



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΚΑΘ. Ι. ΧΗΝΟΥ

Φυτοχημική ανάλυση αιθερίων ελαίων :

- 7 Ελληνικών υβριδίων *Citrus* sp. (περικορπίων, φύλλων) και
- Επιλεγμένων δειγμάτων *Pimpinella anisum*



Διπλωματική Εργασία

ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής που δέχθηκε να κρίνει την εργασία μου:

- Καθ. Ι. Χήνου (Επιβλέπουσα)
- Καθ. Ε. Σκαλτσά
- Ομ. Καθ. Γ. Καρίκας

Ευχαριστώ θερμά

- Την Καθηγήτρια κα Ι Χήνου, για την επιλογή του θέματος, την συνεχή επιστημονική καθοδήγηση και υποστήριξη της κατά την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας , που μου άνοιξε νέους επιστημονικούς δρόμους.
- Την Δρα κα Κ Γκραικού, για την πολύτιμη βοήθεια της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας και τις υποδείξεις της στο εργαστήριο.
- Τους Γεωπόνους κα Θ. Αγοραστού και κ. Ν. Δρέττα καθώς και την Φυσικό κα Μ. Παπαδάκη του Δενδροκομικού Σταθμού Πόρου που μας προμήθευσε τα επτά υβρίδια εσπεριδοειδών που μελετήθηκαν στη παρούσα εργασία.
- Τον Φαρμακοποιό κ. Α. Βαρβαγιάννη που μας προμήθευσε τα δείγματα γλυκανίσου από το Λισβόρι Λέσβου.
- Τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Γ. Κούρτη και Ε. Βαρβούνη, για την πολύτιμη βοήθειά τους και την δημιουργία ευχάριστου κλίματος στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τη φίλη μου και μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ε. Σταυράκη που ήταν δίπλα μου στη διεκπεραίωση της διπλωματικής μου εργασίας.
- Την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την υποστήριξη που μου παρείχαν.

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελεί:

A. Στα πλαίσια προηγούμενων φυτοχημικών μελετών της ερευνητικής ομάδας της Καθ Ι Χήνου (του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων) σε ελληνικά εσπεριδοειδή (λεμόνια, πορτοκάλια) (Λέκκας, 2005) όπως και σε ελληνικές ποικιλίες κουμκουάτ (Κονταράτου, 2008) συνεχίζεται η φυτοχημική έρευνα σε επιλεγμένες ποικιλίες σε συνεργασία με το Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου, που αποτελεί κέντρο πρότυπων καλλιεργειών εσπεριδοειδών στη χώρα. Για το παραπάνω λόγω σχεδιάστηκε η συγκριτική χημική μελέτη των αιθέριων ελαίων επτά (7) επιλεγμένων και πλήρως ταυτοποιημένων υβριδίων εσπεριδοειδών (περικαρπίων και φύλλων) του Δενδροκομικού Σταθμού Πόρου (όπως περιγράφονται παρακάτω), καθώς και η αξιολόγηση των βιολογικών τους δράσεων και της δυνητικής περαιτέρω χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων.

1. *Citrus paradisi* cv Star Ruby x νερατζιά (*Citrus aurantium* L.)
2. *Citrus sinensis* cv New Hall x citrumelo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*)
3. *Citrus sinensis* cv New Hall x trifoliata
4. *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x citrumelo
5. *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x trifoliata
6. *Citrus grandis* cv Cuba Shaddock x trifoliata
7. *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία κανένα από τα παραπάνω υβρίδια δεν έχει αναλυθεί προηγουμένως. Ειδικότερα, τα υβρίδια *Citrus paradisi* cv Star Ruby x *C. aurantium* (Cimen *et al.*, 2016), *Citrus sinensis* cv New Hall x trifoliata (Guidong *et al.*, 2011), *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata (Lee *et al.*, 2009; Wutscher *et al.*, 1999) έχουν μελετηθεί προηγούμενα μόνον γεωπονικά ως προς τα χαρακτηριστικά και την απόδοσή τους κατά τη φύτευση. Έχουν αναλυθεί 45 συστατικά μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS) από τα οποία το λιμονένιο βρίσκεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, ακολουθούμενο από τα β-πινένιο, μυρκένιο, γ-τερπινένιο και βαλενσένιο.

B. Συγκριτική μελέτη της χημικής σύστασης των αιθέριων ελαίων τριών (3) Ελληνικών δειγμάτων *Pimpinella anisum*: Λισβορίου (Λέσβου), Βόλου (Θεσσαλίας) και Λιβαδειάς (Βοιωτίας) σε σύγκριση με δείγμα της ελληνικής αγοράς Τούρκικης προέλευσης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. Η συγκριτική μελέτη της χημικής σύστασης των αιθέριων ελαίων επτά (7) ταυτοποιημένων υβριδίων εσπεριδοειδών που καλλιεργούνται στον Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου που αποτελεί πρότυπο κέντρο καλλιέργειας εσπεριδοειδών της χώρας, καθώς και η αξιολόγηση των βιολογικών τους δράσεων με δυνητική περαιτέρω χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων.

- *Citrus paradisi* cv Star Ruby x νερατζιά (*Citrus aurantium* L.)
- *Citrus sinensis* cv New Hall x citrumelo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*)
- *Citrus sinensis* cv New Hall x trifoliata
- *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x citrumelo
- *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x trifoliata
- *Citrus grandis* cv Cuba Shaddock x trifoliata
- *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata

Όλα τα αιθέρια έλαια παραλήφθηκαν με ψυχρή έκθλιψη από τα περικάρπια και με υδραπόσταξη από τα φύλλα των εσπεριδοειδών και υποβλήθηκαν σε αναλύσεις με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Πραγματοποιήθηκε επίσης, απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών τους, πολυμεθοξυφλαβονοειδών από τα *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata και *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x citrumelo, ενώ από το δεύτερο απομονώθηκε και ένα λιπαρό οξύ.

Παρατηρήθηκε ότι τα πτητικά συστατικά που ανιχνεύθηκαν βρίσκονται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν άλλα είδη του γένους *Citrus*.

Στα 7 **περικάρπια** που μελετήθηκαν φυτοχημικά ταυτοποιήθηκε μεγάλο ποσοστό τερπενίων. Έχουν αναλυθεί 45 συστατικά μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS) από τα οποία το λιμονένιο βρίσκεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, ακολουθούμενο από τα β-πινένιο, μυρκένιο, γ-τερπινένιο και βαλενσένιο.

Επίσης παρατηρήθηκε η ύπαρξη **κουμαρινών** (auraptene, 7-methoxy-8-(2-oxo-3-methylbutyl) coumarin και osthole) από περικάρπια συγκεκριμένων υβριδίων καθώς επίσης και **πολυμεθοξυφλαβονών** στα 5 από τα 7 δείγματα *Citrus* που μελετήθηκαν εκτός των *Citrus sinensis* cv New Hall x trifoliata και *Citrus grandis* cv Cuba Shaddock x trifoliata.

Έγινε επίσης απομόνωση και φασματοσκοπική ταυτοποίηση φλαβονοειδών και ειδικότερα **πολυμεθοξυφλαβονοειδών** (sinensetin, nobiletin και μεθόξυ παράγωγά τους) από τα περικάρπια των υβριδίων *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x citrumelo και *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata. Επιλέχθηκαν τα παραπάνω υβρίδια λόγω επαρκούς ποσότητας αιθερίου ελαίου (30.5 mg και 15.1 mg αντίστοιχα).

2. Επίσης, έγινε χημική ανάλυση με ανάλογη μέθοδο (GC-MS) των αιθερίων ελαίων τριών (3) ελληνικών δειγμάτων γλυκανίσου (*Pimpinella anisum*) Λισβορίου (Λέσβου), Βόλου (Θεσσαλίας) και Λιβαδειάς (Βοιωτίας) και ενός δείγματος της ελληνικής αγοράς, Τούρκικης προέλευσης. Τα αιθέρια έλαια παραλήφθηκαν με υδραπόσταξη από νωπά σπέρματα των δειγμάτων κονιοποιημένων πριν την απόσταξη.

Στα πλαίσια των ελέγχων βέλτιστης απόδοσης και ποιότητας του αιθερίου ελαίου, ποσότητες γλυκανίσου από το Λισβόρι Λέσβου υποβλήθηκαν σε υδραπόσταξη σε τρεις διαφορετικούς χρόνους (1h, 2h και 3h αντίστοιχα). Προσδιορίστηκε, ως βέλτιστη, η 1 ώρα απόσταξης στην οποία η απόδοση του ελαίου ήταν και η μεγαλύτερη (80ml/kg). Μετά την διατήρηση των δειγμάτων γλυκανίσου Λισβορίου σε θερμοκρασία δωματίου για ένα έτος, επαναλήφθηκαν οι αποστάξεις και προσδιορίστηκε η μείωση της απόδοσής τους.

Ο συνολικός αριθμός συστατικών στα δείγματα αιθερίων ελαίων που αναλύθηκαν κυμάνθηκε από 18-38, στο αιθέριο έλαιο γλυκάνισου Λιβαδειάς βρέθηκαν 38 συστατικά, στα δείγματα από το Λισβόρι Λέσβου (19-26), του Βόλου (18) και της Τουρκίας (30).

Επιπλέον, από το δείγμα αιθερίου ελαίου Λισβορίου απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν φασματοσκοπικά οι δυο κύριες ενώσεις trans-ανηθόλη και γ-himachalene σε μίγμα με α- και β-himachalene.

ABSTRACT

In the framework of our studies on Greek *Citrus* hybrids, we report here in the chemical analyses of the essential oils from cold pressed peels and hydrostillated leaves of 7 selected Greek Citrus hybrids as referred below:

one grapefruit [*Citrus paradisi* cv Star Ruby x *Citrus aurantium*],

four oranges

[*Citrus sinensis* cv Newhall x citrumelo,

C. sinensis cv Newhall x trifoliata,

C. sinensis cv Valencia Porou x citrumelo,

C. sinensis cv Valencia Porou x trifoliata],

one pomelo [*C. grandisi* cv Cuban shaddock x trifoliata] and

one mandarin [*Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata]

All cultivated in the Arboricultural Station of Poros island, which to our knowledge (international literature) have never been studied before.

All volatiles have been analyzed through GC-MS and 45 constituents were identified among which limonene appeared as the most abundant compound, followed by: β -pinene, myrcene, γ -terpinene and valencene. Moreover, from the endemic orange hybrids *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata και *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόπου x citrumelo, several polymethoxyflavones (sinensetin, nobiletin and their methoxy derivatives) were isolated and structurally determined by modern spectral means.

2. Chemical analyses were carried out (GC-MS) on the essential oils of three Greek anise samples (*Pimpinella anisum*) from Lisvori (Lesvos island), Volos (Thessaly) and Livadia (Viotia) in comparison with a sample of the Greek market of Turkish origin. The essential oils were obtained by hydrostillation from the fresh seed samples, comminuted just before distillation.

Samples (same quantity) of Lesvos samples were distilled at three different duration time (1h, 2h and 3h respectively), in order to compare and find out the optimal time of distillation according to the oil yield. It has been proposed as optimal, 1 hour distillation where the oil yield was 80ml/kg.

Moreover, from the oil sample of Lesvos the two most important compounds trans-anethole and γ -himachalene in a mixture with α - and β -himachalene were isolated and structurally determined by modern spectral means.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	1
Σκοπός Μελέτης	3
Περίληψη	5
Abstract.....	7
Περιεχόμενα.....	9

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ: Εσπεριδοειδή

Κεφάλαιο 1: Γενικό Εισαγωγικό Μέρος

1.1 Δρογοβοτανική.....	15
1.1.1 Χαρακτηριστικά της οικογένειας Rutaceae.....	15
1.1.2 Μορφολογία του γένους <i>Citrus</i>	17
1.2 Καλλιεργούμενα είδη και ποικιλίες.....	21
1.2.1 Πορτοκαλιά.....	21
1.2.2 Μανταρινιά.....	26
1.2.3 Φράπα.....	26
1.2.4 Γκρέιπφρουτ.....	27
1.3 Νέες ποικιλίες <i>Citrus</i>	27
1.4 Δρογοϊστορία.....	30
1.4.1 Αναφορές και χρήσεις των εσπεριδοειδών κατά την αρχαιότητα.....	31
1.4.2 Τα εσπεριδοειδή στην παραδοσιακή ιατρική του Νέου Κόσμου.....	34
1.5 Χημική σύσταση εσπεριδοειδών.....	36
1.6 Αιθήρια έλαια.....	42
1.6.1 Αιθήρια έλαια από τους καρπούς των εσπεριδοειδών.....	42
1.6.2 Αιθήρια έλαια από τα άνθη των εσπεριδοειδών.....	43
1.6.3 Αιθήρια έλαια από τα φύλλα και τους βλαστούς των εσπεριδοειδών.....	43
1.6.4 Αιθήρια έλαια κίτρου.....	43
1.6.5 Αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού.....	44
1.6.6 Αιθέριο έλαιο γκρέιπφρουτ.....	44
1.7 Δρογοχημεία αιθερίων ελαίων.....	45
1.8 Ελληνικά υβρίδια εσπεριδοειδών Δενδροκομικού Σταθμού Πόρου.....	50

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό.....	54
2.2 Μέθοδοι παραλαβής των αιθερίων ελαίων	54
2.3 Χρωματογραφικός διαχωρισμός	55
2.3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC).....	55
2.3.2 Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (PREP-TLC).....	55
2.4 Μέθοδοι Ανάλυσης.....	55
2.4.1 Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	55
2.4.2 Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROMETRY, NMR) για τη μελέτη της σχέσης δομής-δραστικότητας.....	56

Κεφάλαιο 3: Φυτοχημική Ανάλυση των Εσπεριδοειδών

3.1 Απομόνωση με χρωματογραφικές τεχνικές.....	57
3.2 Ανάλυση αιθερίων ελαίων περικαρπίων με Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας (GC-MS).....	58
3.3 Συμπεράσματα από την χημική ανάλυση των αιθερίων ελαίων των περικαρπίων των επιλεγμένων ελληνικών υβριδίων εσπεριδοειδών.....	77
3.4 Συμπεράσματα από την χημική ανάλυση των αιθερίων ελαίων των φύλλων των μελετηθέντων εσπεριδοειδών.....	78
3.5 Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών των υβριδίων O-CiSin4 και Mant7.....	80
3.5.1 Ταυτοποίηση με φασματοσκοπία NMR – O-CiSin4.....	80
Συμπεράσματα.....	101
Βιβλιογραφία.....	103

ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ: Γλυκάνισος

Κεφάλαιο 1: Γενικό Εισαγωγικό Μέρος

1.1 Φαρμακευτικά-Αρωματικά Φυτά (Φ.Α.Φ).....	113
1.1.1 Τα κυριότερα αυτοφυή ή/και καλλιεργούμενα Φ.Α.Φ στην Ελλάδα.....	115
1.2 Δρογοβοτανική.....	116
1.3 Δρογοϊστορία.....	119
1.4 Δρογοχημεία.....	121
1.5 Δρογοφαρμακολογία.....	124
1.5.1 Μονογραφία του αιθερίου ελαίου γλυκάνισου από τον EMA (Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων).....	124
1.5.2 Ενδείξεις χρήσης του αιθερίου ελαίου.....	124
1.6 Βιβλιογραφικά δεδομένα για το αιθέριο έλαιο γλυκάνισου.....	127

Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό.....	131
2.2 Μέθοδοι παραλαβής των αιθερίων ελαίων	131
2.3 Χρωματογραφικός διαχωρισμός	131
2.3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC).....	131
2.3.2 Χρωματογραφία στήλης (Column Chromatography).....	131
2.4 Μέθοδοι Ανάλυσης.....	132

Κεφάλαιο 3: Φυτοχημική Ανάλυση του Γλυκάνισου

3.1 Ανάλυση αιθερίων ελαίων γλυκάνισων με Αέρια Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μάζας (GC-MS).....	133
3.2 Διαχωρισμός και απομόνωση κύριων συστατικών.....	145
3.3 Φασματοσκοπική μελέτη των απομονωμένων συστατικών.....	147

Συμπεράσματα.....	154
--------------------------	------------

Βιβλιογραφία.....	156
--------------------------	------------

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ

Χημική ανάλυση αιθερίων ελαίων 7 Ελληνικών υβριδίων *Citrus* (περικαρπίων, φύλλων)

Κεφάλαιο 1 Γενικό Εισαγωγικό Μέρος

1.1 Δρογοβοτανική

1.1.1 Χαρακτηριστικά της οικογένειας Rutaceae

Σύμφωνα με τον Scora (1988) όλα τα είδη των εσπεριδοειδών που μας είναι γνωστά σήμερα, προέρχονται από τα είδη: *Citrus maxima* ή *Citrus grandis*, πόμελο που έχουν τις ρίζες τους στη Μαλαισία και το πέλαγος Μαλάι, *Citrus medica* (κίτρο) που προέρχεται από την Ινδία, *Citrus reticulata* (μανταρίνι) από την Κίνα, καθώς και *Citrus balimii*, που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και προέρχεται από την Ταϊλάνδη και τη Μαλαισία. Όλα τα υπόλοιπα γνωστά είδη εσπεριδοειδών προέρχονται από διασταυρώσεις των προαναφερθέντων βοτανικών ειδών και διακρίνονται σε μονοεμβρυικά και πολυεμβρυικά:

- Το πορτοκάλι (*Citrus sinensis*) και το νεράντζι (*Citrus aurantium*) θεωρούνται υβρίδια του πόμελο με μανταρίνι (*C. grandis* x *Citrus reticulata*)
- Τα γλυκολέμονα (limes, *Citrus aurantifolia*) και το λεμόνι (*Citrus lemon*) προέρχονται από τον υβριδισμό του κίτρου *Citrus medica*, με κάποια αρχέγονα, μη εμπορικής σημασίας, είδη από την Ασία .
- Το κουμκουάτ (*Fortunella spp*) προέρχεται από το μανταρίνι (*Citrus reticulata*).
- Το γκρέιπφρουτ (*Citrus paradisi*) αποτελεί υβρίδιο του πόμελο (*C. grandis*).

Τα εσπεριδοειδή ανήκουν στην οικογένεια Rutaceae (Εικ. 1.1), όπου περιλαμβάνονται κυρίως αειθαλή φυτά, δένδρα ή θάμνοι με κλαδιά αγκαθωτά. Η οικογένεια είναι πολυπληθέστατη, περιλαμβάνοντας 400 γένη και περίπου 3.500 είδη (Ortiz, 2002) ενώ ταξινομείται κατά Nicolosi (2007) σε επτά υποοικογένειες:

Rutoideae, Dictyolomatoideae, Flindersioideae, Seathelioideae, Toddalioideae, Aurantioideae, και Rhabdondreoideae.

Τα εσπεριδοειδή ανήκουν στην υποοικογένεια Aurantioideae, διαιρούμενη περαιτέρω σε δυο φυλές: την προγενέστερη Clauseneae με 5 γένη και την νεώτερη φυλογενετικά Citreae με 28 γένη.

Στη φυλή Citreae ανήκει η υποφυλή Citrinae στην οποία περιλαμβάνονται τα γένη *Citrus*, *Fortunella* και *Poncirus* που είναι προφανές ότι συνδέονται στενά, και καλλιεργούνται από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα (Ortiz, 2002).



Εικόνα 1.1 Οικογένεια Rutaceae

- Γένος *Fortunella*

Στο γένος αυτό, ανήκουν βρώσιμοι καρποί μικρού μεγέθους, σχήματος ωσειδούς ή σφαιρικού, γνωστό ως κουμκουάτ που θεωρείται το πιο ανθεκτικό στο ψύχος είδος εσπεριδοειδών. Το γένος αυτό, σύμφωνα με τον Swingle, χωρίζεται σε δυο υπογένη: *Eufortunella* (*F. margarita*, *F. japonica*, *F. polyandra*) και *Protocitrus* (*F. hindsii*) (Nicolosi, 2007).

- Γένος *Poncirus*

Πρόκειται για ένα μονοτυπικό γένος (περιλαμβάνει μόνο ένα είδος), το *Poncirus trifoliata* (L.) Raf, ή *trifoliata* ή *trifoliata orange*. Το δένδρο είναι ακανθώδες, φυλλοβόλο με εξαιρετική αντοχή στο ψύχος. Χρησιμοποιείται κυρίως σαν ρίζωμα για τα καλλιεργούμενα εσπεριδοειδή καθώς και σαν υποκείμενο σε προγράμματα αναπαραγωγής άλλων *Citrus*. Οι καρποί του έχουν πολύ πικρή γεύση και γι' αυτό είναι μη βρώσιμοι, ενώ δυνητικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνον στην παρασκευή μαρμελάδων (Nicolosi, 2007).

- Γένος *Citrus*

Με την ταξινόμηση των εσπεριδοειδών (*Citrus*) ασχολήθηκαν κυρίως δυο επιστήμονες, ο Tanaka και ο Swingle.

