σπορίων. Δηλαδή, ενώ στις 48 ώρες επώασης, γύρω από τα πηγαδάκια με άλλα εκχυλίσματα βοτάνων που μελετήθηκαν ξεκίνησε ο σχηματισμός σπορίων, τα οποία χρωμάτισαν πράσινο το μυκήλιο, γύρω από το πηγαδάκι με το υδατικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε, με αποτέλεσμα το μυκήλιο να παραμείνει λευκό. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και στις τρεις επαναλήψεις. (**Εικόνα 7**)



Εικόνα 7: Επίδραση του H_2O, του υδατικού εκχυλίσματος του μελισσόχορτου, της απόλυτης αιθανόλης και του διαλύματος fluconazole 1% (w/v) σε απόλυτη αιθανόλη στην ανάπτυξη και σποριογονία του *P.italicum*. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τρεις επαναλήψεις.

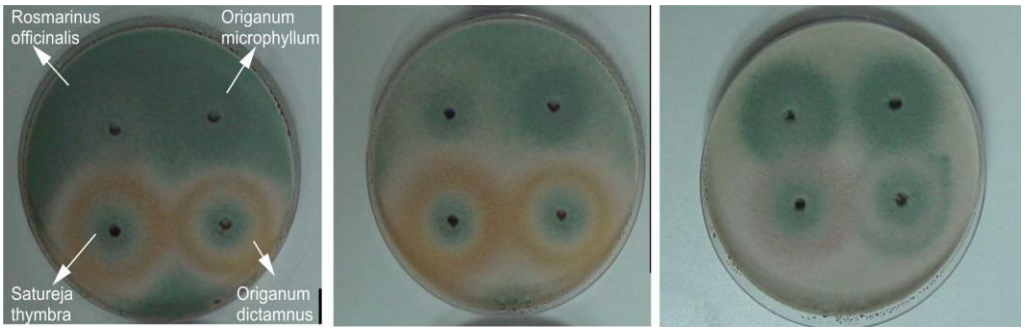
Επιπλέον, γύρω από τα πηγαδάκια με τα υδατικά εκχυλίσματα της ρίγανης *(Origanum vulgare)* και του θυμαριού (*Thymus vulgaris*) παρατηρήθηκε επίσης καθυστέρηση της ανάπτυξης των σπορίων, ενώ σε μεγαλύτερη ακτίνα από τα πηγαδάκια αυτά φαίνεται να παρεμποδίστηκε ελαφρά και η ανάπτυξη του μυκηλίου. Γύρω από το πηγαδάκι με το υδατικό εκχύλισμα της μαντζουράνας (*Origanum majorana*) παρατηρήθηκε κανονική σποριογονία, με αποτέλεσμα το μυκήλιο να χρωματιστεί πράσινο. Ωστόσο, σε μεγαλύτερη ακτίνα από αυτό το μυκήλιο ήταν

λευκό,γεγονός που συνεπάγεται απουσία σπορίων. Το φαινόμενο αυτό ήταν επίσης επαναλήψιμο. (**Εικόνα 8)**



Εικόνα 8: Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων της μαντζουράνας, του θυμαριού, του σπαθόχορτου και της ρίγανης στην ανάπτυξη και σποριογονία του *P.italicum*. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τρεις επαναλήψεις.

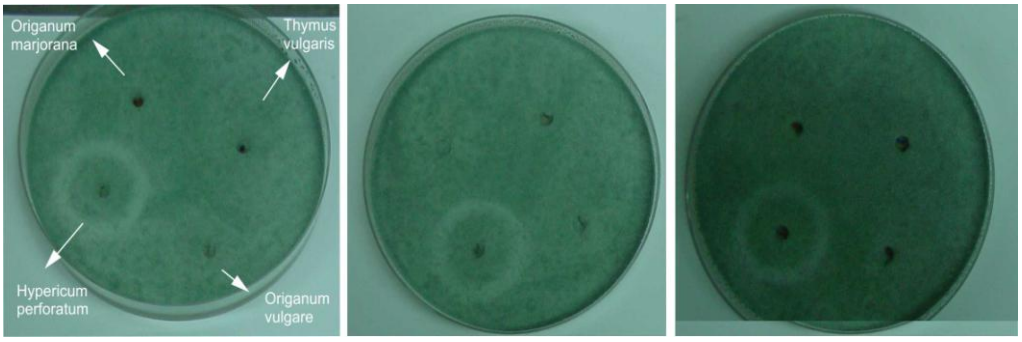
Παρόμοια εικόνα παρουσιάστηκε και γύρω από τα πηγαδάκια με τα υδατικά εκχυλίσματα των βοτάνων θρύμπα (*Satureja thymbra*) και δίκταμο (*Origanum dictamnus*). Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση η παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μυκηλίου είναι εντονότερη στις δύο εκ των τριών επαναλήψεων.(**Εικόνα 9**)