Η βάση του «συστήματος Tanaka» είναι να παρέχει ξεχωριστό όνομα για κάθε ποικιλία, ανεξάρτητα από το αν είναι καθαρό ή υβρίδιο δύο ή περισσότερων ειδών ή ποικιλιών (Barrett and Rhodes, 1976). Σύμφωνα με το σύστημα κατάταξης Tanaka, το γένος *Citrus* χωρίζεται σε δυο υπογένη: *Archicitrus* και *Metacitrus*. Στα δυο υπογένη ανήκουν 157 είδη, 109 στο πρώτο και 48 στο δεύτερο. Αυτό το σύστημα είναι αρκετά πολύπλοκο και συνήθως ακολουθείται από εκείνο του Swingle.

Το «σύστημα Swingle» λειτουργεί διαφορετικά, γιατί κατατάσσει πρώτα το γένος *Citrus* σε είδος, δεύτερον το διαιρεί περαιτέρω σε ποικιλίες και τελικά το χωρίζει περαιτέρω σε ποικιλίες ή υβρίδια. Έτσι, ο Swingle χωρίζει το γένος *Citrus* σε δυο υπογένη: *Citrus* ή *Eucitrus* και *Papeda*. Το υπογένος *Citrus* ή *Eucitrus* περιλαμβάνει όλα τα καλλιεργούμενα είδη εσπεριδοειδών που χαρακτηρίζονται από εδώδιμο καρπό ή χυμό με γεύση γλυκιά ή υπόξινη και αρωματική και με χαρακτηριστική πικράδα ή μη. Το υπογένος *Papeda* περιλαμβάνει είδη με καρπό πολύ μικρού μεγέθους, μη εδώδιμο (Ziegler, 2007).

1.1.2 Μορφολογία του γένους *Citrus*

Η παραγωγή και η συγκέντρωση του χυμού των εσπεριδοειδών οδηγεί σε παραλαβή προϊόντων όπως: το αιθέριο έλαιο του περικαρπίου και την υδατική φάση. Το αιθέριο έλαιο του περικάρπιου αποτελεί το κύριο προϊόν. Διατίθεται στο εμπόριο ως «αιθέριο έλαιο ψυχράς έθλιψης» λόγω της διαδικασίας παραλαβής μετά από έκθλιψη «εν ψυχρώ». Το «αιθέριο έλαιο ψυχράς έθλιψης» από το περικάρπιο προέρχεται από τους ελαιώδεις αδένες του περικαρπίου των εσπεριδοειδών (Ziegler, 2007).

Το χαρακτηριστικό άρωμα οφείλεται στα αιθέρια έλαια, του περικαρπίου, ενώ το χρώμα των καρπών στα καροτένια, τη χλωροφύλλη και τις κίτρινες φλαβόνες (Καραουλάνης, 2003).

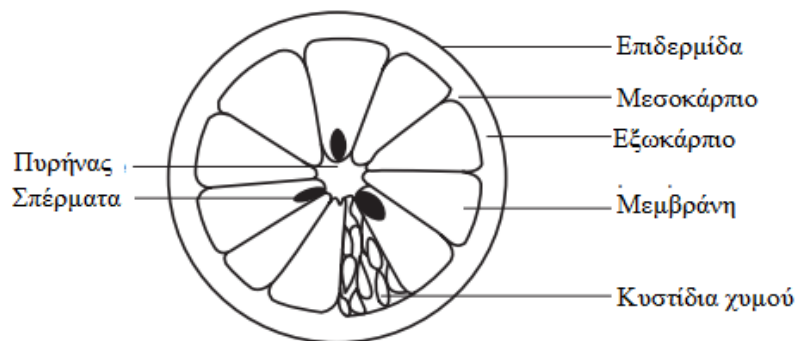
Στο εξωτερικό τμήμα του περικαρπίου των εσπεριδοειδών υπάρχει η επιδερμίδα (εφυμενίδα), που προστατεύει τον καρπό από απώλεια νερού και είσοδο μικροοργανισμών. Η επιδερμίδα μειώνει τον ρυθμό εξάτμισης των φυτικών κυττάρων από 3.6 έως 0.14 mg/cm²/Pa/h. Η απώλεια νερού ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του φρούτου, και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Wills *et al.*, 1998). Το τμήμα αυτό του περικαρπίου σε πολλούς καρπούς, είναι εμποτισμένο με κερί και έχει δομή περίπλοκη που αποτελείται κυρίως από εστέρες (66%), αλκοόλες, αλδεΐδες,

κετόνες κ.α (Freeman, 1978). Το περικάρπιο αποτελείται από το εξωκάρπιο (flavedo, flavus=κίτρινο) και το μεσοκάρπιο (albedo, albus=λευκό) (Εικ. 1.2). Το εξωκάρπιο είναι το έγχρωμο τμήμα του περικαρπίου που περιέχει χλωροφύλλη και σταδιακά με την ωρίμανση σχηματίζονται καροτένια, ξανθοφύλλες, βιταμίνη C, νερό, οξέα, φλαβόνες καθώς και αιθέρια έλαια (Ljubesic, 1984; Καραουλάνης, 2003). Περιέχει πολυάριθμους ελαιώδεις σάκκους ή αδένες γεμάτους αιθέρια έλαια με σημαντική εμπορική αξία.

Το μεσοκάρπιο, το λευκό σπογγώδες τμήμα, αποτελείται από παρεγχυματικά κύτταρα με μεγάλους χώρους αέρα και βρίσκεται ακριβώς κάτω από το flavedo. Αυτό είναι ένα εξαιρετικά αποτελεσματικό υλικό προστασίας από την πίεση και τα τυχόν χτυπήματα των καρπών. Τα βασικά του συστατικά είναι οι κυτταρίνες, ημικυτταρίνες και οι πηκτίνες κατά περίπου 20%. Οι ιστοί του είναι χαλαρά συνδεδεμένοι και όταν αποφλοιώνεται ο καρπός μέρος αυτού παραμένει επάνω στο εδώδιμο τμήμα (Ladaniya, 2008).

Στην υποδερμίδα, που βρίσκεται αμέσως κάτω από το επιδερμικό στρώμα, περιέχονται οι αδένες ελαίου. Το μέγεθος των ελαιωδών αδένων κυμαίνεται από 10 έως 100 μm. Τα τερπένια (κυρίως λιμονένιο) και τα σεσκιτερπένια σε αυτούς τους αδένες δίνουν χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση στους καρπούς των διαφόρων ειδών εσπεριδοειδών. Το δέρμα των περισσότερων εσπεριδοειδών γενικά είναι μη βρώσιμο, κυρίως λόγω του ελαίου. Ωστόσο, ο φλοιός των κουμκουάτ είναι γλυκός και μπορεί να τρώγεται μαζί με τον πολτό (Fritz, 1970).

Το ενδοκάρπιο (εδώδιμο τμήμα) αποτελείται από τα ασκίδια ή κυστίδια. Κάθε ασκίδιο αποτελείται από ένα μίσχο, την επιδερμίδα και μεγάλα πολυεδρικά κύτταρα που φέρουν επίσης μεγάλα χυμοτόπια. Στο ενδοκάρπιο υπάρχουν και τα σέπτα ή μεμβράνες των καρπόφυλλων, στο εσωτερικό των οποίων βρίσκονται τα σπέρματα. Ο αριθμός των σπερμάτων ποικίλει, ανάλογα με το είδος και την ποικιλία και από το αν ο καρπός είναι παρθενοκαρπικός ή σπερμοφόρος. Σε κάθε σπέρμα βρίσκεται ένα ή περισσότερα έμβρυα και αυτό εξαρτάται από το είδος και την ποικιλία (Garcia and Garcia-Martinez, 1984).



Εικόνα 1.2 Καρπός *Citrus* και ονομαστικά τα επιμέρους τμήματα

Η αρχική ρίζα βλασταίνει από ένα γονιμοποιημένο σπόρο σε ευθεία προς τα κάτω και, αν δεν παρεμποδιστεί, γίνεται πασαλώδης. Άλλες ρίζες είναι πλάγιες ή ρίζες-σκαπανείς. Και τα δύο είδη κύριων ριζών διακλαδίζονται, διαμορφώνοντας εν τέλει ινώδες ριζικό σύστημα. Από τις ρίζες των εσπεριδοειδών λείπουν ελαιώδεις αδένες και γενικά έχουν λίγα ριζικά τριχοειδή.

Η μορφή του κορμού και του ύψους του εσπεριδοειδούς προσδιορίζεται από ποικίλους παράγοντες, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται η συμπεριφορά του υβριδίου, του ριζικού υλικού, του διαστήματος μεταξύ των δέντρων και της ηλικίας τους, των πρακτικών κλαδέματος, του βαθμού ανάπτυξης που προκύπτει από το πότισμα και τη θρέψη, και την προέλευση του μοσχεύματος (Εικ. 1.3).



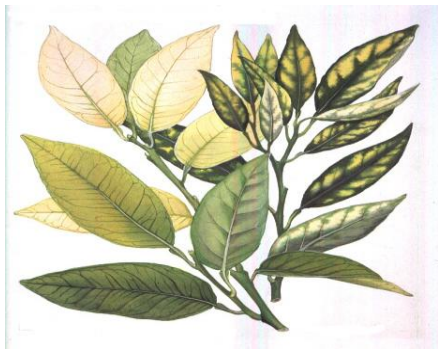
Εικόνα 1.3 Δένδρο εσπεριδοειδών

Τα φύλλα των εσπεριδοειδών, παρόλο που είναι αιιθαλή, πέφτουν, αφού παραμείνουν πάνω στο δένδρο περίπου 17-24 μήνες. Τα φύλλα πέφτουν σταδιακά, ανάλογα με την ηλικία τους, καθ' όλη την διάρκεια του έτους. Το μέγεθος τους ποικίλει ανάλογα με το είδος ενώ οι μίσχοι τους φέρουν μεγάλα, μικρά ή στερούνται πτερυγίων, γώρισμα που μαζί με το μέγεθος,

αποτελούν βασικά χαρακτηριστικά αναγνώρισης των διαφορετικών ειδών στα εσπεριδοειδή (Πρωτοπαπαδάκης, 1992).

Τα φύλλα των εσπεριδοειδών φέρουν ελαιοφόρους αδένες, στους οποίους περιέχονται αιθέρια έλαια, με κυριότερες ενώσεις τα μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, τη φυτόλη, φυτοστερόλες κ.α. που ελευθερώνονται μόνον μετά από πρόκληση ζημίας του αδένα ή μετά από πίεση. Η σύσταση των αιθέριων ελαίων επηρεάζεται κυρίως από την ηλικία του φύλλου (Εικ. 1.4) (Kazuhito *et al.*, 1990).

Στις μασχάλες των φύλλων σχηματίζονται οφθαλμοί που καλύπτονται από λέπια. Σε κάθε μασχάλη φύλλου υπάρχουν περισσότεροι από ένας οφθαλμοί, που καθένας μπορεί να εξελιχθεί σε έναν ή περισσότερους βλαστούς, σε ένα άνθος ή ταξιανθία ή και να παραμείνει σε λανθάνουσα κατάσταση (Ortiz, 2002).



Εικόνα 1.4 Φύλλα *Citrus*

Τα άνθη των εσπεριδοειδών χαρακτηρίζονται από το ευχάριστο άρωμα τους και από το ωραίο τους χρώμα, λευκό ή λευκοϊώδες (Εικ. 1.5). Τα άνθη φέρονται μονήρη ή σε ταξιανθία κύματος, στην κορυφή των βλαστών του τελευταίου κύματος βλάστησης, ή του παρελθόντος έτους, ή στις μασχάλες των φύλλων της τρέχουσας βλάστησης. Το μέγεθος των ανθέων ποικίλει ανάμεσα στα είδη είναι υπόγυνο και φέρει 20-40 στήμονες ενωμένους στη βάση (κατά δέσμες). Τα σέπαλα είναι ενωμένα υπό μορφή δίσκου, τα πέταλα (4-5) είναι παχιά, λευκά ή λευκοϊώδη, ενώ στη βάση της στεφάνης υπάρχει το νεκτάριο όπου παράγεται το νέκταρ. Η ωοθήκη είναι πολύχωρη και φέρει 8 με 14 καρπόφυλλα. Τα άνθη των εσπεριδοειδών είναι κατά κανόνα ερμαφρόδιτα, όταν όμως παρατηρείται έλλειψη ψευδαργύρου (Zn) τότε παράγονται ατελή άνθη (Ortiz, 2002).



Εικόνα 1.5 Άνθη *Citrus*

Μεταξύ των εσπεριδοειδών άλλα έχουν σπόρια και άλλα όχι. Το εξωτερικό περίβλημα του σπόρου είναι παχύ, κιτρινωπό και με χιτώνες, ενώ το εσωτερικό είναι μεμβρανώδες και λεπτό. Μέσα στο σπόρο υπάρχει το έμβρυο που όσο βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση παίρνει όλα τα απαραίτητα για την επιβίωσή του συστατικά από τις κοτυληδόνες (Okunowo *et al.*, 2013).

1.2 Καλλιεργούμενα είδη και ποικιλίες

1.2.1 Πορτοκαλιά

Το πορτοκάλι (*C. sinensis*) αποτελεί τα 2/3 της συνολικής παραγωγής εσπεριδοειδών. Σήμερα, στις διάφορες πορτοκαλο-παραγωγές χώρες καταβάλλονται προσπάθειες περιορισμού του αριθμού των ποικιλιών σε δύο έως τρεις, διαφορετικής εποχής ωριμάνσεως (πρώιμη, μεσοπρώιμη και όψιμη). Η προσπάθεια αυτή ξεκίνησε από την Καλιφόρνια των ΗΠΑ, όπου καλλιεργούνται οι ποικιλίες Merlin και Valencia, και έχει σήμερα υιοθετηθεί από πολλές χώρες. Υπάρχει σημαντικός αριθμός ποικιλιών πορτοκαλιάς, οι οποίες κατατάσσονται σε τέσσερις ομάδες (Proteggente *et al.*, 2003).

- ❖ Ομφαλοφόρες ποικιλίες
- ❖ Αιματόχρωμες ποικιλίες
- ❖ Γλυκόχυμες ποικιλίες
- ❖ Κοινά πορτοκάλια

1.2.1.1 Ομφαλοφόρες ποικιλίες

Τα ομφαλοφόρα πορτοκάλια (Εικ. 1.6) διαφέρουν από τα άλλα στο ότι φέρουν ομφαλό, ένα μερικώς διαμορφωμένο υποανάπτυκτο φρούτο που βρίσκεται στο άκρο του καρπού. Χαρακτηρίζονται, ακόμα, για την ασημένια των καρπών τους, την κρουστή σάρκα τους, τις λεπτές μεμβράνες των καρπόφυλλων, την εύκολη απόσπαση του φλοιού τους και την πλούσια ευχάριστη γεύση τους. Οι ομφαλοφόρες ποικιλίες, υπήρχαν από πολύ παλιά στην Ισπανία και την Πορτογαλία. Από τις χώρες αυτές μεταφέρθηκαν από τους Πορτογάλους στη Βραζιλία όπου δημιουργήθηκε από μεταλλαγή η ποικιλία Bahia, η γνωστή σήμερα σαν Washington navel. Οι σπουδαιότερες από τις ομφαλοφόρες ποικιλίες είναι οι: Washington navel, Frost Washington, Australian, Bahianinba, Navelina, Navelate, Thomson, Suzuki και Tange (Ladaniya, 2008).



Εικόνα 1.6 Ομφαλοφόρο πορτοκάλι (*sinensis* Navel)

1.2.1.2 Αιματόσαρκες ποικιλίες (σαγκουϊνι, γκρέιπφρουτ)

Αιματόσαρκες ποικιλίες ονομάζονται εκείνες που έχουν ως βασικό χαρακτηριστικό την παρουσία ερυθρού ή ρόδινου χρώματος στο φλοιό, στη σάρκα και στο χυμό. Ο χρωματισμός τους συνδέεται με την ανάπτυξη των ανθοκυανών, ενώ ο κόκκινος ή ρόδινος χαρακτήρας των γκρέιπφρουτ οφείλεται κυρίως στο καροτενοειδές λυκοπένιο. Οι αιματόσαρκες ποικιλίες έχουν υψηλή θερμική απαίτηση αλλά δεν ευδοκιμούν σε ζεστό και υγρό περιβάλλον. Μια αρκετά μεγάλη διαφορά μεταξύ της υψηλής θερμοκρασίας ημέρας και της χαμηλής θερμοκρασίας νύχτας, ειδικά προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου, φαίνεται να είναι

σημαντική. Το χρώμα είναι βαθύτερο σε φρούτα που έχουν αναπτυχθεί σε σκιερά μέρη (Mabberley, 1997).

Χαρακτηρίζονται από μια διακριτική γεύση, που εκτιμάται ιδιαίτερα από το καταναλωτικό κοινό, που τις κατατάσσει στις πιο εύγευστες ποικιλίες της πορτοκαλιάς. Εκτός της πλούσιας γεύσης τα αιματόσαρκα πορτοκάλια σύμφωνα με μελέτη του 2003 (Hodgson 1967) έχει αποδειχθεί ότι περιέχουν υψηλότερες ποσότητες βιταμίνης C (μέχρι 40%) και αντιοξειδωτικούς παράγοντες (μέχρι 300%), όπως φλαβονοειδή και ανθοκυανιδίνες, σε σύγκριση με τα κοινά γλυκά πορτοκάλια. Οι περισσότερες ποικιλίες φαίνεται να προέρχονταν από περιοχή της Μεσογείου, πιθανότατα πρώτα τη Σικελία ή τη Μάλτα, όπου ήταν γνωστές εδώ και αρκετούς αιώνες. Αν και καλλιεργούνται σε πολλές μεσογειακές χώρες, η εμπορική τους χρήση περιορίζεται κυρίως στην Ιταλία, Ισπανία, Αλγερία, Μαρόκο και Τυνησία. Απολαμβάνουν αποδοχής στις ευρωπαϊκές αγορές και είναι ιδιαίτερα δημοφιλείς στην κεντρική και βόρεια Ευρώπη.

Σήμερα λόγω της αυξανόμενης ζήτησης, τα αιματόσαρκα πορτοκάλια καλλιεργούνται επίσης σε: Χονγκ Κονγκ, Πακιστάν, Αίγυπτο, Ινδία, Νέα Ζηλανδία, Κίνα και Ιράν (Scora, 1988).

Στην Ιταλία τις αιματόχρωμες ποικιλίες τις ονομάζουν sanguine, στην Ισπανία sanguigna και στην Ελλάδα σαγκουΐνια (Εικ. 1.7). Οι κυριότερες αιματόχρωμες ποικιλίες είναι οι εξής: Moro, Tarocco, Sanguinello Comune, Sanguinello Moscato, Doblefina, Enterfina, Spanish Sanguinelli, Maltaise Sanguine, Ruby, Tomango και ποικιλία Γουρίτσης (Citrus Pages, 2011).

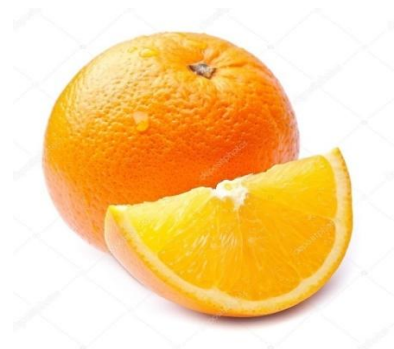


Εικόνα 1.7 Σαγκουΐνι (ποικιλία Moro)

1.2.1.3 Γλυκόχυμες ποικιλίες

Οι γλυκόχυμες ποικιλίες πορτοκαλιάς χαρακτηρίζονται από χαμηλή οξύτητα, γλυκιά γεύση, σκληρές και πικρίζουσες μεμβράνες καρπόφυλλων και μικρή περιεκτικότητα χυμού σε βιταμίνη C. Το γλυκό πορτοκάλι είναι ένα υποτροπικό και όχι τροπικό φυτό που ευδοκίμει σε εύκρατες περιοχές με κλίμα αρκετά θερμό με ηλιοφάνεια, και απαιτήσεις σε νερό (Scora, 1988).

Τα γλυκόχυμα πορτοκάλια μοιάζουν με τα κοινά πορτοκάλια εξωτερικά και διακρίνονται πολύ δύσκολα από αυτά. Οι καρποί τους, λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας της σάρκας τους σε οξύτητα, θεωρούνται ώριμοι νωρίτερα γι' αυτό εμφανίζονται στην αγορά πρώιμα. Η ιδιάζουσα γεύση των γλυκόχυμων ποικιλιών δεν είναι αρεστή στους Ευρωπαίους και Αμερικανούς, ενώ είναι ευχάριστη στους λαούς των Αραβόφωνων χωρών, της Βραζιλίας, του Μεξικού και λιγότερο στην Ισπανία και Πορτογαλία. Αυτός είναι και ο λόγος που η καλλιέργεια τους εντοπίζεται στις χώρες αυτές. Τα γλυκόχυμα πορτοκάλια (Εικ. 1.8) είναι γνωστά με τις ονομασίες *douce* (Γαλλία), *maltese* ή *dolce* (Ιταλία), *sucrena* (Ισπανία), *meski* (Αφρική και Άπω Ανατολή), *tounsi* (Τουρκία), *succari* (Αίγυπτος) *lima* (Βραζιλία). Οι σπουδαιότερες από τις γλυκόχυμες ποικιλίες είναι οι: *Lima*, *Succari*, *Sucrena* και *Vainiglia* (Hodgson, 1967).