Εικόνα 9: Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων του δεντρολίβανου, της αντωναϊδας, της θρύμπας και του δίκταμου στην ανάπτυξη του *P.italicum*. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τρεις επαναλήψεις.

Τέλος, κανονική ανάπτυξη του μυκηλίου και των σπορίων του μύκητα αυτού παρατηρείται γύρω από τα πηγαδάκια με τα υδατικά εκχυλίσματα των υπόλοιπων βοτάνων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Σχετικά με το *Peniciliium* spp., στις 72 ώρες επώασης γύρω από πηγαδάκι με το υδατικό εκχύλισμα του σπαθόχορτου (*Hypericum perforatum*) παρατηρείται μία λεπτή, λευκή ζώνη στην οποία φαίνεται να υπάρχει ανάπτυξη του μυκηλίου αλλά όχι ανάπτυξη των σπορίων. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και στις τρεις επαναλήψεις. (**Εικόνα 10**)



Εικόνα 10: Επίδραση των υδατικών εκχυλισμάτων της μαντζουράνας, του θυμαριού, του σπαθόχορτου και της ρίγανης στην ανάπτυξη και σποριογονία του *Penicillium* spp. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τρεις επαναλήψεις.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μυκήτων αυτού του γένους, θα μπορούσε επίσης να επιτευχθεί αν στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνταν υψηλότερες συγκεντρώσεις των εν λόγω εκχυλισμάτων, κάτι το οποίο δεν θα ήταν αποδεκτό για όλα τα εκχυλίσματα λόγω της παρατηρούμενης κυτταροτοξικότητας σε υψηλές δόσεις ορισμένων εξ αυτών.*(βλ. Ενότητα VI.2.1 Aspergillus* spp.*)*Σύμφωνα και πάλι με τους Magro et al., το υδατικό εκχύλισμα του χαμομηλιού σε συγκέντρωση 0.92 g/mL αναστέλλει 100% την ανάπτυξη του *Penicillium* spp, ενώ σε συγκέντρωση 0.69 g/mL περισσότερο από 50%. Αναστολή, μικρότερη όμως του 50% παρατηρείται ακόμη και όταν η συγκέντρωση του υδατικού εκχυλίσματος που χρησιμοποιείται είναι ίση με 0.46 g/mL.[83]

Το υδατικό εκχύλισμα της ρίγανης (*Origanum vulgare L*) φαίνεται επίσης να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του *P.digitatum* και *P.italicum*, εμφανίζοντας ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) στα 20 mg/mL, σύμφωνα με τους Ličina et al. Αυτό σημαίνει ότι σε αυτή τη συγκέντρωση εκχυλίσματος παρεμποδίζεται η ανάπτυξη των δύο αυτών στελεχών. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία σε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση εκχυλίσματος (200 μg/μL) παρατηρείται μικρή μόνο παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *P.italicum (βλ.Εικόνα 8).* Αυτό θα μπορούσε να