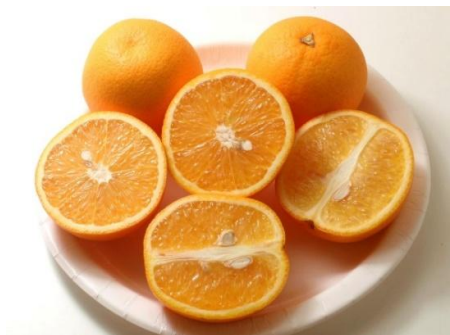


Εικόνα 1.8 Πορτοκάλι *dulce*

1.2.1.4 Κοινά πορτοκάλια

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν όλα τα πορτοκάλια που έχουν σάρκα όμοια με εκείνη των ομφαλοφόρων, με τη διαφορά ότι δεν έχουν ομφαλό, φέρουν σπέρματα και είναι πιο όξινα. Εδώ ανήκουν όλες οι Ελληνικές ποικιλίες με τοπικά ονόματα όπως κοινό πορτοκάλι Χανίων, Άρτας, Σπάρτης κλπ. καθώς και πολλές αξιόλογες ποικιλίες ξενικής προέλευσης. Οι

σημαντικότερες από αυτές είναι οι εξής: Valencia (ΗΠΑ), Cadenera (Ισπανία), Jaffa (Ισραήλ), Pera (Βραζιλία), Ovale, Salustiana, Ambersweet, Hamlin (Ladaniya, 2008).



Εικόνα 1.9 Πορτοκάλια Valencia

1.2.2 Μανταρινιά

Στην κατηγορία των μανταρινιών υπάγονται καρποί από πολλά είδη που παρουσιάζουν μικρές έως μεγάλες διαφορές μεταξύ τους. Τα κυριότερα από τα καλλιεργούμενα είδη είναι τα παρακάτω:

- Μανταρινιά Σατσούμα *Citrus unshiu*
- Μεσογειακή μανταρινιά *Citrus deliciosa*
- Μανταρινιά King *Citrus nobilis*
- Κοινή μανταρινιά Clementine *Citrus reticulata* (Εικ. 1.10)
- Μανταρινιά Dancy *Citrus tangerina*
- Μανταρινιά Κλεοπάτρα *Citrus reshni*

Επίσης υπάρχουν πολλά υβρίδια που προέκυψαν από διασταύρωση μεταξύ μανταρινιάς και άλλων ειδών όπως γκρέιπφρουτ, πορτοκαλιάς και φράπας και αναφέρονται ως μανταρινοειδή ή ως Tangors, Tangelos κ.ά. Τα μανταρινοειδή μπορούν να διατηρήσουν τους καρπούς τους στο δένδρο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα απ' ό τι οι μανταρινιές και έτσι μπορεί να παραταθεί η προσφορά καρπών στην αγορά για μακρύτερο χρονικό διάστημα.

Η μανταρινιά είναι μικρόσωμο εσπεριδοειδές, αν και υπάρχουν διαφορές μεταξύ διαφόρων ειδών. Οι βλαστοί της είναι σχετικά ευλύγιστοι και σε υπερβολική καρποφορία μπορούν να λυγίσουν και να φθάσουν μέχρι το έδαφος ή ακόμη και να αποκολληθούν. Τα δένδρα ορισμένων ποικιλιών, όπως π.χ της Satsuma, είναι πλαγιόκλαδα, ενώ άλλων είναι ορθόκλαδα

στην αρχή, μέχρις ότου οι μακριοί βλαστοί τους αναγκαστούν να καμφθούν από το βάρος των καρπών (Βασιλακάκης, 2004).



Εικόνα 1.10 *Citrus reticulata* Ponkan

1.2.3 Φράπα

Η φράπα (Εικ. 1.11) είναι γνωστή με τις ονομασίες πόμελο ή shaddock. Πήρε το όνομά της από τον Άγγλο καπετάνιο, Shaddock, που εισήγαγε τον σπόρο στις Δυτικές Ινδίες τον 17^ο αιώνα από το αρχιπέλαγος του Μαλάι. Η βοτανική ονομασία του είναι *Citrus grandis*. Τα κυριότερα κέντρα καλλιέργειας της είναι η Ν. Κίνα, το Σιάμ, το Βιετνάμ, η Ινδονησία, η Φορμόζα και η Ιαπωνία (Nicolosi *et al.*, 2000).



Εικόνα 1.11 *Citrus grandis*

1.2.4 Γκρέιπφρουτ

Το γκρέιπφρουτ (*Citrus paradisi*) (Εικ. 1.12) κατάγεται από τις Δυτικές Ινδίες Καραϊβικής (Barbados) και πήρε το όνομα αυτό από την ιδιομορφία του είδους να παράγει καρπούς σε ομάδες. Θεωρείται βέβαιο ότι προήλθε από τη φράπα, αλλά δεν είναι ακόμα γνωστό αν προέκυψε από φυσικό υβριδισμό ή από σωματική μεταλλαγή. Είναι ένα από τα μεγαλύτερα σε μέγεθος εσπεριδοειδή. Χαρακτηρίζεται από ευρεία κλιματική προσαρμοστικότητα (Herrero *et al.*, 1996).



Εικόνα 1.12 *Citrus paradisi*

1.3 Νέες ποικιλίες *Citrus*

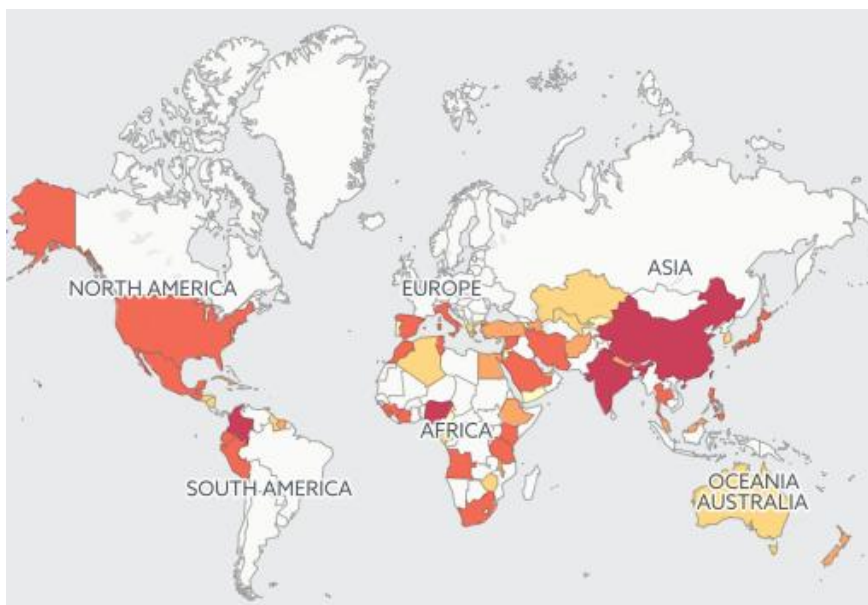
Από το 1850 και μετά παρατηρούνται κάποιες νέες ποικιλίες μανταρινιών όπως τα tangerines, η κλημεντίνη και τα tangelos. Συγκεκριμένα, τα tangerines έχουν σημαντική εμπορική αξία σε ορισμένες χώρες όπως στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ενώ η κλημεντίνη που ο σπόρος της βρέθηκε στην Αλγερία το 1902 είναι πιθανότατα υβρίδιο του ξινού πορτοκαλιού και του μανταρινιού. Σήμερα, υπάρχουν πολλές ποικιλίες μανταρινιών χωρίς κουκούτσια που καλλιεργούνται κατά μήκος του Μεσογειακού κόλπου και τείνουν να αντικαταστήσουν παλαιότερες Μεσογειακές καλλιέργειες μανταρινιών, τις οποίες τις βρίσκουμε πλέον μόνο στην Ελλάδα, την Ιταλία και την Αίγυπτο. Ακόμα, το tangelo το οποίο είναι αποτέλεσμα ανθρώπινης παρέμβασης, είναι υβρίδιο του tangerine και είτε του πόμελο είτε του γκρέιπφρουτ. Νέες ποικιλίες *Citrus* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ριζώματα, τα οποία θα προσφέρουν εξαιρετική ανθεκτικότητα απέναντι σε διάφορες ασθένειες. Ήδη, τέτοια ριζώματα

πολλαπλασιάζονται έτσι ώστε να αντικαταστήσουν το ξινό πορτοκάλι. Τα **citrance, citrumelos, citremons, citrangors, citrangequats** είναι μερικά από αυτά. Τα είδη και οι ποικιλίες των *Citrus* εξαπλώθηκαν στη Δύση και προσέγγισαν κάθε ήπειρο. Το πορτοκάλι είναι το φρούτο που καλλιεργείται περισσότερο με ετήσια παραγωγή 59.000.000 τόνων στις αρχές της τρίτης χιλιετίας. Στις μέρες μας, τα φρούτα *Citrus* αποτελούν, όπως και στην αρχαιότητα, σύμβολο ευημερίας το οποίο προσδίδει άρωμα και χρώμα σε οτιδήποτε.

Λόγω του ασαφούς αριθμού φυσικών ειδών και μεγάλων περιοχών καλλιέργειας, τα πιο γνωστά παραδείγματα εσπεριδοειδών με εμπορική σημασία είναι τα πορτοκάλια, τα λεμόνια, τα γλυκολέμονα, τα γκρέιπφρουτ και τα μανταρίνια. Αν και τα εσπεριδοειδή καλλιεργούνται σε όλο τον κόσμο (περισσότερες από 140 χώρες), το μεγαλύτερο μέρος της καλλιέργειας αναπτύσσεται εκατέρωθεν μιας ζώνης γύρω από τον ισημερινό και καλύπτει τροπικές και υποτροπικές περιοχές του πλανήτη 35°N και 35°S γεωγραφικού πλάτους με καλλιέργεια και παραγωγή συγκεντρωμένη σε μεγάλες περιοχές του Βόρειου Ημισφαιρίου (“FAO”, 2014) (Εικόνα 1.13). Ετήσια παγκόσμια παραγωγή εσπεριδοειδών έχει γνωρίσει ισχυρή και ταχεία ανάπτυξη τις τελευταίες δεκαετίες, από περίπου 30 εκατομμύρια τόνους στα τέλη της δεκαετίας του 1960 (“FAO”, 2014) σε μια συνολική εκτίμηση της πάνω από 139 εκατομμύρια μετρικούς τόνους την περίοδο του 2014, με πορτοκάλια που συμβάλλουν περισσότερο από το ήμισυ της παγκόσμιας παραγωγής εσπεριδοειδών (USDA, 2017). Σύμφωνα με στοιχεία του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) για το 2014, η Κίνα, η Βραζιλία, η Αμερική, η Ινδία, το Μεξικό και η Ισπανία είναι οι κορυφαίες χώρες παραγωγής εσπεριδοειδών στον κόσμο, αντιπροσωπεύοντας σχεδόν τα δύο τρίτα της παγκόσμιας παραγωγής (Liu *et al.*, 2012) (Πίνακας 1.1). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, συνολικά 7.77 εκατομμύρια μετρικούς τόνους παραγωγής εσπεριδοειδών αναφέρθηκαν για το 2016-17, με τη Καλιφόρνια να κατέχει το 51% ως ηγετική πολιτεία, τη Φλόριντα το 45%, ακολουθούμενη από το Τέξας και την Αριζόνα που κατέχουν το 4% (“FAO”, 2014).

Παρά το γεγονός ότι πολλά από τα εσπεριδοειδή (πορτοκάλια, μανταρίνια και γκρέιπφρουτ), μπορούν να καταναλωθούν φρέσκα, περίπου το ένα τρίτο των εσπεριδοειδών παγκοσμίως χρησιμοποιείται μετά την επεξεργασία, ενώ η παραγωγή χυμού πορτοκαλιού αντιπροσωπεύει σχεδόν το 85% της συνολικής μεταποιημένης κατανάλωσης. Επειδή η εισαγωγή κατεψυγμένου

συμπυκνωμένου χυμού πορτοκαλιού μετά τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο, που διατηρεί φρέσκια γεύση και πλήρες χρώμα, μειώνει το κόστος μεταφοράς και ελαχιστοποιεί τις απώλειες που οφείλονται στις ασθένειες αποθήκευσης, οι ΗΠΑ σημείωσαν σημαντική αύξηση στη χρήση εσπεριδοειδών. Η Καλιφόρνια είναι ο κύριος παραγωγός για κατανάλωση ως νωπών φρούτων εσπεριδοειδών, ενώ η επεξεργασία των εσπεριδοειδών και η παραγωγή χυμού πορτοκαλιού εμφανίζονται κυρίως στη Φλόριντα. Λόγω της ευχάριστης γεύσης, της οικονομικά προσιτής τιμής και της ευαισθητοποίησης των καταναλωτών στις ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία, τα εσπεριδοειδή έχουν υψηλό διατροφικό και οικονομικό ενδιαφέρον σε όλη την υδρόγειο (Λέκκας, 2005).



Εικόνα 1.13 Οι σημαντικότερες περιοχές παραγωγής των εσπεριδοειδών στον κόσμο (επισημαίνονται με έντονο χρωματισμό). (Προσαρμοσμένο σύμφωνα με τα στοιχεία του FAO 2014).

Πίνακας 1.1 Οι κορυφαίοι παραγωγοί εσπεριδοειδών στον κόσμο.

Χώρα	Γκρέιπφρουτ & Limes	Λεμόνια	Πορτοκάλια	Μανταρίνια ^a	Άλλα	Σύνολο
Κίνα	3.782.246	2.167.020	7.986.083	16.436.656	5.097.282	35.469.287
Βραζιλία	78.491	1.101.799	16.928.457	965.167	NA ^b	19.073.914
Η.Π.Α	949.822	747.520	6.139.826	664.059	36.287	8.537.514
Ινδία	248.500	2.835.020	7.317.610	NA ^b	745.500	11.146.630
Μεξικό	424.678	2.205.079	4.533.428	492.039	168.274	7.823.498
Ισπανία	68.516	1.090.709	3.494.471	2.389.681	12.050	7.055.427

Σημείωση: Όλες οι τιμές που αναφέρονται είναι σε τόνους. ^aΠεριλαμβάνονται tangerines, mandarins and clementines. ^bNA, not available (όχι διαθέσιμο). Πηγή: (Economos and Clay, 1999).

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε να γίνει ανάλυση αιθερίων ελαίων 7 υβριδίων εσπεριδοειδών που παραλήφθηκαν από τον Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου και δεν έχουν μελετηθεί ξανά στη διεθνή βιβλιογραφία. Αυτά είναι τα εξής:

- *Citrus paradisi* cv Star Ruby x νερατζιά (*Citrus aurantium* L.)
- *Citrus sinensis* cv New Hall x citrumelo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*)
- *Citrus sinensis* cv New Hall x trifoliata
- *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x citrumelo
- *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x trifoliata
- *Citrus grandis* cv Cuba Shaddock x trifoliata
- *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata

1.4 Δρογοϊστορία

Οι καρποί *Citrus* ακολουθώντας τα μονοπάτια του πολιτισμού εξαπλώθηκαν από τις περιοχές της Ασίας στις υπόλοιπες χώρες της γης (Calabrese, 2004).

Είναι πλέον γνωστό ότι το κοινό πορτοκάλι είχε καλλιεργηθεί εντατικά για πολλούς αιώνες στην Κίνα πριν μεταφερθεί στην Ευρώπη. Περιοχές όπως η Ισπανία έπαιξαν σημαντικό ρόλο

στη μεταφορά εσπεριδοειδών σε πολλές χώρες, αλλά και στην Αμερικανική Ήπειρο. Μέσω των εξερευνητήσεων και των κατακτήσεων, τα εσπεριδοειδή διαδόθηκαν σε όλο τον κόσμο (Dugo and Bonaccors, 2013).

Ο όρος αυτός, προκύπτει σύμφωνα με την ελληνική μυθολογία, από τον ενδέκατο άθλο του Ηρακλή, που ήταν η αρπαγή των μήλων των Εσπερίδων, δηλαδή των χρυσών καρπών των δέντρων που βρίσκονταν στον κήπο των Εσπερίδων.

Οι **Εσπερίδες** ήταν νύμφες που έμεναν στον κήπο των θεών και είχαν οριστεί να φυλάνε τα χρυσά μήλα που βρίσκονταν εκεί. Ο άθλος αυτός απεικονίζεται σε μωσαϊκό στο *Θησαυρό των Αθηναίων* στους Δελφούς (Εικ. 1.14), στο ναό του Δία στην Ολυμπία καθώς επίσης και σε μωσαϊκά στο *Villa Romana del Casale* στην Piazza Armerina της Ιταλίας και στο χωριό Liria στην Βαλένθια της Ισπανίας (Gallesio, 1829).



Εικόνα 1.14 Μωσαϊκό. Ο Ηρακλής αρπάζει τα μήλα των εσπερίδων.

1.4.1 Αναφορές και χρήσεις των εσπεριδοειδών κατά την αρχαιότητα

Στη περιοχή της Μεσογείου καλλιεργούνταν παραδοσιακά οκτώ είδη εσπεριδοειδών του γένους *Citrus*. Το *Citrus medica* L., η κιτριά, ήταν το μόνο γνωστό στην Ευρώπη από την αρχαιότητα μέχρις ότου εισήχθησαν από τους μωαμεθανούς τα: λεμόνι (*Citrus limon*), λιμεττία (*Citrus aurantifolia*), φράπα (*Citrus maxima*) και νεράντζι (*Citrus aurantium* L.). Αρκετά αργότερα μεταξύ του 15ου και 19ου αιώνα έγιναν γνωστά στη Μεσόγειο το μανταρίνι (*Citrus reticulata* Blanco), το γλυκό πορτοκάλι και το γκρέιπφρουτ (*Citrus paradisi* Macfad). Τα

εσπεριδοειδή εκτός από εδώδιμα χρησιμοποιούνταν και σε άλλους τομείς. Παρακάτω θα αναφερθούν οι χρήσεις τους από τον 5^ο π.Χ. – 3^ο μ.Χ. αιώνες.

Ο **Δημόκριτος** (460 – 380π.Χ.) περιέγραψε τις αντισκωρικές ιδιότητες του καρπού και τόνισε την χρήση του ως αντίδοτο έναντι οποιουδήποτε δηλητηρίου, με λήψη πριν το φαγητό. Σε μία πραγματεία του έγραψε μία ιστορία για εγκληματίες από την Αίγυπτο στους οποίους έδωσαν δηλητήριο ως τιμωρία, επειδή όμως είχαν φάει πορτοκάλια πριν την τιμωρητική δηλητηρίαση, διασώθηκαν. Αυτή η ιστορία επηρέασε πολλούς συγγραφείς όπως τους Διουσκουρίδη, Πλίνιο, Βιργίλιο και τους νεότερους, του 16^{ου} αιώνα Laguna και Monardes (Ajaiyeoba *et al.*, 2003).

Υπάρχει μια ακριβής περιγραφή του κίτρου από το **Θεόφραστο** της Ερεσού (372 - 287π.Χ.) στο έργο του *Historia Plantarum* γραμμένο περί το 313 π.Χ. αναφέρει την ύπαρξη δέντρου στην Περσία που παράγει καρπούς γνωστούς ως *Περσικά* ή *Μηδικά φρούτα* ή *Περσικά κίτρα* ή *Μηδικά μήλα* (Βιβλίο IV, Κεφάλαιο IV). Περιγράφει, ακόμα, πως πρόκειται για ένα ακανθώδες δέντρο που οι καρποί του είναι μη βρώσιμοι. Σύμφωνα με τον Θεόφραστο τα εσπεριδοειδή χρησιμοποιούνταν για προστασία των ρούχων από τους σκώρους. Επίσης, τα έδιναν ως αντίδοτο σε δηλητηριάσεις, το πρόσθεταν σε κρασί ως εμετικό, ενώ το κίτρο το χρησιμοποιούσαν για την βελτίωση της αναπνοής.

Ο θεραπευτής **Νίκανδρος** ο Κολοφώνιος (2^{ος} αι. π.Χ.) περιέγραψε τις θεραπευτικές ιδιότητες του κίτρου.

Ο **Διοσκουρίδης** (10 - 90μ.Χ.), στο πεντάτομο έργο του *Περί Ύλης Ιατρικής* ονομάζει το κίτρο *κεδρόμηλο* και αναφέρει επίσης ότι οι Ρωμαίοι το αποκαλούσαν *citria*. Επίσης περιέγραψε ότι έβραζαν τα κουκούτσια κίτρου και το αφέψημα χρησιμοποιούνταν ως ευστόμαχο και για τον αρωματισμό της αναπνοής, ενώ ο καρπός προσφερόταν στις γυναίκες μετά την γέννα για τόνωση και έναντι λιποθυμιών.