επεξηγηθεί λόγω του διαφορετικού χρόνου εκχύλισης για την παραλαβή του υδατικού εκχυλίσματος της ρίγανης σε κάθε περίπτωση, καθώς στη μελέτη των Ličina et al. ο χρόνος αυτός ήταν τρία 24ωρα, δηλαδή σημαντικά μεγαλύτερος απ'ότι στην παρούσα εργασία. Επίσης, οι Ličina et al. χρησιμοποίησαν μεγαλύτερη αναλογία δείγματος-διαλύτη για την παρασκευή του υδατικού εκχυλίσματος.[16] Το αιθανολικό εκχύλισμα της ρίγανης φαίνεται επίσης να παρεμποδίζει την ανάπτυξη αυτών των δύο μυκήτων, εμφανίζοντας ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης (MIC) στην ίδια τιμή με το υδατικό, ενώ τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με χρήση ακετόνης, αιθανικού αιθυλεστέρα και διαιθυλαιθέρα φαίνεται να είναι πιο δραστικά, εμφανίζοντας ελάχιστες συγκεντρώσεις παρεμπόδισης (MIC) σε μικρότερες τιμές.[16]

Επιπλέον, τα αιθέρια έλαια αρκετών φυτών έχουν μελετηθεί ως προς τη δράση τους ενάντια σε μύκητες του γένους *Penicillium*. Σύμφωνα με τους Zabka et al., ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις της τάξης του 1 μL/mL τα αιθέρια έλαια φυτών που ανήκουν στις οικογένειες Lamiaceae και Asteraceae, μεταξύ των οποίων και τα αιθέρια έλαια της ρίγανης (*Origanum vulgare L.*), του φασκόμηλου (*Salvia officinalis L.*) και του θυμαριού (*Thymus vulgaris L*) μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη των *P.brevicompactum* και *P.expansum*, με το αιθέριο έλαιο του θυμαριού να επιτυγχάνει ακόμη και 100% παρεμπόδιση της ανάπτυξης του πρώτου, γεγονός το οποίο αποδεικνύει και πάλι την υπεροχή της δράσης των αιθέριων ελαίων συγκριτικά με τα υδατικά εκχυλίσματα.[94]

Όσον αφορά συγκεκριμένα την παρεμπόδιση της σποριογονίας των μυκήτων του συγκεκριμένου γένους, η υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι περιορισμένη, καθώς λίγες μόνο μελέτες επικεντρώνονται σε αυτή. Σύμφωνα με τους Abou-Jawdah et al., τα εκχυλίσματα που παραλαμβάνονται με τη βοήθεια πετρελαϊκού αιθέρα από το φασκόμηλο (*Salvia fruticosa L.*) και την άγρια μαντζουράνα (*Origanum syriacum Sieb.Exs.et L*) σε συγκεντρώσεις 0.2 g/mL μπορούν να παρεμποδίσουν κατά 20 και 100% την σποριογονία του *Penicillium* spp. Το αντίστοιχο μεθανολικό εκχύλισμα της άγριας μαντζουράνας παρεμπόδισε κατά 90% τη σποριογονία του *Penicillium* spp, ενώ του θυμαριού δεν επέδρασε σε αυτή. Στην παρούσα εργασία, διερευνήθηκαν το υδατικό εκχύλισμα διαφορετικής ποικιλίας μαντζουράνας (*Origanum majorana*) στην ίδια συγκέντρωση με αυτή που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη των Abou-Jawdah et al. και δεν φάνηκε να επιδρά ούτε στην ανάπτυξη του μυκηλίου ούτε στη σποριογονία

του *Penicillium* spp. Ωστόσο, στην παρούσα πτυχιακή μελέτη παρουσιάστηκε μικρή επίδραση αυτού του εκχυλίσματος στη σποριογονία του *P.italicum.(βλ. Εικόνες 8,9)* [95]

Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί ότι στην εργασία των Abou-Jawdah et al., τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με τη χρήση πετρελαϊκού αιθέρα παρεμπόδισαν και την ανάπτυξη και του μυκηλίου του *Penicillium* spp., σε αντίθεση με τα εκχυλίσματα που παραλήφθηκαν με τη βοήθεια μεθανόλης.[95] Από τα παραπάνω θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η παρεμπόδιση της σποριογονίας δεν προϋποθέτει απαραίτητα παρεμπόδιση και της ανάπτυξης του μυκηλίου του μύκητα, το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις στην παρούσα εργασία.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διερεύνηση της αντιμυκητιασικής δράσης των υδατικών εκχυλισμάτων των 13 βοτάνων της ελληνικής χλωρίδας έναντι 14 στελεχών μυκήτων, δυνητικά αλλοιογόνων των τροφίμων ή ευκαιριακά παθογόνων του ανθρώπινου οργανισμού, έδειξε ότι τα υδατικά αυτά εκχυλίσματα σε συγκέντρωση 200 μg/μL δεν δύναται να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη των *A.niger, A.parasiticus 15517 ATTC, A.flavus, A.candidus, A.carbonarius και A.flavus.* Δεν δύνανται επίσης να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη του *Rhizopus* spp, ούτε και των *C.albicans, C.lypolitica, C.glabrata, C.parapsilosis και C.krusei/incospicua*. Όσον αφορά το *Penicillium* spp. το υδατικό εκχύλισμα του σπαθόχορτου σε συγκέντρωση 200 μg/μL φαίνεται να επιδρά εν μέρη στην σποριογονία, ενώ όσον αφορά το *P.italicum* συγκεκριμένα, τα υδατικά εκχυλίσματα του θυμαριού, της ρίγανης, της θρύμπας και του δίκταμου σε συγκέντρωση 200 μg/μL φαίνεται να δυσχεραίνουν την ανάπτυξη του μυκηλίου και τη σποριογονία, ενώ τα αντίστοιχα εκχυλίσματα του μελισσόχορτου και της μαντζουράνας φαίνεται να επιδρούν μόνο στη σποριογονία του συγκεκριμένου στελέχους.

Στη πλειοψηφία των δημοσιευμένων ερευνών που αφορούν την αντιμυκητιασική δράση αρωματικών φυτών, τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιούνται παραλαμβάνονται με τη χρήση οργανικών διαλυτών, καθώς αυτοί φαίνεται να μπορούν να εκχυλίζουν αποτελεσματικότερα ενώσεις με αντιμυκητιασική δράση. Σε πολλές έρευνες, επίσης, χρησιμοποιούνται τα αιθέρια έλαια των αντίστοιχων φυτών, λόγω της ικανότητάς τους να διεισδύουν ευκολότερα στις κυτταρικές μεμβράνες των μυκήτων. Όσον αφορά τα υδατικά εκχυλίσματα, η ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ορισμένων μυκήτων παρατηρείται κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτών. Ωστόσο, η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων των βοτάνων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, όρισε ως ασφαλή συγκέντρωση για όλα τα αφεψήματα τα 200 μg/μL. Επιπλέον, η παρατηρούμενη αντιμυκητιασική δράση επηρεάζεται από το χρόνο εκχύλισης. Παρ΄όλα αυτά, ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διαδικασία παρασκευής των υδατικών εκχυλισμάτων να προσομοιώνει όσο το δυνατόν περισσότερο τη διαδικασία κατανάλωσης αυτών των αφεψημάτων από το ευρύ κοινό. Ως εκ τούτου, η εκχύλιση των βοτάνων για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα θα ξέφευγε από τους στόχους της συγκεκριμένης πτυχιακής μελέτης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Strivastava J. LJ, Vietmeyer N.: **Medicinal Plants: An expanding Role in Development**. *World Bank Technical Paper* 1996.
2. Halberstein RA: **Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns**. *Annals of Epidemiology* 2005, **15**(9):686-699.
3. Cowan MM: **Plant products as antimicrobial agents**. *Clinical Microbiology Reviews* 1999, **12**(4):564-582.
4. Ritchie MR: **Use of herbal supplements and nutritional supplements in the UK: What do we know about their pattern of usage?** *Proceedings of the Nutrition Society* 2007, **66**(4):479-482.
5. Craig WJ: **Health-promoting properties of common herbs**. *Am J Clin Nutr* 1999, **70**(3 Suppl):491s-499s.
6. Zheng W, Wang SY: **Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs**. *Journal of agricultural and food chemistry* 2001, **49**(11):5165-5170.
7. Hwang JH, Jin Q, Woo ER, Lee DG: **Antifungal property of hibicuslide C and its membrane-active mechanism in Candida albicans**. *Biochimie* 2013, **95**(10):1917-1922.
8. Σαρλής ΓΠ: **Συστηματική Βοτανική**. *Εκδόσεις Αθαν Σταμούλης* 1991.
9. Κουνδουράκη Χ: **" Συγκριτική μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης αφεψημάτων από ελληνικά βότανα in vitro"**. *Πτυχιακή μελέτη , Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης, Διαιτολογίας και Διατροφής* 2013.
10. Borras-Linares I, Stojanovic Z, Quirantes-Pine R, Arraez-Roman D, Svarc-Gajic J, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A: **Rosmarinus officinalis leaves as a natural source of bioactive compounds**. *Int J Mol Sci* 2014, **15**(11):20585-20606.
11. Kouri G, Tsimogiannis D, Bardouki H, Oreopoulou V: **Extraction and analysis of antioxidant components from Origanum dictamnus**. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2007, **8**(2):155-162.
12. Giweli A, Dzamic AM, Sokovic M, Ristic MS, Marin PD: **Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of Satureja thymbra growing wild in Libya**. *Molecules* 2012, **17**(5):4836-4850.
13. Kohiyama CY, Yamamoto Ribeiro MM, Mossini SAG, Bando E, Bomfim NDS, Nerilo SB, Rocha GHO, Grespan R, Mikcha JMG, Machinski M, Jr.: **Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of Thymus vulgaris L. by Aspergillus flavus Link**. *Food Chemistry* 2014, **173**:1006-1010.
14. Pimple BP, Patel AN, Kadam PV, Patil MJ: **Microscopic evaluation and physicochemical analysis of Origanum majorana Linn leaves**. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2012, **2**(SUPPL2):S897-S903.
15. Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL: **The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (Melissa officinalis L. subsp. officinalis) tea**. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 1998, **72**(5):301-305.
16. Ličina BZ, Stefanović OD, Vasić SM, Radojević ID, Dekić MS, Čomić LR: **Biological activities of the extracts from wild growing Origanum vulgare L**. *Food Control* 2013, **33**(2):498-504.

17. Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona A: **A review of the antibacterial activity of Hypericum perforatum L**. *Journal of Ethnopharmacology* 2010, **131**(3):511-521.
18. **Final report on the safety assessment of Hypericum perforatum extract and Hypericum perforatum oil**. *Int J Toxicol* 2001, **20 Suppl 2**:31-39.
19. Goulas V, Exarchou V, Kanetis L, Gerothanassis IP: **Evaluation of the phytochemical content, antioxidant activity and antimicrobial properties of mountain tea (Sideritis syriaca) decoction**. *Journal of Functional Foods* 2014, **6**(0):248-258.
20. CERASELA ELENA GÎRD IN, TEODORA COSTEA, LIGIA ELENA DUŢU*, MARIA LIDIA POPESCU, NICOLETA CIUPITU: **QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM SALVIA OFFICINALIS L. LEAVES**. *FARMACIA* 2014, **Vol. 62**.
21. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E: **Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (Rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L., Lamiaceae) essential oils**. *Journal of agricultural and food chemistry* 2007, **55**(19):7879-7885.
22. Habiba Boukhebti1 ANC, Hani Belhadj2, Farida Sahli1, Messaoud Ramdhani1, Hocine Laouer1 and Daoud Harzallah2: **Chemical composition and antibacterial activity of Mentha pulegium L. and Mentha spicata L. essential oils**. *Scholars Research Library-Der Pharmacia Lettre* 2011.
23. Singh O, Khanam Z, Misra N, Srivastava MK: **Chamomile (Matricaria chamomilla L.): An overview**. *Pharmacognosy Reviews* 2011, **5**(9):82-95.
24. Roby MHH, Sarhan MA, Selim KA-H, Khalel KI: **Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (Foeniculum vulgare L.) and chamomile (Matricaria chamomilla L.)**. *Industrial Crops and Products* 2013, **44**(0):437-445.
25. Dahech I, Farah W, Trigui M, Hssouna AB, Belghith H, Belghith KS, Abdallah FB: **Antioxidant and antimicrobial activities of Lycium shawii fruits extract**. *International Journal of Biological Macromolecules* 2013, **60**(0):328-333.
26. Dean M, Lähteenmäki L, Shepherd R: **Nutrition communication: consumer perceptions and predicting intentions**. *Proceedings of the Nutrition Society* 2011, **70**(01):19-25.
27. Γ.Αϊβαλάκις ΓΚ, Κ.Φασσέας: **Γενική Βοτανική**. *Εκδόσεις Έμβρυο* 2005.
28. Russell W, Duthie G: **Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids**. *Proceedings of the Nutrition Society* 2011, **70**(03):389-396.
29. Hooper L, Cassidy A: **A review of the health care potential of bioactive compounds**. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006, **86**(12):1805-1813.
30. Fiedor J, Burda K: **Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease**. *Nutrients* 2014, **6**(2):466-488.
31. S A Tanumihardjo and Z Yang: **CAROTENOIDS/Epidemiology of Health Effects**. *University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA* 2005.
32. Tsao R: **Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols**. *Nutrients* 2010, **2**(12):1231-1246.
33. Bravo L: **Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance**. *Nutr Rev* 1998, **56**(11):317-333.