Ο **Πλίνιος** (23 – 79μ.Χ.), εκτός από τη χρήση του *Citrus medica* L. ως αντιδότου, αναφέρει ότι τα κουκούτσια του μαγειρεύονταν με κρέας για να αρωματίζουν την αναπνοή, ενώ στην εγκυμοσύνη οι γυναίκες ελάμβαναν κουκούτσια για την καταπολέμηση της ναυτίας.

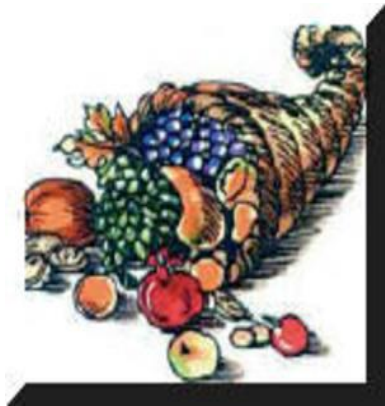
Από το φλοιό του *Citrus medica* L. παρασκευαζόταν μαρμελάδα, με ευστόμαχη δράση (Arias and Ramon-Laca, 2005), ενώ αντίστοιχη δάση είχε και το έλαιο των ανθέων και του φλοιού κίτρου. Το σιρόπι από το φλοιό κίτρου είχε διουρητική δράση.

Ο φιλόσοφος **Πλούταρχος** (45 – 120μ.Χ) κάνει αναφορά στο κίτρο και ήταν ο πρώτος που περιγράφει ότι το τρυφερό και άσπρο εσωτερικό του μέρος ήταν φαγώσιμο.

Ο **Αθήναιος** (τέλη 2^{ου} – αρχές 3^{ου} αι. μ.Χ.) από την Αλεξάνδρεια της Αιγύπτου, έγραψε ένα βιβλίο δεκαπέντε κεφαλαίων, τους *Δειπνοσοφιστές*, όπου παραθέτει συζήτηση σχετικά με την προέλευση του κίτρου και ένας από τους ομιλητές αναφέρει ότι το κίτρο εισήχθη στην Αθήνα από το βασίλειο της Περσίας.

Ο ιστορικός **Laguna**, στη μετάφραση του έργου του Διοσκουρίδη του Πεδάνιου «Περί ύλης ιατρικής» (1570), προσφέρει πληροφορίες για τα πορτοκάλια και τα λεμόνια.

Γεγονός πάντως είναι ότι οι αρχαίοι Έλληνες συγγραφείς δε διέκριναν το κίτρο από το λεμόνι και το lime (γλυκολέμονο). Αυτός είναι και ο βασικός λόγος που οι ελληνικές βιβλιογραφίες περιορίζονται μόνο στα κίτρα. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν αποδείξεις ότι οι Έλληνες γνώριζαν τουλάχιστον το λεμόνι, όπως αυτό απεικονίζεται στο γλυπτό *Κέρας της αμάλθειας* (Εικ. 1.15) της ελληνιστικής περιόδου (Rodrigues *et al.*, 2000).



Εικόνα 1.15 Αμάλθειο κέρας

Πίνακας 1.2 Χρήσεις των εσπεριδοειδών κατά την αρχαιότητα και το μεσαίωνα (Arias and Ramon-Laca, 2005).

Είδη εσπεριδοειδών	Ιδιότητες και Χρήσεις στην αρχαιότητα και το μεσαίωνα
<i>Citrus medica</i> L.	<p>φύλλα: έντομο-απωθητικό (Πλίνιος, Χερρέρα), χωνευτικό (Abu Marwan).</p> <p>καρπός: αντιεμετικό (Χερρέρα), αντίδοτο δηλητηρίων και πανούκλας (Διοσκουρίδης, Δημόκριτος, Θεόφραστος, Πλίνιος), ευστόμαχο (Πλίνιος, Χερρέρα).</p> <p>φλοιός: χωνευτικό, τονωτικό (Abu Marwan).</p> <p>πολτός: αντίδοτο δηλητηρίου (Laguna), καταπραϋντικό αναπνευστικού (Θεόφραστος, Διοσκουρίδης, Πλίνιος).</p> <p>κουκούτσια: αντίδοτο δηλητηρίου, αντιεμετικό, χωνευτικό (Abu Marwan).</p>
<i>Citrus x aurantifolia</i>	<p>καρπός: αντίδοτο δηλητηρίου, ορεξιογόνο, ευστόμαχο (Abu Marwan).</p>
<i>Citrus x aurantium</i> L.	<p>Απόσταγμα από άνθη: καρδιοτονωτικό, χωνευτικό και τονωτικό (Laguna, Χερρέρα).</p> <p>πολτός: βοηθάει στον ίκτερο (Χερρέρα)</p>
<i>Citrus x maxima</i>	<p>πολτός: αντίδοτο δηλητηρίου, ορεξιογόνο, καρδιοτονωτικό, ευστόμαχο, χωνευτικό (Laguna)</p>

1.4.2 Τα εσπεριδοειδή στην παραδοσιακή ιατρική του Νέου Κόσμου

Μετά την ανακάλυψη της Αμερικής, η καλλιέργεια των πιο γνωστών ειδών *Citrus* διαδόθηκαν στο Νέο Κόσμο. Υπάρχουν γραπτές αναφορές για την παρουσία φυτειών νεραντζιού στη Βέρα Κρουζ στο Μεξικό κατά το δεύτερο μισό του 16^{ου} αιώνα, ενώ μερικά χρόνια αργότερα στην

Αμερική έκαναν την εμφάνισή τους φυτείες λεμονιών και γλυκών πορτοκαλιών. Η καλλιέργεια των εσπεριδοειδών σταδιακά επεκτάθηκε σε πολλές πολιτείες της Αμερικής όπως η Φλόριδα, η Λουιζιάνα και η Καλιφόρνια. Σήμερα, τα είδη *Citrus* και οι καλλιέργειες που προέκυψαν από αυτά είναι ευρύτατα διαδεδομένα στις Ηνωμένες Πολιτείες, γι' αυτό και τα εσπεριδοειδή αποτελούν σημαντικό παράγοντα στη διατροφή και τη θεραπευτική.

Στην Αμερική, ο καρπός, το περικάρπιο και το έλαιο του νεραντζιού και του πικρού πορτοκαλιού χρησιμοποιούνται ως αρωματικά, ευστόμαχα και χωνευτικά. Το περικάρπιο και το αιθέριο έλαιο του πορτοκαλιού χρησιμοποιούνται ως βελτιωτικά σε τρόφιμα, ποτά και φάρμακα (έκδοχα). Ο χυμός του πορτοκαλιού ως πλούσια πηγή βιταμίνης C χρησιμοποιείται περισσότερο ως βελτιωτικό γεύσης απ' ό τι για ιατρικούς λόγους παρόλο που καταπολεμά το σκορβούτο (Wren, 1988).

Στο Μεξικό, (Martinez and Wallace, 1967) τα φύλλα από νεράντζι χρησιμοποιούνται για τις αντισπασμωδικές, τονωτικές και αντιπυρετικές τους ιδιότητες, ενώ χορηγούνται υποβοηθητικά σε ανθρώπους που πάσχουν από επιληψία.

Το μανταρίνι (*Citrus reticulata* Blanco) αποτελεί παραδοσιακό φυτό που καλλιεργούνταν στη Βόρεια Βενεζουέλα, και αφέψημα από τη φλούδα του εθεωρείτο ότι είχε υπογλυκαιμική δράση, ενώ το περικάρπιο χρησίμευε ως αντιβιοτικό (Morton, 1975a).

Ένα φυτικό βότανο που είχε πληθώρα χρήσεων στη ιατρική ήταν το lime (γλυκολέμονο). Ο χυμός του σταματούσε τη διάρροια, αποτελούσε καλό απολυμαντικό για τα μάτια των νεογνών και για πληγές, ενώ φρέσκος χυμός αραιωμένος με νερό χρησιμοποιούνταν για γαργάρες σε παθήσεις του ανώτερου αναπνευστικού. Ανακούφιζε από πυρετό, πόνο στο ήπαρ και από οιδήματα. Χρησίμευε, επίσης, ως διουρητικό ενώ στη χερσόνησο του Γιουκατάν στο Μεξικό, ο χυμός του χορηγείτο σε διαβήτη, σε ρευματισμούς και έναντι αθηροσκλήρωσης, επίσης τα άνθη lime χρησιμοποιήθηκαν ως αντισπασμωδικός και εφιδρωτικός παράγοντας. Στη νησιωτική χώρα Trinidad, νότια της Καραϊβικής Θάλασσας χρησιμοποιούσαν το χυμό γλυκολέμονου (lime) στον πονόδοντο και ως εντριβή στο ερυσίπελας (λοίμωξη του δέρματος και των ιστών). Το σκεύασμα χρησιμοποιούνταν, επίσης, για εντριβές στο στήθος σε περίπτωση πνευμονίας. Ένα τσάι από άγουρα άνθη (μπουμπούκια) πριν τον ύπνο χρησίμευε

ως χαλαρωτικό και υποβοηθητικό υπναγωγό, ενώ οι ρίζες με τη μορφή αφεψήματος εφαρμόζονταν σε τσιμπήματα από σκορπιό (Morton, 1975b)

Το νεράντζι, χρησιμοποιήθηκε στην Κεντρική Αμερική ως καθαρτικό φάρμακο, διουρητικό καθώς και ως αντιβηχικό και αντιπυρετικό. Το αφέψημα ή τα αιθέρια έλαια από φύλλα και άνθη χρησιμοποιήθηκαν ως ευεργετικά για το στομάχι, και αντισπασμωδικά. Αλοιφή με συστατικά από άνθη έναντι δερματικών παθήσεων και ο χυμός του ως φάρμακο στο κρυολόγημα και τον πονόλαιμο. Ακόμη, το γλυκό πορτοκάλι, χρησιμοποιήθηκε στη δυσεντερία, τα εντερικά παράσιτα και το μετεωρισμό. Εγχύματα από φύλλα πορτοκαλιού χορηγούνταν ως αντισπασμωδικά, έναντι υστερικής κρίσης επιληψίας και βρογχίτιδας (Κουρασάο). Στο Εκουαδόρ, χρησιμοποιούσαν το εκχύλισμα από τα σπέρματα πορτοκαλιού στη θεραπεία ελονοσίας (Morton, 1975b).

Τέλος, στην Ανατολική Αφρική (Kokwaro, 2009) η κατανάλωση αφεψημάτων ριζών γλυκολέμονου (lime) χρησιμοποιήθηκε στις γυναίκες ως αντισυλληπτικό μέσο. Ο φλοιός πορτοκαλιού χρησιμοποιείται, ακόμη, κατά της πιτυρίδας, ως αποσυμφορητικό και ηρεμιστικό (Calabrese, 2004).

1.5 Χημική σύσταση εσπεριδοειδών

Η χημική σύσταση των καρπών των εσπεριδοειδών επηρεάζεται από τις συνθήκες σχηματισμού τους, τις επεμβάσεις (λιπάνσεις, ψεκασμοί), την ωριμότητά τους κατά τη συγκομιδή, τα υποκείμενα που έχουν χρησιμοποιηθεί, τις ποικιλίες και τις κλιματολογικές συνθήκες.

Στα εσπεριδοειδή περιέχονται πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες. Μερικοί σημαντικοί **πρωτογενείς** μεταβολίτες είναι οι:

Πηκτίνες

Τα εσπεριδοειδή είναι πλούσια πηγή πηκτίνης με εξέχουσες ιδιότητες στη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης (Baghurst, 2003). Η **πηκτίνη** είναι ένας δομικός ετεροπολυσακχαρίτης που βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών. Η εμπορικά χρησιμοποιούμενη πηκτίνη, είναι λευκή ή φαιά σκόνη, που εξάγεται από εσπεριδοειδή, και χρησιμοποιείται ως παράγοντας πήξης (ζελατινοποίησης), κυρίως σε μαρμελάδες και άλλες

γέλες (ζελέ). Χρησιμοποιείται ως έκδοχο στην ιατρική, τη ζαχαροπλαστική (σταθεροποιητής σε χυμούς φρούτων και γλυκά), τη ποτοποιία (ποτά που περιέχουν γάλα) και τη βιομηχανία τροφίμων (πηγή φυτικών ινών).

Οργανικά οξέα - Σάκχαρα

Τα διαλυτά στερεά των πορτοκαλιών αποτελούνται από οργανικά οξέα και σάκχαρα. Η οξύτητα των πορτοκαλιών οφείλεται στο μηλικό και στο κιτρικό οξύ (Καραουλάνης, 2003).

Τα συνολικά σάκχαρα κυμαίνονται από 1-15% και είναι γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη. Στα Valencia η σακχαρόζη είναι 50.5% ενώ τα ανάγοντα σάκχαρα γλυκόζη και φρουκτόζη είναι 23.7% και 25.8%, αντίστοιχα.

Λιπαρές ουσίες

Τα εσπεριδοειδή, όπως συμβαίνει και με τα περισσότερα άλλα φρούτα και λαχανικά, είναι επίσης χαμηλά σε λιπαρά και σε συνολική διατροφική ενέργεια. Φρούτα και λαχανικά, συμπεριλαμβανομένων των εσπεριδοειδών, έχουν σχετικά χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη που βοηθά στη διατήρηση ενός σταθερότερου επιπέδου γλυκόζης στο αίμα (Parmar and Kar, 2007).

Οι λιπαρές ουσίες διακρίνονται σε ουδέτερες λιπαρές ουσίες, που είναι εστέρες της γλυκερόλης κυρίως τριγλυκερίδια αλλά και δι- και μονογλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Επίσης, περιέχονται πολικές λιπαρές ουσίες όπως φωσφολιπίδια και γλυκολιπίδια και τέλος παράγωγα των λιπών όπως αλκοόλες και υδρογονάνθρακες. Στον φλοιό έχουν βρεθεί λιπαρά οξέα (ελαϊκό, λινελαϊκό, λινολενικό, παλμιτικό), γλυκερόλη, φυτοστερόλη. Στην πούλπα εκτός των παραπάνω βρίσκεται και ο υδρογονάνθρακας εικοσιπεντάνιο, ο οποίος δεν υπάρχει στον φλοιό (Καραουλάνης, 2003).

Ένζυμα

Η υπεροξειδάση έχει βρεθεί στα πορτοκάλια, τα γκρέιπφρουτ και τα λεμόνια. Κατανέμεται σχετικά ομοιόμορφα στο φλοιό, με μεγαλύτερη συγκέντρωση στο μεσοκάρπιο. Στα πορτοκάλια έχουν βρεθεί ινδοφαινόλη οξειδάση, αφυδρογενάση, κυτοχρωμική οξειδάση και

οξειδάση του ασκορβικού οξέος. Επίσης υπάρχει πηκτινοεστεράση και βρίσκεται στο μεσοκάρπιο, το εξωκάρπιο και το χυμό (Καραουλάνης, 2003).

Αζωτούχες ενώσεις

Τα αζωτούχα συστατικά των πορτοκαλιών αποτελούν το 5-10% των συνολικών στερεών και είναι πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα, φωσφατίδια και αζωτούχες ενώσεις (Καραουλάνης, 2003).

Ενώ σημαντικοί **δευτερογενείς** μεταβολίτες είναι τα:

Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή διαθέτουν και προσδίδουν στα εσπεριδοειδή έντονο κίτρινο, πορτοκαλί ή κόκκινο χρωματισμό. Έχουν σημαντική βιταμινική δράση. Σε πολλές περιπτώσεις έχει μελετηθεί η βιοδιαθεσιμότητά τους και η πιθανή χρησιμοποίησή τους για αύξηση των επιπέδων των καροτενίων στο αίμα με θετικά αποτελέσματα (Engler, 1931).

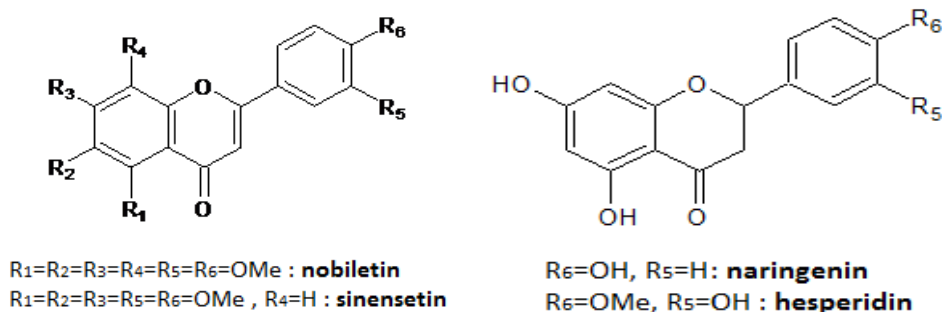
Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στα φρούτα και τα λαχανικά. Είναι υπεύθυνες για το χρώμα και την γεύση πολλών φρούτων και λαχανικών και συμμετέχουν στο αμυντικό σύστημα των φυτών έναντι παράσιτων, μυκήτων και εντόμων (Benavente-Garcia *et al.*, 1997).

Έχουν δομή φαιnyλο-βενζοπυρόνης, που αντιπροσωπεύονται ως δύο βενζολικοί δακτύλιοι ενωμένοι με μία γραμμική αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα, με μία ομάδα καρβονυλίου. Τα φλαβονοειδή των εσπεριδοειδών περιλαμβάνουν μία κατηγορία γλυκοσιδών φλαβανόνης, όπως: εσπεριδίνη (hesperidin), ναρινγενίνη (naringin) και νεοεσπεριδίνη και μία άλλη κατηγορία πολυμεθοξυλιωμένων φλαβονών (PMF) όπως nobiletin και sinensetin, που είναι σχετικά δύο κοινές πολυμεθοξυλιωμένες φλαβόνες (Li *et al.*, 2014). Ειδικότερα τα περικάρπια τους περιέχουν τις υψηλότερες ποσότητες PMF σε σύγκριση με άλλα βρώσιμα μέρη του φρούτου (Manthey and Grohmann, 2001; Wang *et al.*, 2014).

Μπορεί να αποτελέσουν περισσότερο από το 10% του ξηρού βάρους των πορτοκαλιών.

Οι φλαβόνες των πορτοκαλιών επιδρούν στη διαπερατότητα και την αντοχή των τριχοειδών σωληνίσκων. Το μίγμα των φλαβονών, παλαιότερα γνωστό ως βιταμίνη P, περιέχει τις κύριες ενώσεις της βιταμίνης P, την εσπεριδίνη και την εριοδικτίνη, που ρυθμίζουν την διαπερατότητα των αγγείων και την προστατεύουν από ορισμένα είδη αιμορραγιών.



Σχήμα 1.1 Δομές φλαβονοειδών

Η εσπεριδίνη είναι ο καλύτερα μελετημένος γλυκοζίτης φλαβανόνης. Είναι γνωστό ότι βελτιώνει την ποιότητα των αγγείων και μειώνει τη διαπερατότητα των τριχοειδών αγγείων (Pizzorno and Murray, 1999) και χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής σε ασθενείς με φλεβική ανεπάρκεια (Garg *et al.*, 2001), ενώ σε συνδυασμό με τη ναριγκενίνη (naringenin), συντελούν στη ρύθμιση της χοληστερόλης (Bok *et al.*, 1999) ενώ έχουν εμφανίσει και κυτταροτοξική δράση (Aboobaker *et al.*, 1994).

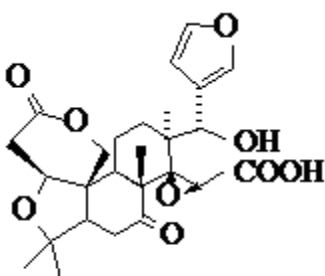
Οι πολυμεθοξυλιωμένες φλαβόνες, βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ιστούς και φλούδες ειδών του γένους *Citrus* και ειδικότερα έχουν ανιχνευθεί σε *Citrus reticulata*, *Citrus paradisi*, *Citrus sinensis* και *Citrus aurantium* (Wu *et al.*, 2017). Οι πολυμεθοξυφλαβόνες προσδίδουν στα εσπεριδοειδή αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριακή, αντικαρκινική, αντι-αθηρογόνο αλλά και καρδιοτονωτική δράση σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο (Song *et al.*, 2016; Morley *et al.*, 2007; Shanshan *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2017). Οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στις πολυμεθοξυφλαβόνες, nobiletin και sinensetin. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η nobiletin (5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone), αναστέλλει την καρκινογένεση του παχέως εντέρου σε διαφορετικά μοντέλα *in vitro* κυτταροκαλλιέργειας και *in vivo* σε ζώα (Morley *et al.*, 2007). Επίσης, αναφέρεται ως υποσχόμενος ανοσορρυθμιστικός και αντιφλεγμονώδης παράγοντας (Lin *et al.*, 2003), που μπορεί να αντιμετωπίζει τον ιο της

ηπατίτιδας C (Suzuki *et al.*, 2005) και να προστατεύει από ερύθημα, οίδημα, φωτο-γήρανση και φωτο-καρκινογένεση που προκαλείται από τη UVB ακτινοβολία (Tanaka *et al.*, 2004).