34. Pandey KB, Rizvi SI: **Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease**. *Oxid Med Cell Longev* 2009, **2**(5):270-278.
35. Liu RH: **Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action**. *J Nutr* 2004, **134**(12 Suppl):3479s-3485s.
36. Karakaya S: **Bioavailability of phenolic compounds**. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004, **44**(6):453-464.
37. Scalbert A, Williamson G: **Dietary intake and bioavailability of polyphenols**. *J Nutr* 2000, **130**(8S Suppl):2073s-2085s.
38. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y: **Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention**. *Nutr Cancer* 2010, **62**(1):1-20.
39. Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventos RM: **Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health**. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000, **80**(7):1044-1062.
40. Lacy A, O'Kennedy R: **Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer**. *Curr Pharm Des* 2004, **10**(30):3797-3811.
41. Solorzano-Santos F, Miranda-Novales MG: **Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents**. *Curr Opin Biotechnol* 2012, **23**(2):136-141.
42. Β. Σ: **Αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια**. *Αγροτυπος* 1998.
43. Narayanan BSaCS: **ESSENTIAL OILS/Isolation and Production**. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* 1993.
44. Elstner JGaEF: **ESSENTIAL OILS/Properties and Uses**. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* 2003.
45. Λ.Χ Μαργαρίτης ΒΚΓ, Κ.Ε Κεραμάρης, Ε.Σ Μαρίνος, Ι.Σ Παπασιδέρη, Δ.Ι Στραβοπόδης, Ι.Π τρουγκάκος: **Βιολογία κυττάρου**. *Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας* 2008.
46. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lucking R *et al*: **A higher-level phylogenetic classification of the Fungi**. *Mycol Res* 2007, **111**(Pt 5):509-547.
47. Μπαλατσούρας Γ: **Μικροβιολογία Τροφίμων**. *Εκδόσεις Έμβρυο* 2006.
48. C.J. Alexopoulos CWM, M.Blackwell: **Introductory Mycology** *John Wiley &Sons, INC* 1996.
49. John Webster RWSW: **Introduction to Fungi**. *Cambridge University Press* 2007.
50. GT C: **Basic Biology of Fungi**. *Medical Microbiology 4th edition Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston* 1996.
51. Χ.ΧΡΙΣΤΙΑΣ: **Μυκητολογία**. *Αγροτύπος αε* 1999.
52. John I. Pitt ADH: **Fungi and Food Spoilage**. *Springer ScienceþBusiness Media LLC* 2009.
53. Tournas VH, Katsoudas E: **Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits**. *International Journal of Food Microbiology* 2005, **105**(1):11-17.
54. Tejeswini MG, Sowmya HV, Swarnalatha SP, Negi PS: **Antifungal activity of essential oils and their combinations in in vitro and in vivo conditions**. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection* 2013, **47**(5):564-570.
55. Bhagwat MK, Datar AG: **Antifungal activity of herbal extracts against plant pathogenic fungi**. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection* 2013, **47**(8):959-965.

56. Kauffman CA: **Fungal Infections**. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2006, **3**(1):35-40.
57. Kabak B, Dobson ADW, Var I: **Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2006, **46**(8):593-619.
58. Gemeda N, Woldeamanuel Y, Asrat D, Debella A: **Effect of essential oils on Aspergillus spore germination, growth and mycotoxin production: a potential source of botanical food preservative**. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014, **4**(Suppl 1):S373-381.
59. Yu J, Cleveland TE, Nierman WC, Bennett JW: **Aspergillus flavus genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases**. *Rev Iberoam Micol* 2005, **22**(4):194-202.
60. Bhatnagar-Mathur P, Sunkara S, Bhatnagar-Panwar M, Waliyar F, Sharma KK: **Biotechnological advances for combating Aspergillus flavus and aflatoxin contamination in crops**. *Plant Science* 2015, **234**(0):119-132.
61. Sweeney MJ, Dobson ADW: **Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species**. *International Journal of Food Microbiology* 1998, **43**(3):141-158.
62. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Van Dijck PW: **On the safety of Aspergillus niger--a review**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, **59**(4-5):426-435.
63. Accensi F, Abarca ML, Cano J, Figuera L, Cabañes FJ: **Distribution of ochratoxin A producing strains in the A. niger aggregate**. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 2001, **79**(3-4):365-370.
64. Jiang C, Shi J, Zhu C: **Fruit spoilage and ochratoxin a production by Aspergillus carbonarius in the berries of different grape cultivars**. *Food Control* 2013, **30**(1):93-100.
65. Cabañes FJ, Bragulat MR, Castellá G: **Ochratoxin A producing species in the genus Penicillium**. *Toxins* 2010, **2**(5):1111-1120.
66. Latifa A, Idriss T, Hassan B, Amine SM, El Hassane B, Abdellah ABA: **Effects of organic acids and salts on the development of Penicillium italicum: The causal agent of citrus Blue mold**. *Plant Pathology Journal* 2011, **10**(3):99-107.
67. Pérez-Alfonso CO, Martínez-Romero D, Zapata PJ, Serrano M, Valero D, Castillo S: **The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of Penicillium digitatum and P. italicum involved in lemon decay**. *International Journal of Food Microbiology* 2012, **158**(2):101-106.
68. Yapar N: **Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis**. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2014, **10**(1):95-105.
69. Rodrigues CF, Silva S, Henriques M: **Candida glabrata: A review of its features and resistance**. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2014, **33**(5):673-688.
70. Ford CB, Funt JM, Abbey D, Issi L, Guiducci C, Martinez DA, Delorey T, Li BY, White TC, Cuomo C *et al*: **The evolution of drug resistance in clinical isolates of Candida albicans**. *Elife* 2014, **4**:e00662.
71. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J: **Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance**. *FEMS Microbiology Reviews* 2012, **36**(2):288-305.