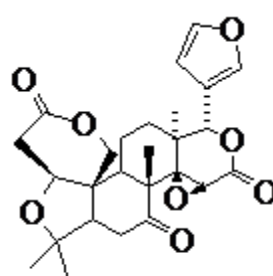
Λιμονοειδή

Περίπου 38 διαφορετικά λιμονοειδή εμπεριέχονται στα εσπεριδοειδή και κυρίως στη σάρκα τους και τα σπέρματα. Η βιοσύνθεση των λιμονοειδών γίνεται στα φύλλα και στη συνέχεια οι ενώσεις αυτές μεταφέρονται στους καρπούς (Σφλώμος, 2010). Η λιμονίνη, το κύριο λιμονοειδές στα σπέρματα των *Citrus*, είναι γνωστή από το 1841. Η παρουσία της είναι υπεύθυνη για την πικρή γεύση που αναπτύσσεται σταδιακά στους χυμούς καρπών *Citrus*, και που δεν υπάρχει σε φρεσκοστυμμένο χυμό, αλλά αναπτύσσεται μετά από θέρμανση ή αν παραμείνει ο χυμός 12-24 h.

Το λιμονοϊκό οξύ είναι σταθερό στο σχεδόν ουδέτερο pH των ιστών. Όταν τα τείχη των μεμβρανών διαρρηγνύονται (όταν φτιάχνουμε τον χυμό) η μορφή αυτή με τον ανοιγμένο δακτύλιο, το λιμονοϊκό οξύ κλείνει σε λιμονίνη στον όξινο χυμό με pH~3.5.



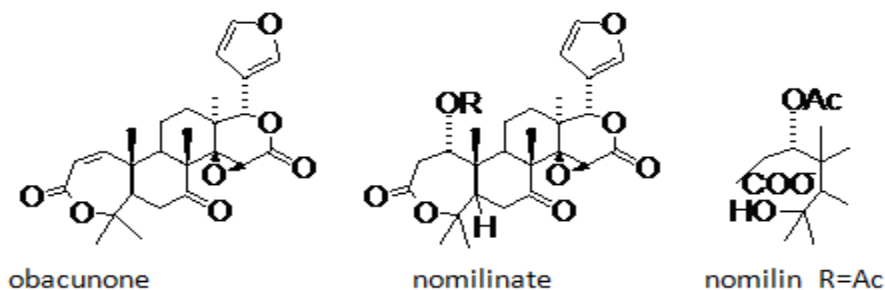
limonoic acid



limonin

Σχήμα 1.2 Δομές λιμονοειδών

Τα *Citrus* spp. και τα συγγενή τους γένη (υποοικ. Aurantioideae, 33 γένη) περιέχουν κυρίως λιμονίνη, τη βασική πρόδρομη ένωση όλων των λιμονοειδών των *Citrus*. Η λιμονίνη συνοδεύεται συνήθως από 3 πικρά συστατικά που βρίσκονται σε μικρότερες ποσότητες και αυτά είναι (Berhow *et al.*, 1996):



Σχήμα 1.3 Δομές obacunone, nomilinate, nomilin

Μερικές από τις πιο σημαντικές εφαρμογές των λιμονοειδών, είναι η χρήση τους σε θεραπείες διαφόρων τύπων καρκίνου. Η λιμονίνη και η νομιλίνη, δύο λιμονοειδή συστατικά των *Citrus*, έδωσαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα σε *in vitro* βιοδοκιμές σε ανθρώπινες καρκινικές σειρές. Αυτά τα λιμονοειδή βρέθηκε ότι προάγουν την αύξηση της δραστηριότητας του αντιτοξικού ενζύμου τρανσφεράση της S-γλουταθειόνης, που δυνητικά αναστέλλει τη χημικά επαγόμενη καρκινογένεση σε πειραματόζωα (Bagge, 1999).

Κουμαρίνες

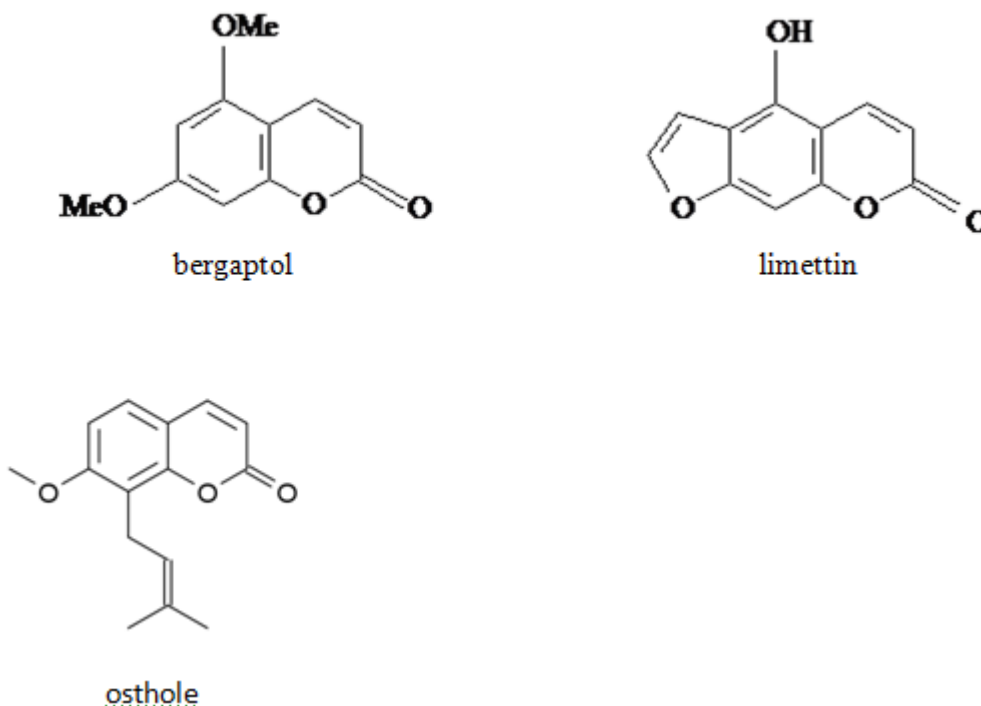
Οι κουμαρίνες ή βενζο-α-πυρόνες είναι ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις με δυο εξαμελείς δακτυλίους, ένα άτομο οξυγόνου και ένα γειτονικό σε αυτό καρβονύλιο στην κύρια αλυσίδα.

Με το όνομα κουμαρίνη, χαρακτηρίζεται η ένωση η οποία προκύπτει από τη συμπύκνωση ενός βενζολικού δακτυλίου με την [e] πλευρά μιας α-πυρόνης. Επίσης, είναι γνωστή με διάφορες ονομασίες όπως 2-οξο-1,2-βενζοπυράνιο, 5,6-βενζο-α-πυρόνη, 5,6-βενζο-2-πυρόνη, 1,2-βενζοπυρόνη, 2H-1-βενζοπυραν-2-όνη, λακτόνη του cis-o-κουμαρινικού οξέος, 2H-βενζο[b]-πυραν-2-όνη, κουμαρινικός ανυδρίτης και 2H-χρωμεν-2-όνη.

Κουμαρινικά παράγωγα απαντούν ευρύτατα στο φυτικό βασίλειο, τόσο σε μορφή γενίνης όσο και ως γλυκοζιτικά παράγωγα. Προσδίδουν τη χαρακτηριστική οσμή στο κομμένο γρασίδι, ιδιαίτερα στο λευκό τριφύλλι, στις ορχιδέες, τα όσπρια και τα φύλλα των εσπεριδοειδών.

Σχεδόν όλες οι **κουμαρίνες** που απαντώνται στα Rutaceae υπάρχουν στο γένος *Citrus*. Μια σημαντική κουμαρίνη που αναφέρεται σε πολλά είδη *Citrus* είναι η osthole. Η λιμεπτινή βρίσκεται σε 20 είδη Rutaceae και αναφέρθηκε στα περισσότερα είδη *Citrus*. Ενώ από τις

φουρανοκουμαρίνες η bergaptol έχει αναφερθεί μόνο σε εσπεριδοειδή, κυρίως στο έλαιο λεμονιού και περγαμόντο (Benavente-Garcia *et al.*, 1997).



Σχήμα 1.4 Δομές κουμαρινών

1.6 Αιθέρια έλαια

1.6.1 Αιθέρια έλαια από τους καρπούς των εσπεριδοειδών

Το αιθέριο έλαιο του καρπού των εσπεριδοειδών βρίσκεται στο περικάρπιο και λαμβάνεται με μια από τις μηχανικές μεθόδους (απόξεση, συμπίεση κλπ.), είτε πριν από την εκχύμωση των καρπών είτε μετά από αυτή. Τα αιθέρια έλαια στο περικάρπιο περιέχονται σε αδένες που είναι διασπαρμένοι σε διάφορα βάθη και έχουν διάμετρο που κυμαίνεται από 0.6 έως 0.9 χιλιοστά (Σκουμπής 1988).

Η ποιότητα και η αξία του αιθέριου ελαίου εξαρτάται από το είδος του εσπεριδοειδούς από το οποίο λαμβάνεται. Έτσι τα γνωστά είδη κατατάσσονται, αναλόγως της αξίας του αιθέριου ελαίου με την εξής φθίνουσα σειρά: περγαμόντο, μανταρίνι, νεράντζι, λεμόνι, πορτοκάλι (Σκουμπής 1988).

Τα αιθέρια έλαια που λαμβάνονται από το περικάρπιο των εσπεριδοειδών χρησιμοποιούνται στην ποτοποιία, ζαχαροπλαστική, καραμελοποιία, φαρμακευτική, αρωματοποιία, σαπωνοποιία, βιομηχανία τροφίμων κλπ. (Σκουμπρής 1988).

1.6.2 Αιθέρια έλαια από τα άνθη των εσπεριδοειδών

Τα άνθη των εσπεριδοειδών περιέχουν αιθέριο έλαιο, που παραλαμβάνεται κυρίως με υδραπόσταξη και ονομάζεται νερολί (neroli). Το προϊόν ανάλογα με το φυτό το οποίο λαμβάνεται παίρνει και το όνομα, όπως π.χ. νερολί νεραντζιάς, λεμονιάς κλπ. Για να ληφθεί καλής ποιότητας νερολί, τα άνθη πρέπει να αποστάζονται αμέσως μετά την συλλογή τους. Εκτός από την μέθοδο της απόσταξης, για την παραλαβή των αιθέριων ελαίων από τα άνθη χρησιμοποιείται και η μέθοδος της εκχύλισης, είτε με πετρελαϊκό αιθέρα, είτε με ψυχρό λίπος. Τα νερολί χρησιμοποιούνται κυρίως στην αρωματοποιία καθώς και σε άλλες βιομηχανίες (σαπωνοποιία κλπ.) (Σκουμπρής 1988).

1.6.3 Αιθέρια έλαια από τα φύλλα και τους βλαστούς των εσπεριδοειδών

Τα φύλλα και οι βλαστοί (λαίμαργοι κλπ.) των εσπεριδοειδών περιέχουν αιθέριο έλαιο που λαμβάνεται με απόσταξη και ονομάζεται πετιγκρέϊν. Αυτό μοιάζει με το ανθόνερο αλλά είναι κατώτερης ποιότητας και χρησιμοποιείται κυρίως στην αρωματοποιία, σαπωνοποιία κλπ. Τα προς απόσταξη φύλλα και οι βλαστοί συλλέγονται την εποχή του κλαδέματος και αποστάζονται αμέσως (Σκουμπρής 1988).

1.6.4 Αιθέριο έλαιο κίτρου

Το *Citrus medica* (citron) ανήκει στην οικογένεια Rutaceae και έχει παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί ως ηρεμιστικό, αντιεμετικό, εντομοαπωθητικό, διουρητικό και αντιτοξικό. Στο ελληνικό νησί της Νάξου, τα φρούτα και τα φύλλα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή παραδοσιακού οινόπνευματώδους ποτού. Τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου, citron oil, είναι το λιμονένιο και το γ-τερπινένιο. Τα εμπιερχόμενα οξυγονωμένα παράγωγα (π.χ. geraniol) είναι υπεύθυνα για την λεπτή μυρωδιά του φλοιού. Το 90% του φλοιού του είναι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες με κυριώτερα το λιμονένιο και το π-κυμένιο. Το αιθέριο

έλαιο του *C. medica* παρουσιάζει *in vitro* αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες αξιολογώντας έτσι το εμπορικό του δυναμικό στην βιομηχανία τροφίμων (Franco-Vega *et al.*, 2016).

1.6.5 Αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού

Στην περίπτωση του γλυκού πορτοκαλιού (*Citrus sinensis* L. Osbeck), οι περισσότερες από τις μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με αιθέριο έλαιο που λαμβάνεται από τη φλοιό του πορτοκαλιού. Ο φλοιός περιέχει μια πληθώρα αρωματικών ουσιών που επεξεργάζονται σε αιθέρια έλαια και χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία τροφίμων ως γευστικοί παράγοντες, ως αντιμικροβιακά και αντιοξειδωτικά. Η αντιμικροβιακή δράση του αιθερίου ελαίου γλυκού πορτοκαλιού αποδίδεται κυρίως σε τερπένια που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των εσπεριδοειδών. Τα εκχυλίσματα εσπεριδοειδών έχουν επίσης αντιοξειδωτικές δραστηριότητες. Εκτός από τα σάκχαρα, τα οξέα και τους πολυσακχαρίτες, τα πορτοκάλια αποτελούν σημαντική πηγή φυτοχημικών όπως οι πολυφαινόλες, η βιταμίνη C και τα καροτενοειδή (Ng *et al.*, 2015).

1.6.6 Αιθέριο έλαιο γκρέιπφρουτ

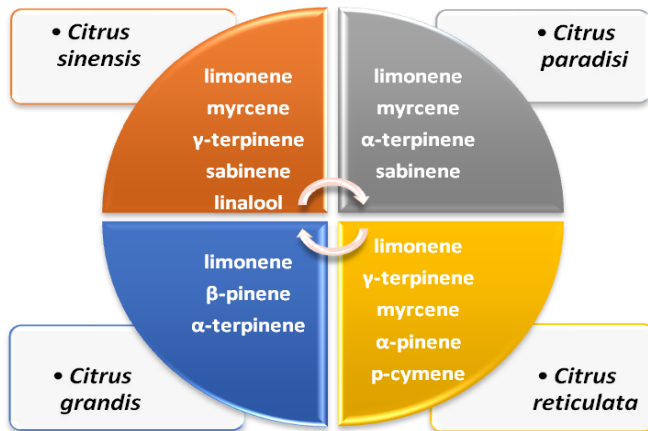
Το αιθέριο έλαιο γκρέιπφρουτ, *Citrus paradisi* Macfad, αν και λιγότερο γνωστό από μερικά άλλα αιθέρια έλαια, θεωρείται ως ένα ισχυρό έλαιο με αρκετές εφαρμογές σε τρόφιμα καθώς και θεραπευτικές εφαρμογές. Το έλαιο έχει βρεθεί ότι διαθέτει αντιοξειδωτικές, αντιμυκητιασικές, διουρητικές και διεγερτικές ιδιότητες (Viuda-Martos *et al.*, 2008). Η εισπνοή του αιθερίου ελαίου μπορεί να ρυθμίσει τη δραστηριότητα του Συμπαθητικού Συστήματος σε φυσιολογικούς ενήλικες, οδηγώντας σε χαλάρωση των λείων μυών των βρόγχων του οισοφάγου και του στομάχου. Τα κύρια συστατικό του είναι τα λιμονένιο και μυρκένιο (Edris, 2007). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι το γκρέιπφρουτ παρεμβαίνει στο μεταβολισμό ορισμένων θεραπευτικών φαρμάκων εάν ληφθεί από το στόμα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση κλινικά σημαντικών ανεπιθύμητων αντιδράσεων, όπως για παράδειγμα η αλληλεπίδραση με τις στατίνες μπορεί δυνητικά να οδηγήσει στην εμφάνιση μυασθένειας (Huang and Lesko, 2004).

1.7 Δρογοχημεία αιθερίων ελαίων

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα που βρέθηκαν αφορούν αιθέρια έλαια από περικάρπια και φύλλα εσπεριδοειδών, που έχουν συλλεχθεί σε διαφορετικές χώρες του κόσμου, όπως: Κένυα, Ταϊβάν, Κίνα, Ινδία, Ιαπωνία, Γαλλία, Νιγηρία, Μαυρίκιο.

Αιθέρια έλαια περικαρπίων

Οι κυριότεροι δευτερογενείς μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε περικάρπια των ειδών *Citrus paradisi*, *Citrus sinensis*, *Citrus grandis*, *Citrus reticulata* φαίνονται στο Σχήμα 1.5 και τον Πίνακα 1.3 που ακολουθεί.



Σχήμα 1.5 Οι κυριότεροι δευτερογενείς μεταβολίτες που ανιχνεύονται σε περικάρπια των ειδών: *Citrus paradisi*, *Citrus sinensis*, *Citrus grandis*, *Citrus reticulata*

Πίνακας 1.3 Χημική σύσταση αιθερίων ελαίων από τα περικάρπια των ειδών *Citrus paradisi*, *Citrus sinensis*, *Citrus grandis*, *Citrus reticulata*

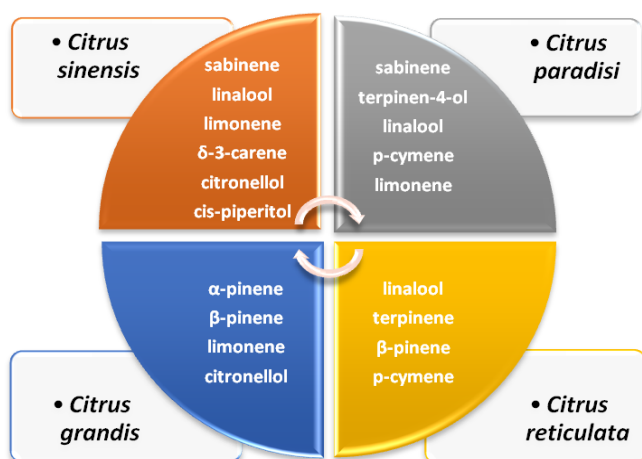
ΕΙΔΟΣ	ΕΝΩΣΕΙΣ (%)									Βιβλ. Πηγές
	α -pinene	β -pinene	Sabinene	Limonene	γ -terpinene	α -terpinene	Linalool	Myrcene	p-cymene	
<i>C. paradisi</i> (<i>Macfadyen forma</i> <i>Redblush</i>)	0.5	>0.05	0.4	91.1	>0.05	1.3	0.1	-	-	(Njoroge <i>et al.</i> , 2005)
<i>C. paradisi</i> (<i>Star Ruby</i>)	0.85	-	-	91.83	-	-	-	3.06	-	(Ou <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. sinensis</i> (Osbeck)	0.76	-	0.49	90.85	1.21	-	0.92	1.88	-	(Singh and Singh, 2002)
	0.1	0.5	-	94.8	-	-	-	-	-	(Singh and Singh, 2002)
	0.35	0.01	0.21	96.19	-	-	0.35	-	-	(Singh and Singh, 2002)
	0.41	-	0.37	96.57	-	-	0.12	-	-	(Qiao <i>et al.</i> , 2008)
<i>C. grandis</i> (<i>shaddock</i>)	0.50	>0.05	0.4	94.8	>0.05	1.8	0.1	-	-	(Darjazi, 2014)
<i>C. grandis</i> (Osbeck)	0.33	2.35	0.29	32.63	-	-	-	-	-	(Ou <i>et al.</i> , 2015)
<i>C. reticulata</i> (Blanco)	1.2	0.5	0.5	80.3	4.7	-	0.6	2.1	0.1	(Sawamura <i>et al.</i> , 2004)
	0.1-2.1	-	0.1-1.3	52.2-96.2	tr-36.7	-	0.1-2.5	1.3-1.8	-	(Lota <i>et al.</i> , 2000)

Στην βιβλιογραφία έχει μελετηθεί το αιθέριο έλαιο γκρέιπφρουτ από την Κένυα (Ou *et al.*, 2015) και την Ταϊβάν (Qiao *et al.*, 2008). Το *C. sinensis* Osbeck (sweet orange) είναι γηγενές προϊόν της Κίνας και της Ινδίας (Singh and Singh, 2002) και καλλιεργείται σε υποτροπικές περιοχές. Το έλαιο του περικάρπιου *C. grandis* Osbeck προέρχεται από καλλιέργειες στη Κένυα (Ou *et al.*, 2015), Ταϊβάν (Darjaki, 2014) και Ιράν (Sawamura *et al.*, 2004). Τέλος, το αιθέριο έλαιο του *C. reticulata* Blanco προέρχεται από την Ιαπωνία (Lota *et al.*, 2000) και τη Γαλλία (Njoroge *et al.*, 2005).

Συνοπτικά, τα κύρια συστατικά στα αιθέρια έλαια και των περικαρπίων των 5 ειδών εσπεριδοειδών είναι: μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες όπως (α-πινένιο, β-πινένιο το α- και γ-τερπινένιο, λιμονένιο), μονοτερπενικές αλκοόλες (σαβινένιο και λιναλοόλη) (σε ποσοστό > 90%) . Από τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες, το λιμονένιο έχει τα υψηλότερα ποσοστά, με σχετικά μεγάλη διακύμανση ανάλογα με το είδος του εσπεριδοειδούς καθώς και την γεωγραφική του προέλευση.

Αιθέρια έλαια φύλλων

Οι κυριότεροι δευτερογενείς μεταβολίτες των αιθερίων ελαίων των φύλλων των ειδών *Citrus paradisi*, *Citrus sinensis*, *Citrus grandis*, *Citrus reticulata* φαίνονται στο Σχήμα 1.6 και συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.



Σχήμα 1.6 Οι κυριότεροι δευτερογενείς μεταβολίτες των αιθερίων ελαίων των φύλλων των ειδών *Citrus paradisi*, *Citrus sinensis*, *Citrus grandis*, *Citrus reticulata*

Πίνακας 1.4 Οι κυριότεροι δευτερογενείς μεταβολίτες των αιθερίων ελαίων των φύλλων των ειδών *Citrus paradisi*, *Citrus sinensis*, *Citrus grandis*, *Citrus reticulata*.

ΕΙΔΟΣ	ΕΝΩΣΕΙΣ (%)											Βιβλ. Πηγές
	α -pinene	β -pinene	Sabinene	Limonene	Linalool	Terpinen-4-ol	Terpinene	Myrcene	p-cymene	δ -3-carene	Citronellol	
<i>C. paradisi</i> (<i>Macfadye</i>)	3.09	-	2.49	11.37	12.78	17.02	-	-	21.32	-	-	(Gurib-Fakim and Demarne, 1995)
	-	-	-	0.14	22.93	20.00	-	-	-	-	8.6	(Singh and Singh, 2002)
<i>C. sinensis</i> (<i>Osbeck</i>)	2.19-2.79	1.5-1.74	41.8-54.75	2.53-5.57	3.9-8.55	-	-	-	-	-	-	(Singh and Singh, 2002)
	0.88-1.75	1.06-1.30	15.81-32.58	1.25-2.96	5.13-20.92	-	-	-	-	-	-	(Singh and Singh, 2002)
	-	-	-	0.2	28.0	-	-	-	-	-	-	(Gurib-Fakim and Demarne, 1995)
<i>C. sinensis</i> (<i>Valencia</i>)	0.95	1.76	22.32	9.76	12.09	3.33	0.11	0.40	0.09	-	1.30	(Fraise and Scharff, 1988)
<i>C. grandis</i>	0.69-2.19	1.49-2.04	9.02-36.47	5.0-16.63	3.79-15.78	3.33-8.2	-	-	1.18-3.39	0.63-6.47	0.08-1.3	(Varkey <i>et al.</i> , 2014)

<i>C. grandis</i> (<i>Burm.</i>)	tr- 21.09	tr- 16.9 3	-	5.29- 78.45	1.19- 4.38	tr- 1.05	tr- 1.67	tr- 5.14	-	-	tr- 12.91	(Prasad <i>et al.</i> , 2016)
<i>C. reticulata</i>	1.52	0.02	-	3.35	21.82	-	-	3.31	5.75	47.36	-	(Singh and Singh, 2002)
<i>C. reticulata</i> (<i>Satsuma</i>)	1.3-2.1	5.8- 20.2	-	2.8-4.8	3.4- 15.2	-	0.1- 0.3	0.3- 0.7	-	-	-	(Ekunda yo <i>et al.</i> , 1990)
<i>C. reticulata</i> (<i>Blanco</i>)	3.9	4.71	-	3.63	9.55	-	20.15	0.63	1.74	-	-	(Lota <i>et al.</i> , 2000)

Οι Gurib-Fakim and Demarne (1995) μελέτησαν το αιθέριο έλαιο φύλλων *C. paradisi* από τη Νιγηρία χρησιμοποιώντας GC και GC-MS. Τα κύρια συστατικά αυτού ήταν τα p-cymene (21.32%), τερπινεν-4-ολη (17.02%), λιναλόλη (12.78%) και λιμονένιο (11.37%). Στο δείγμα αιθερίου ελαίου από το Μαυρίκιο (Singh and Singh, 2002) εντοπίστηκαν 45 δευτερογενείς μεταβολίτες με τη λιναλόλη (22.93%) και τη τερπινεν-4-ολη (20.00%) ως τα βασικά κύρια συστατικά.

Σε σειρά δειγμάτων αιθερίου ελαίου *C. sinensis* από το Ισραήλ (Singh and Singh, 2002) και την Κίνα (Singh and Singh, 2002) παρατηρήθηκε ότι το σαβινένιο ήταν το κύριο συστατικό. Οι Gurib-Fakim and Demarne (1995) ανέλυσαν την γλυκιά ποικιλία πορτοκαλιού και βρήκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό τη λιναλοόλη να κυριαρχεί (28%). Στο αιθέριο έλαιο του *C. grandis* από την Ν. Ινδία (Varkey *et al.*, 2014) 68 συστατικά με το σαβινένιο (9.02-36.47%) και τη λιναλόλη (3.79-15.78%) να υπερτερούν σε υψηλότερα ποσοστά. Διαφορετικό αιθέριο έλαιο των φύλλων *C. grandis* από τη Ν. Ινδία (Prasad *et al.*, 2016) κύριο συστατικό ήταν το λιμονένιο (5.29-78.45%) ενώ το α-πινένιο (tr-21.09%) και το β-πινένιο (tr-16.93%) βρέθηκαν σε σημαντικές ποσότητες. Σε άλλη μελέτη (Singh and Singh, 2002) που πραγματοποιήθηκε σε περιοχή της Ινδίας στο έλαιο της φράπας οι σημαντικότερες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν ήταν το β-caryophyllene (16.89%), η spathulenol (9.32%) και citronellol (28.26%).

Η ανάλυση από το φύλλο μανταρινιού (Singh and Singh, 2002) έδειξε ένα έλαιο πλούσιο σε δ-3-carene (47.36%). Οι (Ekundayo *et al.*, 1990) σύγκριναν την σύνθεση του αιθερίου ελαίου μανταρινιού που ήταν πλούσιο σε β-πινένιο. Αιθέριο έλαιο φύλλων μανταρινιού Νιγηρίας αναλύθηκε (Lota *et al.*, 2000) και έδειξε ότι το τερπινένιο (20.15%) ήταν το κύριο συστατικό.

1.8 Ελληνικά υβρίδια εσπεριδοειδών Δενδροκομικού Σταθμού Πόρου

Στην Ανατολική Πελοπόννησο τα εσπεριδοειδή έχουν ιστορία 200 χρόνων και συγκεκριμένα στο Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου το μεγαλύτερο τμήμα των γεωργικών εκτάσεων αποτελείται από δενδρώδεις καλλιέργειες (90.8%).

Ο Δενδροκομικός Σταθμός Πόρου είναι ένα πρότυπο κέντρο, 800 στρεμάτων από τα οποία 300 είναι φυτείες εσπεριδοειδών. Σύμφωνα με το ΦΕΚ 890/Β/19.09.96 ο Δενδροκομικός Σταθμός είναι Διατηρητής Ποικιλιών Εθνικού Καταλόγου Δενδρωδών Καλλιεργειών. Λόγω των άριστων εδαφοκλιματικών συνθηκών οι ποικιλίες εσπεριδοειδών που παράγονται είναι υπερπρώϊμες και όψιμες. Από τις όψιμες ποικιλίες εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το «Οval Valencia Πόρου» που δημιουργήθηκε από τις δεκαετίες του '50-'60 στο Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου και αποτελεί ένα κλώνο ξεχωριστού ενδιαφέροντος αφού η σχέση σακχάρων προς οξέα είναι πολύ καλή (>10). Είναι ιδιαίτερα σημαντική η διαπιστευμένη ταυτότητα των ποικιλιών, του Σταθμού, η απουσία ιώσεων και λοιπών εμβολιομεταδόσιμων παθογόνων, γεγονός που είναι βασικό για τη παραγωγή πιστοποιημένων δενδρυλλίων εσπεριδοειδών.

Στον μεγάλο αριθμό δένδρων που καλλιεργούνται εκεί περιλαμβάνονται δένδρα εσπεριδοειδών: *C. sinensis*, *C. paradisi*, *C. grandis* και *C. reticulata*. Επτά υβρίδια , αποτέλεσαν το αντικείμενο αυτής της διπλωματικής εργασίας.



Εικόνα 1.16 Δενδροκομικός Σταθμός Πόρου - Το παλαιότερο γυάλινο θερμοκήπιο.

Τα υβρίδια από τον Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία είναι τα ακόλουθα, με τους αντίστοιχους κωδικούς για τα περικόρπια και τα φύλλα:

1. *Citrus paradisi* cv Star Ruby x νερατζιά (*Citrus aurantium* L.)
2. *Citrus sinensis* cv New Hall x citrusmelo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*)
3. *Citrus sinensis* cv New Hall x trifoliata
4. *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x citrusmelo
5. *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x trifoliata
6. *Citrus grandis* cv Cuba Shaddock x trifoliata
7. *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata

Όπου *Citrus paradisi* είναι το γκρέιπφρουτ, *Citrus sinensis* είναι η πορτοκαλιά, *Citrus grandis* είναι η φράπα (κουβανέζικη φράπα) ενώ *Citrus reticulata* είναι η μανταρινιά.

Οι παρακάτω ποικιλίες εσπεριδοειδών περιλαμβάνονται στον εθνικό κατάλογο ποικιλιών δενδρωδών καλλιεργειών – έτος 1996 (ΦΕΚ 890/Β/19.09.96).

Η **Star Ruby** είναι η αιματόσαρκτη ποικιλία του είδους γκρέιπφρουτ που καλλιεργείται εμπορικά στην Ελλάδα. Μερικά από τα χαρακτηριστικά της είναι ο έντονος χρωματισμός, η

υψηλή περιεκτικότητα χυμού, η αργή ανάπτυξη και η ευαισθησία σε παθογόνους ωομύκητες του εδάφους και στα ζιζανιοκτόνα.

Η **New Hall** είναι ομφαλοφόρα ποικιλία του πορτοκαλιού και η αξία της έγκειται στην άριστη ποιότητα των καρπών, στην πρωιμότητα και στην ανθεκτικότητά της στους αέρηδες.

Η **Oval Valencia Πόρου** είναι σημαντική ποικιλία των κοινών πορτοκαλιών και υπερτερούν των ομφαλοφόρων πορτοκαλιών καθώς έχουν μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα και μπορεί να ευδοκιμήσουν σε μεγαλύτερη ποικιλία εδαφικών και κλιματικών συνθηκών.

Το **Cuba shaddock** είναι λευκόσαρκη ποικιλία της φράππας και πρόκειται για δέντρο μετρίου μεγέθους, αρκετά παραγωγικού.

Το **Tangelo Minneola** είναι ποικιλία που έχει προέλθει από τον υβριδισμό μεταξύ κλημεντίνης και γκρέιπφρουτ (*C. reticulata* x *C. paradisi*). Το δέντρο είναι παραγωγικό, ωστόσο, για καλή καρποφορία χρειάζεται σταυρογονιμοποίηση και συστήνεται να φυτεύεται με κλημεντίνη.

Όσον αφορά τα υποκείμενα που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία των υβριδίων, η **νερατζιά** (*Citrus aurantium* L.) παρουσιάζει ένα σύνολο καλών χαρακτηριστικών, όπως η ζωηρότητα, η καλή παραγωγικότητα, η πολύ καλή ποιότητα καρπών που προσδίδει στην εμβολιασμένη ποικιλία, η ανθεκτικότητα στην φυτόφθορα και η προσαρμογή σε διάφορους τύπους εδαφών.

Το **citrumelo** είναι το υποκείμενο που προέκυψε από τη διασταύρωση της τρίφυλλης πορτοκαλιάς με το γκρέιπφρουτ (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*). Δίνει μεγάλες παραγωγές και επιταχύνει το χρόνο εισόδου στην καρποφορία.

Στο γένος *Poncirus* ανήκει το είδος **trifoliata**. Ο καρπός του δεν είναι εδώδιμος. Έχει μεγάλη αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες. Χρησιμοποιείται ως υποκείμενο και για παραγωγή νέων υποκειμένων με υβριδισμό (Βασιλακάκης, 2004; Nicolosi, 2007).

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό

Στην εργασία αυτή αναλύθηκαν χημικά και μελετήθηκαν αιθέρια έλαια περικορπίων και φύλλων επτά (7) επιλεγμένων Ελληνικών υβριδίων (περικόρπια και φύλλα) εσπεριδοειδών (Rutaceae) όπως φαίνονται παρακάτω με τους αντίστοιχους κωδικούς:

1. *Citrus paradisi* cv Star Ruby x νερατζιά (*Citrus aurantium* L.), Κωδ.: GREP1
2. *Citrus sinensis* cv New Hall x citrumelo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*), Κωδ.: N-CiSin2 & FN-CiSin2
3. *Citrus sinensis* cv New Hall x trifoliata, Κωδ.: N-TrSin3 & FN-TrSin3
4. *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x citrumelo, Κωδ.: O-CiSin4 & FO-CiSin4
5. *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x trifoliata, Κωδ.: O-TrSin5 & FO-TrSin5
6. *Citrus grandis* cv Cuba Shaddock x trifoliata, Κωδ.: FRAP6 & FFRAP6
7. *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata, Κωδ.: MANT7 & FMANT7

Η ταυτοποίηση του φυτικού υλικού έγινε με βάση το πρωτόκολλο του Σταθμού.

2.2 Μέθοδοι παραλαβής των αιθερίων ελαίων

Οι καρποί συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών προϊόντων του ΕΚΠΑ και τα αιθέρια έλαια των περικορπίων παραλήφθηκαν άμεσα με την μέθοδο της έκθλιψης. Οι καρποί αποφλοιώθηκαν και στη συνέχεια τα εξοκάρπια πιέστηκαν για να διαρραγούν οι ελαιώδεις αδένες και να απελευθερωθεί το αιθέριο έλαιο. Τα φύλλα υποβλήθηκαν σε απόσταξη με υδρατμούς για 3 ώρες, σε τροποποιημένη συσκευή Clevenger με υποδοχέα αιθέριου ελαίου που ψύχεται με κυκλοφορία νερού.

Όλα τα αιθέρια έλαια παραλήφθηκαν σε φιαλίδια με προσθήκη άνυδρου θειϊκού νάτριου για ελάττωση της υγρασίας. Είχαν ανοιχτό κίτρινο έως πορτοκαλί χρώμα, και χαρακτηριστική οσμή. Η φύλαξή τους έγινε στους 4-6°C μέχρι την ανάλυσή τους. Η ποιοτική τους ανάλυση έγινε με αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματοσκοπία μάζας (GC-MS).

2.3 Χρωματογραφικός διαχωρισμός

2.3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)

Τα δείγματα ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε πλάκες αλουμινίου με επίστρωση γέλης πυριτίου (silica gel) και δείκτη φθορισμού (Kieselgel 60 F₂₅₄ διαστάσεων 20x20cm) σε διάφορα συστήματα ανάπτυξης.

Μετά την ανάπτυξη των πλακών ακολούθησε η παρατήρησή τους σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας σε μήκη κύματος 254nm και 366nm και στη συνέχεια ο ψεκασμός αυτών με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης (που παρασκευάζεται με ανάμειξη ίσων ποσοτήτων από 95% βανιλίνη σε MeOH και 95% H₂SO₄ σε MeOH) και σύντομη θέρμανση των πλακών σε θερμοκρασία ~300°C.

2.3.2 Παρασκευαστική Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (PREP-TLC)

Πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία σε γυάλινες πλάκες με επίστρωση γέλης πυριτίου (silica gel) και δείκτη φθορισμού (Kieselgel 60 F₂₅₄) διαστάσεων 20x20cm και με τα κατάλληλα συστήματα οργανικών διαλυτών στο θάλαμο ανάπτυξης, για την απομόνωση επιλεγμένων ζωνών. Στη συνέχεια παραλήφθηκαν τα ενδιαφέροντα χημικά συστατικά με εκχυλίσεις με κατάλληλης πολικότητας διαλύτες και διήθηση.

2.4 Μέθοδοι Ανάλυσης

2.4.1 Αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Η ανάλυση των πτητικών συστατικών πραγματοποιήθηκε στον αέριο χρωματογράφο Hewlett-Packard 7820A, συνδεδεμένο με σύστημα φασματογράφου μάζας Hewlett-Packard 5977B που λειτουργεί με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια (EI) και με ενέργεια ιονισμού 70 eV. Ο αέριος χρωματογράφος είναι εξοπλισμένος με έναν split / splitless εισαγωγέα με λόγο διαχωρισμού 1:10 και μια τριχοειδή στήλη HP 5MS με μήκος 30 m, εσωτερική διάμετρο 0.25 mm και πάχος μεμβράνης 0.25 μm. Στο πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε η θερμοκρασία στο θάλαμο εισαγωγής του δείγματος ήταν 220°C. Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ήταν 60°C για 5 min και με αύξηση 3°C/min έφτανε στους 280°C, όπου παρέμενε για 15 min. Ο συνολικός χρόνος

ανάλυσης ήταν 93 min. Το φέρον αέριο ήταν He. Η ταυτοποίηση έγινε με χρήση της βιβλιοθήκης Wiley275 και με βιβλιογραφικά δεδομένα.

Τα συστατικά που διαχωρίζονται στο χρωματογράφο, εκλύονται σε αέρια κατάσταση από τη στήλη, έπειτα εισάγονται στην πηγή ιονισμού και αναλύονται στο φασματόμετρο μάζας σύμφωνα με τη σειρά εξαγωγής τους από τη στήλη GC. Με το σύστημα κενού του φασματόμετρου μάζας μπορούν να επιτευχθούν ροές χρωματογραφικής στήλης 1-2 ml/min.

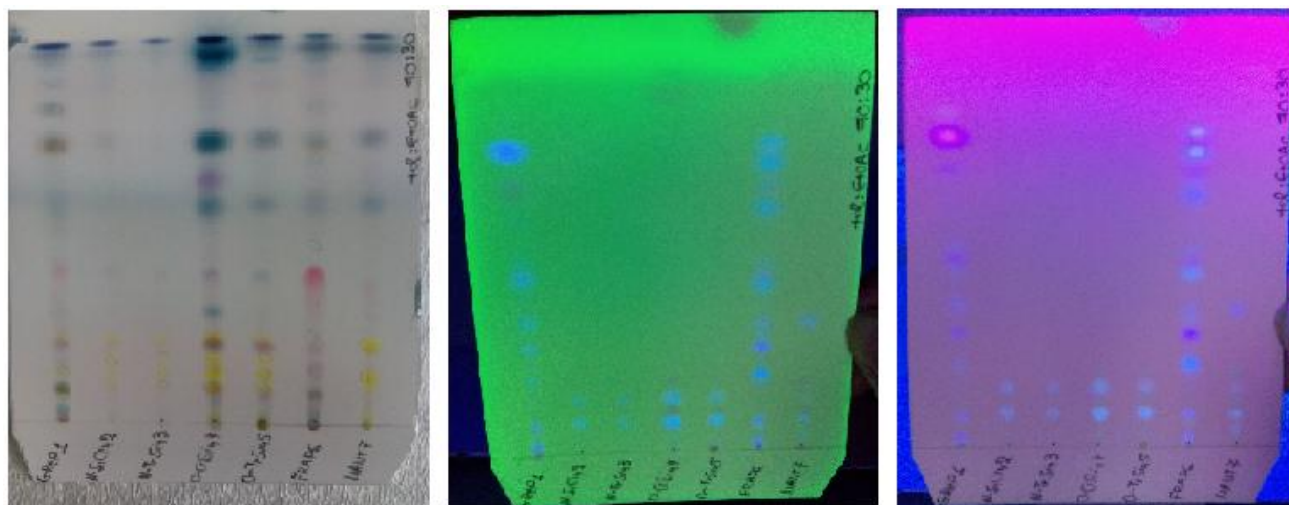
2.4.2 Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROMETRY, NMR) για τη μελέτη της σχέσης δομής-δραστηκότητας.

Φάσματα ^1H -NMR λήφθηκαν σε όργανο Bruker DRX 400 (400 MHz). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Οι χημικές μετατοπίσεις δίνονται σε τιμές δ (ppm) ενώ οι σταθερές σύζευξης J σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών των φασμάτων αποδίδεται ως εξής: s=μονή, brs=ευρεία απλή, d=διπλή, t=τριπλή.

Κεφάλαιο 3 Φυτοχημική Ανάλυση των εσπεριδοειδών

Αντικείμενο της εργασίας αυτής ήταν η συγκριτική μελέτη της χημικής σύστασης των αιθέριων ελαίων, των παραπάνω ταυτοποιημένων υβριδίων εσπεριδοειδών και η αξιολόγηση των βιολογικών τους δράσεων με σκοπό δυνητικά τη περαιτέρω χρήση στη βιομηχανία τροφίμων ή/και φαρμάκων. Όλα τα παραπάνω αιθέρια έλαια των υβριδίων μελετώνται για πρώτη φορά βιβλιογραφικά.