72. Yadav JSS, Bezawada J, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY: **Candida krusei: Biotechnological potentials and concerns about its safety**. *Canadian Journal of Microbiology* 2012, **58**(8):937-952.
73. Zinjarde SS: **Food-related applications of Yarrowia lipolytica**. *Food Chemistry* 2014, **152**(0):1-10.
74. da Cruz Cabral L, Fernández Pinto V, Patriarca A: **Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods**. *International Journal of Food Microbiology* 2013, **166**(1):1-14.
75. Bagatela BS, Lopes AP, Fonseca FL, Andreo MA, Nanayakkara DN, Bastos JK, Perazzo FF: **Evaluation of antimicrobial and antimalarial activities of crude extract, fractions and 4-nerolidylcathecol from the aerial parts of Piper umbellata L. (Piperaceae)**. *Nat Prod Res* 2013, **27**(23):2202-2209.
76. Mohd Sayeed Akthar BD, Tanweer Azam: **Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review**. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research Vol2* 2014.
77. Maria A.Passone NSG, Carolina A.Ferrand, Miriam Etcheverry: **Invitro evaluation of five essential oils as botanical fungitoxicants for the pretection of stored peanuts from Aspergillus flavus and A.parasiticus contamination**. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2012.
78. Wilson B, Abraham G, Manju VS, Mathew M, Vimala B, Sundaresan S, Nambisan B: **Antimicrobial activity of Curcuma zedoaria and Curcuma malabarica tubers**. *J Ethnopharmacol* 2005, **99**(1):147-151.
79. Petrovic J, Glamoclija J, Stojkovic DS, Ciric A, Nikolic M, Bukvicki D, Guerzoni ME, Sokovic MD: **Laetiporus sulphureus, edible mushroom from Serbia: investigation on volatile compounds, in vitro antimicrobial activity and in situ control of Aspergillus flavus in tomato paste**. *Food Chem Toxicol* 2013, **59**:297-302.
80. Njateng GS, Gatsing D, Mouokeu RS, Lunga PK, Kuiate JR: **In vitro and in vivo antidermatophytic activity of the dichloromethane-methanol (1:1 v/v) extract from the stem bark of Polyscias fulva Hiern (Araliaceae)**. *BMC Complement Altern Med* 2013, **13**:95.
81. Bonvehi JS, Gutierrez AL: **The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain)**. *World J Microbiol Biotechnol* 2012, **28**(4):1351-1358.
82. Naczk M, Shahidi F: **Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006, **41**(5):1523-1542.
83. Magro A, Carolino M, Bastos M, Mexia A: **Efficacy of plant extracts against stored-products fungi**. *Rev Iberoam Micol* 2006, **23**(3):176-178.
84. Bluma R, Amaiden MR, Etcheverry M: **Screening of Argentine plant extracts: Impact on growth parameters and aflatoxin B1 accumulation by Aspergillus section Flavi**. *International Journal of Food Microbiology* 2008, **122**(1–2):114-125.
85. Giweli A, Džamić AM, Soković M, Ristić MS, Marin PD: **Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils of Satureja thymbra Growing Wild in Libya**. *Molecules* 2012, **17**(5):4836-4850.
86. Passone MA, Girardi NS, Etcheverry M: **Evaluation of the control ability of five essential oils against Aspergillus section Nigri growth and ochratoxin**

A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. *Int J Food Microbiol* 2012, **159**(3):198-206.

87. Almyroudis NG, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Kusne S: **In vitro susceptibilities of 217 clinical isolates of zygomycetes to conventional and new antifungal agents**. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007, **51**(7):2587-2590.
88. Chau AS, Chen G, McNicholas PM, Mann PA: **Molecular Basis for Enhanced Activity of Posaconazole against Absidia corymbifera and Rhizopus oryzae**. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2006, **50**(11):3917-3919.
89. Lopez V, Akerreta S, Casanova E, Garcia-Mina JM, Cavero RY, Calvo MI: **In vitro antioxidant and anti-rhizopus activities of Lamiaceae herbal extracts**. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 2007, **62**(4):151-155.
90. Martha Cristina Portillo-Ruiz RuA-SSa, Sabina Viramontes Ramos, Jos´e Vinicio Torres Mu˜noz,and Guadalupe Virginia Nev´arez-Moorill´on: **Antifungal Effect of Mexican Oregano (Lippiaberlandieri Schauer) Essential Oil on a WheatFlour-Based Medium**. *M: Food Microbiology& Safety*.
91. Hassawi D, Kharma A: **Antimicrobial activity of some medicinal plants against Candida albicans**. *Journal of Biological Sciences* 2006, **6**(1):109-114.
92. Martins N, Ferreira ICFR, Barros L, Carvalho AM, Henriques M, Silva S: **Plants used in folk medicine: The potential of their hydromethanolic extracts against Candida species**. *Industrial Crops and Products* 2015, **66**(0):62-67.
93. Naeini A, Khosravi AR, Chitsaz M, Shokri H, Kamlnejad M: **Anti-Candida albicans activity of some Iranian plants used in traditional medicine**. *Journal de Mycologie Medicale* 2009, **19**(3):168-172.
94. Zabka M, Pavela R, Slezakova L: **Antifungal effect of Pimenta dioica essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi**. *Industrial Crops and Products* 2009, **30**(2):250-253.
95. Abou-Jawdah Y, Sobh H, Salameh A: **Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi**. *Journal of agricultural and food chemistry* 2002, **50**(11):3208-3213.