3.1 Απομόνωση με χρωματογραφικές τεχνικές



Εικ. 3.1 Σύστημα ανάπτυξης τολουόλιο - οξικό αιθυλεστέρα 70:30

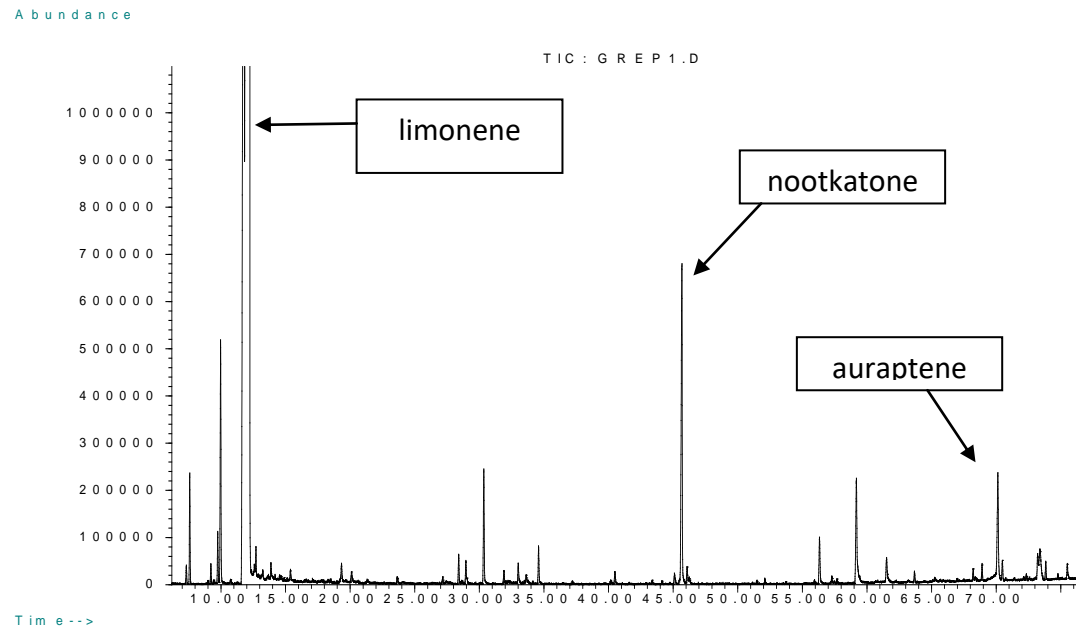
Τα αιθέρια έλαια των 7 περικαρπίων αναλύθηκαν ποιοτικά σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα ανάπτυξης τολουόλιο-οξικό αιθυλεστέρα με αναλογία 70:30.

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν παρασκευαστικές χρωματογραφίες λεπτής στιβάδας (PREP-TLC) με το παραπάνω σύστημα ανάπτυξης, στα υβρίδια *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x citrusmelo με κωδικό O-CiSin4 και *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata με κωδικό Mant7.

Επιλέχθηκαν τα παραπάνω υβρίδια για περαιτέρω αναλύσεις και απομονώσεις δευτερογενών μεταβολιτών γιατί τα συγκεκριμένα έλαια διέθεταν ικανές ποσότητες (30.5 mg για το O-CiSin4 και 15.1 mg για το Mant7 αντίστοιχα).

3.2 Ανάλυση αιθερίων ελαίων περικαρπίων με Αέρια Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)

3.2.1 *Citrus paradisi* cv Star Ruby x νερατζιά (Κωδικός: GREP1)



Εικ. 3.2 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου περικαρπίου του GREP1

Πίνακας 3.1 Συστατικά αιθερίου ελαίου περικαρπίου του GREP1

A/A	ΕΝΩΣΗ	AREA %
1	α-pinene	0.92
2	sabinene	0.15
3	myrcene	2.39
4	limonene	84.32
5	trans-β-ocimene	0.22
6	terpinen-4-ol	0.21
7	α-copaene	0.26
8	β-cubebene	0.23
9	β-caryophyllene	1.02
10	α-humulene	0.12
11	germacrene D	0.21
12	δ-cadinene	0.35
13	nootkatone	3.76
14	o-methylated coumarin (osthole)	0.48
15	7-methoxy-8-(2-oxo-3-methylbutyl)coumarin	1.46

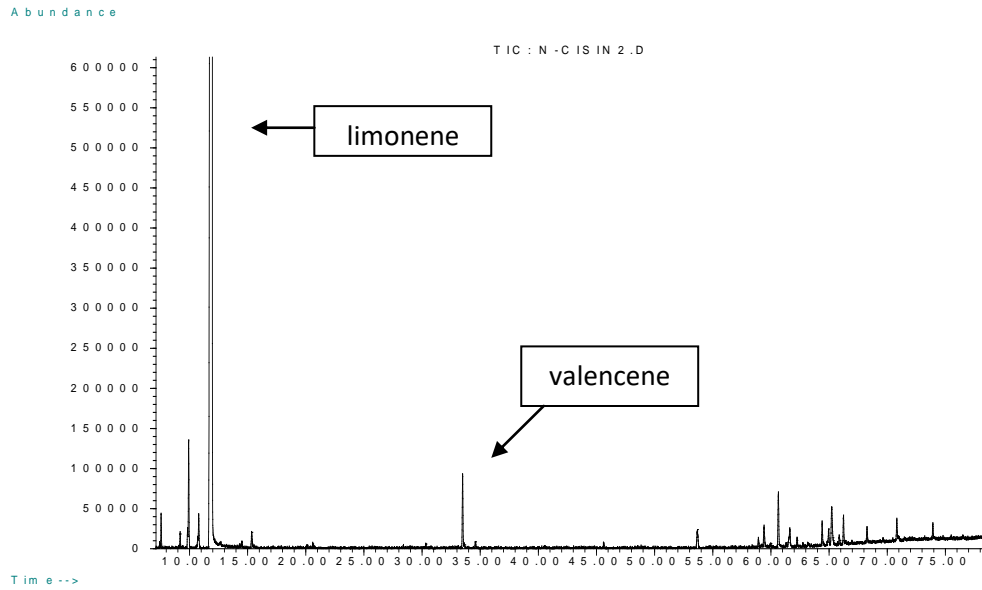
16	auraptene (7-geranyloxycoumarin)	1.54
17	linoleic acid	0.10
18	heptamethoxyflavone	0.12
19	hexamethoxyflavone	0.10
Σύνολο		97.96

Στο αιθέριο έλαιο του περικαρπίου του υβριδίου *Citrus paradisi* cv Star Ruby x νερατζιά ταυτοποιήθηκαν 19 συστατικά, εκ των οποίων το λιμονένιο αποτελεί το κύριο δευτερογενή μεταβολίτη με ποσοστό 84.32%. Στο αιθέριο έλαιο βρέθηκε επίσης το σεσκιτερπένιο ποοτκαtone (3.76%), ουσία που έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την ακετυλοχολινεστεράση (Miyazawa *et al.*, 2001) και αποτελεί πολύτιμο και ακριβό δευτερογενή μεταβολίτη των αιθερίων ελαίων εσπεριδοειδών (Furusawa *et al.*, 2005). Το μονοτερπένιο μυρκένιο (myrcene) (2.39%) και οι κουμαρίνες auraptene (συνώνυμο 7-geranyloxycoumarin) (1.54%), 7-methoxy-8-(2-oxo-3-methylbutyl)coumarin (1.46%) και σε ελάχιστο ποσοστό η o-methylated coumarin (osthole), όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.1.

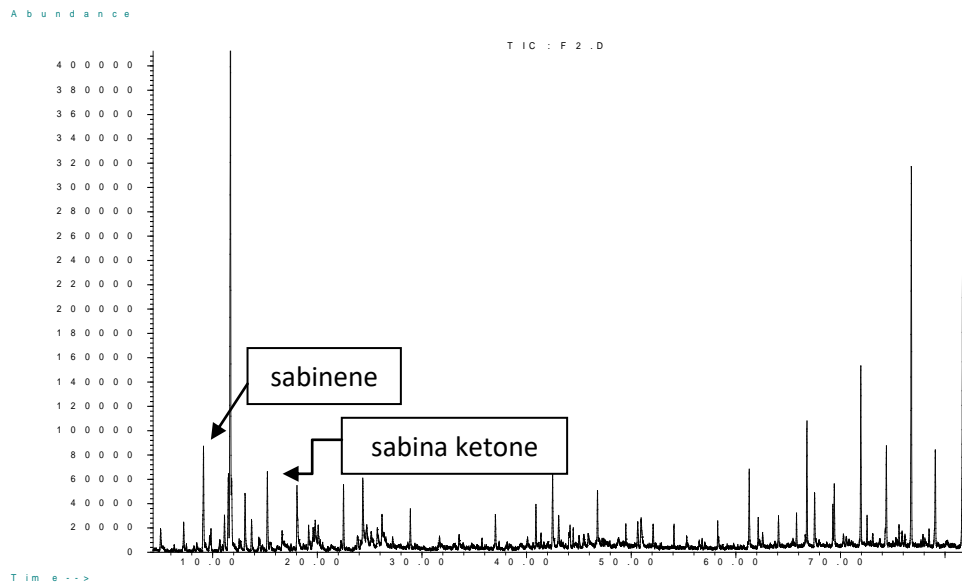
Η ύπαρξη των κουμαρινών σε συνολικό ποσοστό 3.48% στο αιθέριο έλαιο έχει ενδιαφέρον καθώς είναι γνωστες βιοδραστικές ουσίες (με αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, κυτταροτοξικές και νευροπροστατευτικές δράσεις (Hung *et al.*, 2017). Επίσης, παρατηρήθηκε η ύπαρξη σε μικρά ποσοστά hexamethoxy και heptamethoxy-flavone που ανήκουν στις πολυμεθοξυφλαβόνες και αποτελούν χαρακτηριστικούς δευτερογενείς μεταβολίτες της οικογένειας Rutaceae (Steinke *et al.*, 2013; Swift, 1964; Li *et al.*, 2006; Manthey, 2006).

Βιβλιογραφικά έχει μελετηθεί το υβρίδιο (Cimen *et al.*, 2016) ως προς την φωτοσυνθετική του ικανότητα, χωρίς όμως να έχει πραγματοποιηθεί ανάλυση του αιθερίου ελαίου. Έτσι για πρώτη φορά γίνεται η ανάλυση του αιθερίου ελαίου.

3.2.2 *Citrus sinensis* cv New Hall x citrumelo (Κωδικός: N-CiSin2 & FN-CiSin2)



Εικ. 3.3 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου περικαρπίου του N-CiSin2



Εικ. 3.4 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου φύλλων του FN-CiSin2

Πίνακας 3.2 Συστατικά αιθερίου ελαίου περικαρπίων και φύλλων του N-CiSin2& FN-CiSin2

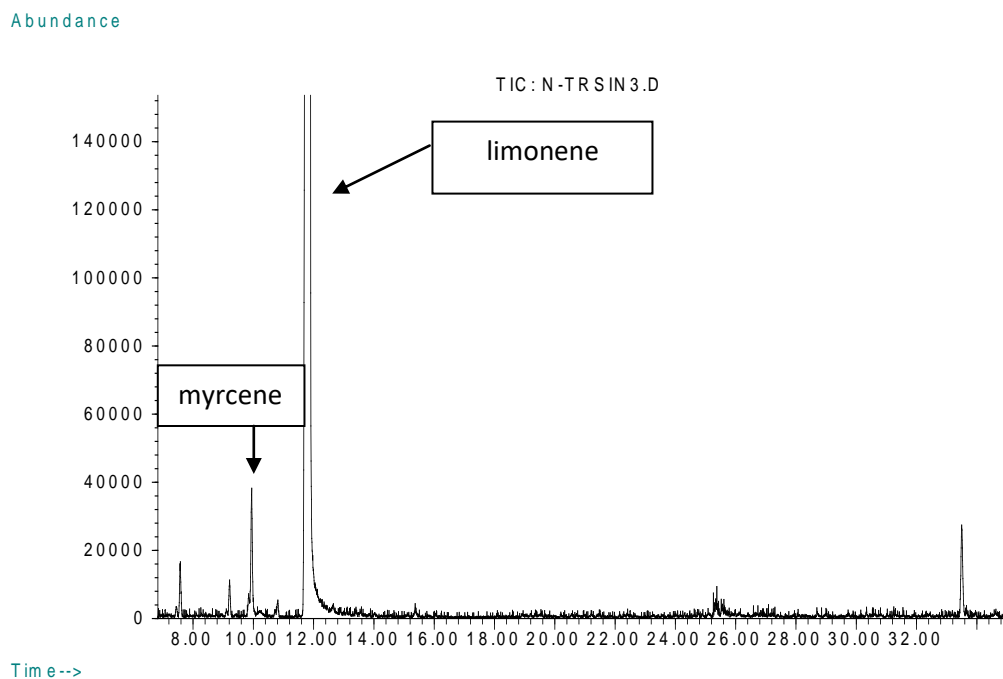
A/A	Ένωση	Περικάρπιο %	Φύλλα %
1	α-thujene		0.86
2	α-pinene	0.51	
3	sabinene	0.25	3.19
4	α-terpinene		1.12
5	myrcene	2.06	
6	δ-3-carene	0.19	
7	limonene	87.69	17.34
8	p-cymene		2.36
9	1,8-cineole		1.78
10	γ-terpinene		1.89
11	linalool	0.13	2.40
12	sabina ketone		2.99
13	terpinen-4-ol		0.50
14	myrtenol		1.22
15	linalyl acetate		1.77
16	estragole		2.17
17	β-elemene		1.23
18	caryophyllene oxide		1.1
19	valencene	1.36	
20	palmitic acid	0.58	
21	tricosane		2.26
22	tetracosane		0.82
23	pentacosane		3.41
24	hexacosane		1.83
25	heptacosane		5.04
26	octacosane		3.10
27	nonacosane		10.49
28	triacontane		3.19
29	hentriacontane		15.25
30	4',5,6,7-tetramethoxyflavone	1.24	
31	unknown		5.20
Σύνολο		94.01	92.60

Στο αιθέριο έλαιο του περικάρπιου του υβριδίου *Citrus sinensis* cv New Hall x citrumelo ταυτοποιήθηκαν 10 συστατικά, εκ των οποίων το λιμονένιο αποτελεί τον κύριο δευτερογενή μεταβολίτη (87.69%). Σε σχετικά υψηλό ποσοστό στο αιθέριο έλαιο βρέθηκε επίσης το μονοτερπένιο μυρκένιο (myrcene) (2.06%) και ακολουθεί το σεσκιτερπένιο βαλενσένιο (valencene) (1.36%), ενώ παρατηρήθηκε η ύπαρξη της 4',5,6,7-tetramethoxyflavone (1.24%) (τετραμέθυλο παράγωγο scutellarein) που ανήκει στις πολυμεθοξυφλαβόνες.

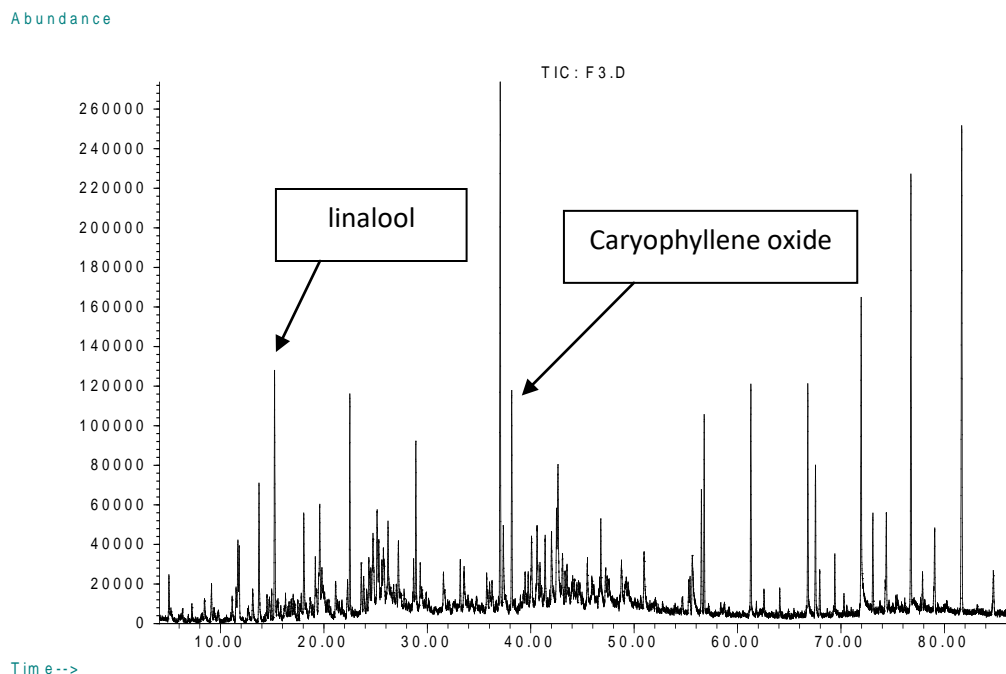
Στο αιθέριο έλαιο των φύλλων ταυτοποιήθηκαν 24 συστατικά, με κύριο το λιμονένιο σε ποσοστό 17.34% ακολουθούμενο από τα σαβινένιο (sabinene) και sabina ketone με ποσοστά 3.19% και 2.99%, αντίστοιχα. Με χαμηλότερο ποσοστό ανιχνεύθηκαν επίσης οι λιναλοόλη (linalool) και π-κυμένιο (p-cymene) ενώ οι κανονικοί υδρογονάνθρακες εμφανίσθηκαν σε ποσοστό > 40%.

Το συγκεκριμένο υβρίδιο πορτοκαλιού μελετάται για πρώτη φορά διεθνώς σε αυτή την εργασία.

3.2.3 *Citrus sinensis* cv New Hall x trifoliata (Κωδικός: N-TrSin3 & FN-TrSin3)



Εικ. 3.5 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου περικαρπίου του N-TrSin3



Εικ. 3.6 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου φύλλων του FN-TrSin3

Πίνακας 3.3 Συστατικά αιθερίου ελαίου περικάρπιων και φύλλων του N-TrSin3 & FN-TrSin3

A/A	Ένωση	Περίκάρπιο %	Φύλλα%
1	α-pinene	0.62	
2	sabinene	0.40	0.58
3	myrcene	1.88	
4	limonene	95.61	1.32
5	1,8-cineole		1.1
6	sabinehydrate		2.18
7	linalool		3.93
8	sabina ketone		2.18
9	terpinen-4-ol		0.80
10	p-cymen-8-ol		2.04
11	linalyl acetate		2.77
12	trans-anethole		1.21
13	carvacrol		2.05
14	car-3-en-2-one		1.21
15	limonene oxide		0.95
16	β-elemene		2.39
17	2-pinen-4-ol		0.82
18	alloaromadendrene		0.83
19	elemol		0.25
20	caryophyllene		7.88

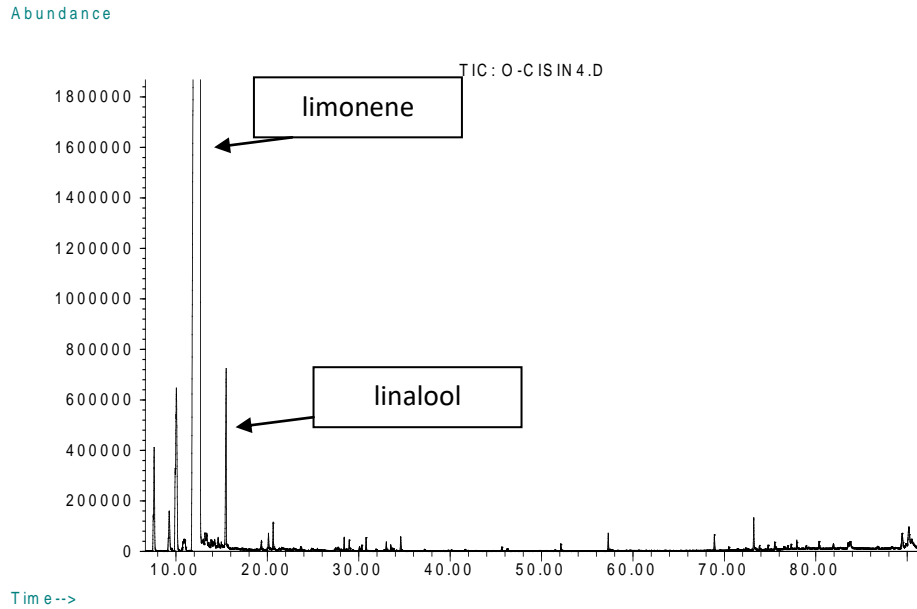
	oxide		
21	β-selinene		1.73
22	globulol		1.45
23	nootkatone		1.59
24	isopathulenol		3.54
25	hexahydrofarnesyl acetone		1.43
26	ledenoxide		1.27
27	phytol		1.45
28	piperitol		1.67
29	neophytadiene		2.44
30	pentadecane		3.23
31	eicosane		0.61
32	pentacosane		3.09
33	hexacosane		0.80
34	heptacosane		5.39
35	octacosane		1.33
36	nonacosane		6.02
37	hentriacontane		8.27
38	valencene	1.26	
39	unknown		8.2
Σύνολο		99.77	88.06

Στο αιθέριο έλαιο του περικαρπίου του υβριδίου *Citrus sinensis* cv New Hall x trifoliata ταυτοποιήθηκαν μόνον 5 συστατικά, εκ των οποίων το λιμονένιο βρέθηκε σε πολύ υψηλό ποσοστό 95.61% ακολουθούμενο από το μονοτερπένιο μυρκένιο 1.88%.

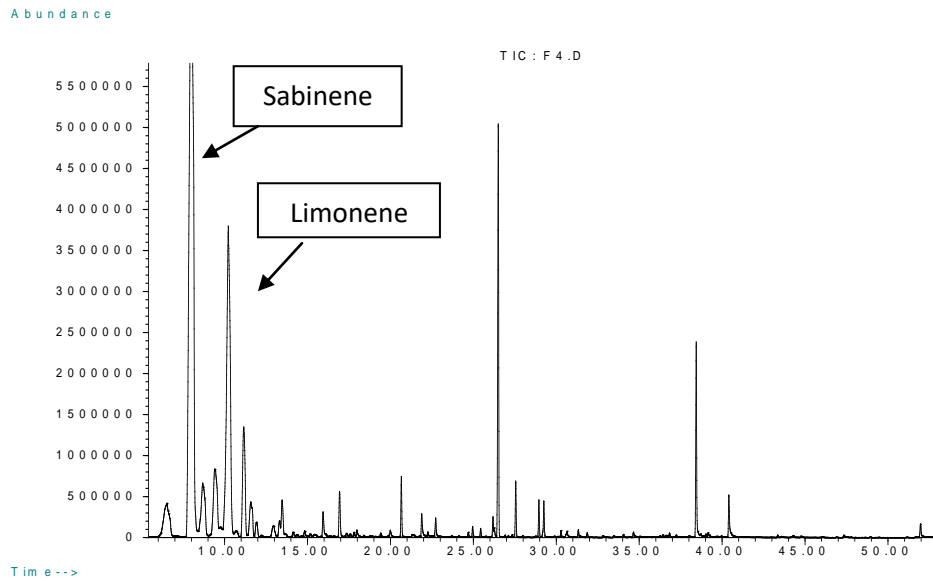
Στο αιθέριο έλαιο των φύλλων ταυτοποιήθηκαν 35 συστατικά, με κύριο αυτών το οξειδίο του καρυοφυλλενίου (caryophyllene oxide) σε ποσοστό 7.88%. Η ένωση έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται στην παρασκευή αρωμάτων αλλά και στην βιομηχανία τροφίμων (Venkata *et al.*, 2012). Σε υψηλό ποσοστό βρέθηκαν επίσης οι μεταβολίτες: λιναλοόλη (3.93%) και ισοπαθουλενόλη (isopathulenol) (3.54%) ενώ οι κανονικοί υδρογονάνθρακες καταλαμβάνουν στο σύνολό τους ποσοστό >25%. Σε αυτό το δείγμα το ποσοστό των λιμονενίου (1.32%) και σαβινενίου (0.58%) είναι πολύ χαμηλό σε σύγκριση με το αιθέριο έλαιο των φύλλων του προηγούμενου υβριδίου.

Οι Guidong *et al* (2011) έχουν μελετήσει το συγκεκριμένο υβρίδιο ως προς την απόδοση του χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο ιχνοστοιχείο, όμως δεν έχει γίνει αναφορά στο αιθέριο έλαιο του. Πρώτη φορά γίνεται ανάλυση του αιθερίου ελαίου στη συγκεκριμένη εργασία.

3.2.4 Citrus sinensis cv Oval Valencia Πόρου x citrumelo (Κωδικός: O-CiSin4 & FO-CiSin4)



Εικ. 3.7 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου περικαρπίου του O-CiSin4



Εικ. 3.8 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου φύλλων του FO-CiSin4

Πίνακας 3.4 Συστατικά αιθερίου ελαίου περικάρπιων και φύλλων του O-CiSin4 & FO-CiSin4

A/A	Ένωση	Περικάρπιο%	Φύλλα%
1	α-pinene	0.99	3.27
2	sabinene	0.43	43.74
3	β-pinene	0.45	
4	myrcene	2.20	3.69
5	δ-3-carene		3.96
6	β-terpinene	0.09	
7	limonene	89.10	18.84
8	trans-β-ocimene		4.86
9	γ-terpinene		1.86
10	sabinene hydrate		0.94
11	terpinolene		0.51
12	linalool	1.34	1.02
13	citronellal		0.63
14	terpinen-4-ol	0.07	1.02
15	α-terpineol	0.11	
16	linalyl acetate		0.95
17	trans-anethole		0.49
18	citronellyl propionate		0.18
19	neryl acetate		0.15
20	α-copaene	0.08	
21	β-elemene		7.23
22	β-caryophyllene	0.04	0.86
23	α-humulene		0.57
24	trans-β-farnesene		0.61
25	germacrene D	0.13	
26	β-cubebene	0.08	
27	δ-cadidene	0.10	
28	valencene	0.03	
29	β-sinensal		3.10
30	α-sinensal		0.88

31	nootkatone	0.03	
32	decanal	0.16	
33	phytol		0.27
34	palmitic acid	0.03	
35	linoleic acid	0.10	
36	pentamethoxyflavone	0.13	
37	tetramethoxyflavone	0.12	
38	heptamethoxyflavone	0.14	
39	hexamethoxyflavone	0.12	
Σύνολο		97.13	99.63

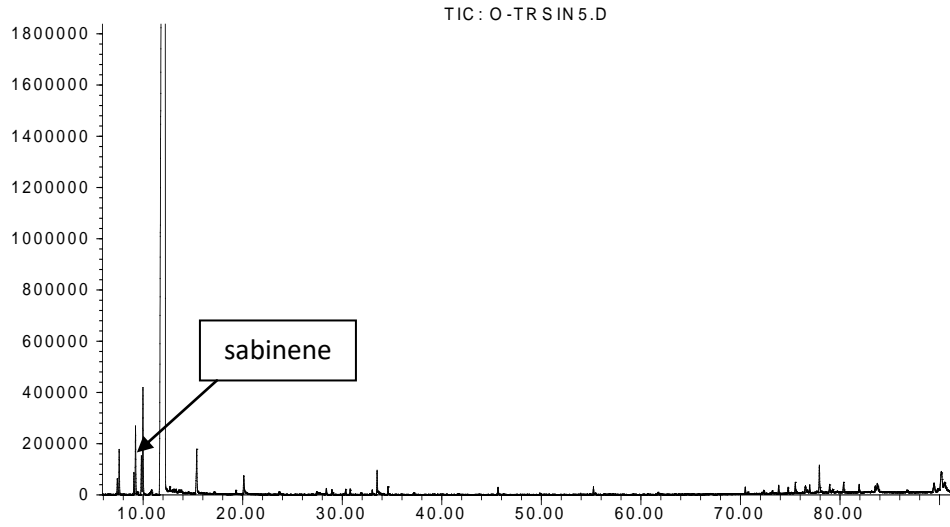
Στο αιθέριο έλαιο του περικαρπίου του υβριδίου *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x citrumelo ταυτοποιήθηκαν 23 συστατικά, εκ των οποίων το λιμονένιο βρέθηκε σε ποσοστό 89.10%. Σε σχετικά υψηλό ποσοστό στο αιθέριο έλαιο βρέθηκε επίσης το μονοτερπένιο μυρκένιο (2.20%) και η λιναλοόλη ενώ όλα τα υπόλοιπα συστατικά του ελαίου βρίσκονται σε ποσοστό μικρότερο του 1%. Παρατηρούμε επίσης στο συγκεκριμένο αιθέριο έλαιο, όπως αναφέρθηκε και στις προηγούμενες αναλύσεις, την ύπαρξη σε μικρά ποσοστά πολυμεθοξυφλαβονών.

Στο αιθέριο έλαιο των φύλλων του υβριδίου *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x citrumelo ταυτοποιήθηκαν 25 συστατικά, με κυριότερα το σαβινένιο σε ποσοστό 43.74%, το λιμονένιο (18.84%) καθώς και το β-ελεμένιο (7.23%). Άκολουθούν τα μονοτερπένια trans-β-ocimene, δ-3-carene, μυρκένιο, α-πινένιο (3-5%).

Η ποικιλία Oval Valencia Πόρου δημιουργήθηκε από τις δεκαετίες του '50-'60 στο Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου. Δεν έχει μελετηθεί προηγουμένως η συγκεκριμένη ποικιλία και το συγκεκριμένο υβρίδιο.

3.2.5 *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x trifoliata (Κωδικός: O-TrSin5 & FO-TrSin5)

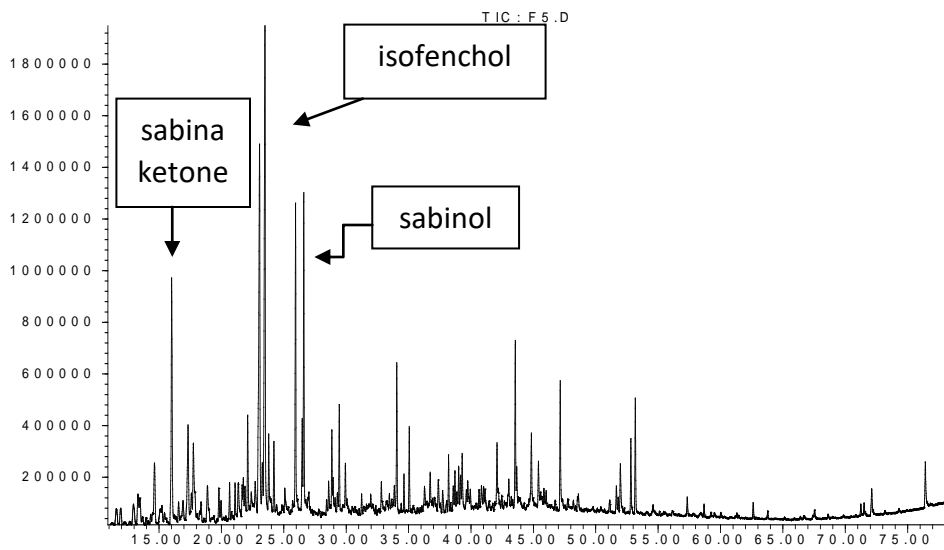
Abundance



Time-->

Εικ. 3.9 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου περικαρπίων του O-TrSin5

Abundance



Time-->

Εικ. 3.10 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου φύλλων του FO-TrSin5

Πίνακας 3.5 Συστατικά αιθερίου ελαίου περικαρπίων του O-TrSin5 & FO-TrSin5

A/A	Ένωση	Περικάρπιο %	Φύλλα%
1	α-thujene		0.18
2	α-pinene	0.87	
3	sabinene	1.29	0.56
4	α-terpinene		0.22
5	phellandrene		0.50
6	myrcene	0.54	
7	β-pinene	1.71	
8	limonene	89.82	0.19
9	γ-terpinene		0.36
10	linalool	0.86	
11	sabinene hydrate		0.59
12	α-thujone		2.48
13	verbenol		0.14
14	sabina ketone		6.97
15	α-terpineol	0.47	
16	p-cymen-8-ol		3.49
17	myrtenol		2.92
18	trans-carveol		1.71
19	cuminal		0.67
20	linalyl acetate		0.83
21	3-methylcamphor		1.23
22	isocyclocitral		0.50
23	2-carene-10-al		0.62
24	cuminol		2.10
25	isofenchol		15.71
26	p-mentha-1,4 dien-7-ol		1.55
27	sabinol		6.61
28	β-elemene		1.87
29	citral B		2.05
30	α-copaene	0.09	
31	β-cubebene	0.03	
32	calarene	0.07	
33	germacrene D	0.08	
34	valencene	0.32	
35	δ-cadidene	0.14	
36	linoleic acid	0.25	
37	caryophyllene oxide		3.93
38	spiro (4,5) decane		1.81

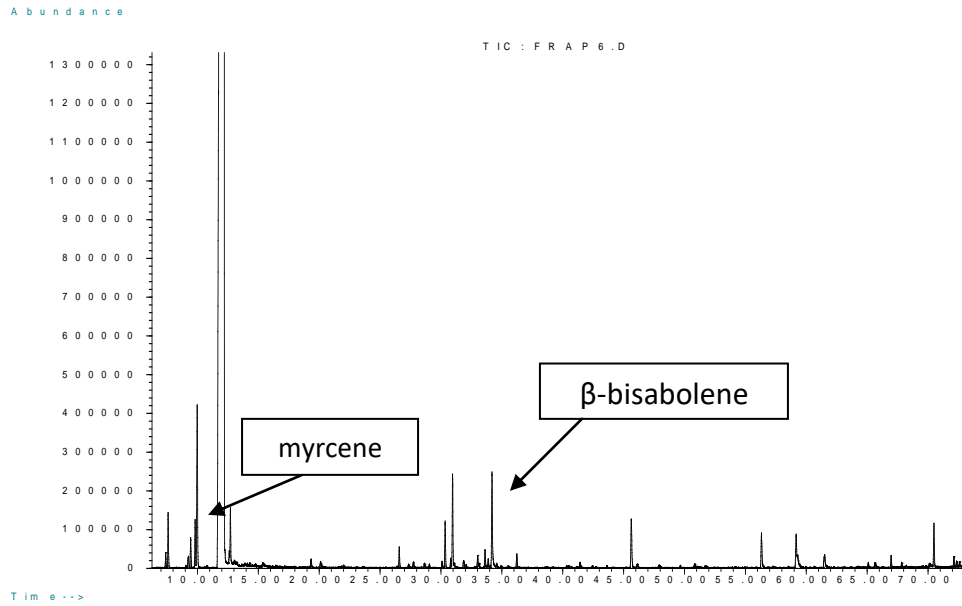
39	germacrene B		0.94
40	ledene		1.10
41	isospathulenol		0.93
42	spathulenol		0.95
43	valerenol		0.81
44	hexahydrofarnesyl acetone		3.53
45	aromadendreneoxide		2.66
46	longifolenaldehyde		1.89
47	aromadendrene		0.72
48	phytol		1.45
49	piperitol		1.62
50	neophytadiene		2.29
51	eicosane		1.15
52	pentamethoxyflavone	0.16	
53	heptamethoxyflavone	0.13	
54	hexamethoxyflavone	0.28	
55	unknown	14.52	
Συνόλο		97.11	95.28

Στο αιθέριο έλαιο του περικαρπίου του υβριδίου *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x trifoliata ταυτοποιήθηκαν 17 συστατικά, εκ των οποίων το λιμονένιο βρέθηκε σε ποσοστό 89.82%, ακολουθούμενο από το β-πινένιο (1.71%) και το δικυκλικό μονοτερπένιο σαβινένιο (1.29%). Ανιχνεύθηκαν επίσης σε μικρά ποσοστά πολυμεθοξυφλαβόνες.

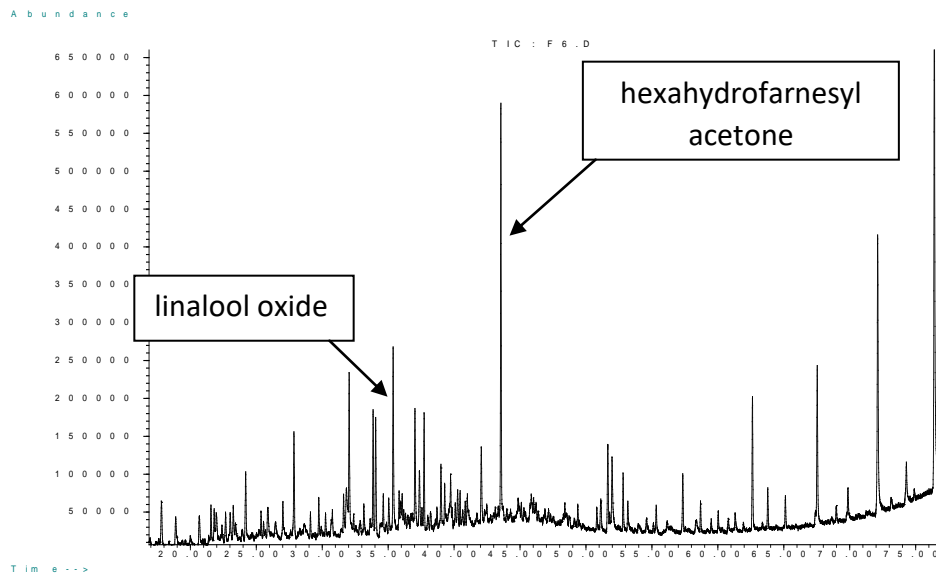
Στο αιθέριο έλαιο των φύλλων ταυτοποιήθηκαν 39 συστατικά, με κυριότερο την isofenchol σε ποσοστό 15.71%. Σε σχετικά υψηλό ποσοστό στο αιθέριο έλαιο βρέθηκαν επίσης οι μεταβολίτες: sabina ketone (6.97%) και sabinol (6.61%).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως δεν έχει μελετηθεί ξανά η συγκεκριμένη ποικιλία και το συγκεκριμένο υβρίδιο.

3.2.6 *Citrus grandis* cv Cuba Shaddock x trifoliata (Κωδικός: FRAP6 & FFRAP6)



Εικ. 3.11 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου περικαρπίου του FRAP6



Εικ. 3.12 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου φύλλων του FFRAP6

Πίνακας 3.6 Συστατικά αιθερίου ελαίου περικαρπίων του υβριδίου FRAP6 & FFRAP6

A/A	Ένωση	Περικάρπιο %	Φύλλα %
1	α-pinene	0.73	
2	β-pinene	0.51	
3	sabinene		0.34
4	myrcene	2.51	
5	limonene	88.93	0.45
6	trans-β-ocimene	0.66	
7	δ-elemene	0.22	
8	neryl acetate	0.07	
9	β-caryophyllene	0.55	
10	α-bergamotene	1.02	
11	germacrene D	0.34	
12	β-bisabolene	1.23	
13	germacrene B	0.18	
14	linalool		0.52
15	terpinen-4-ol		0.35
16	myrtenol		1.69
17	limonene oxide		2.07
18	2-pinen-4-ol		1.37
19	carveol		1.41
20	spathulenol		3.27
21	caryophyllene oxide		3.74
22	linalool oxide		9.39
23	isolongifolol		1.88
24	β-oplophenone		1.94
25	caryophylla-3,8(13)-dien-5.beta.-ol		2.43
26	nootkatone	0.74	
27	o-methylated coumarin (osthole)	0.49	
28	7-methoxy-8-(2-oxo-3-methylbutyl)coumarin	0.06	
29	pentadecanal	0.51	
30	hexahydrofarnesyl acetone		12.00
31	phytol		2.73

32	tricosane		1.95
33	pentacosane	0.14	4.20
34	heptacosane		5.86
35	docosane		10.54
36	hentriacontane		18.87
37	(z)14-tricosenyl formate	0.36	
38	unknown		4.80
Σύνολο		97.81	91.55

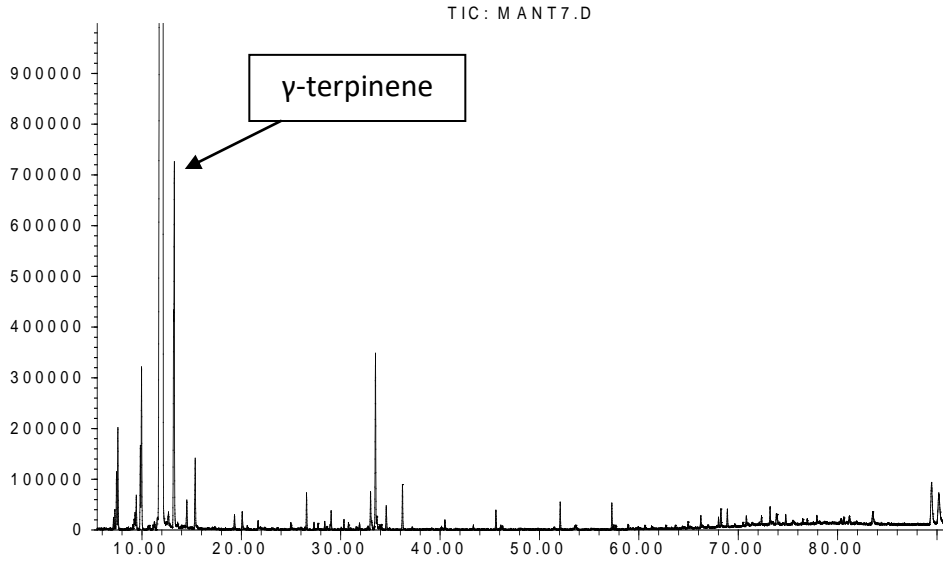
Στο αιθέριο έλαιο του περικαρπίου του υβριδίου *Citrus grandis* cv Cuba Shaddock x trifoliata ταυτοποιήθηκαν 19 συστατικά, εκ των οποίων το λιμονένιο σε ποσοστό 88.93%, ακολουθούμενο από τα συστατικά μυρκενίο (2.51%), β-bisabolene (1.23%) ενώ τα υπόλοιπα ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό μικρότερο του 1%. Ανιχνεύθηκαν επίσης σε μικρά ποσοστά οι κουμαρίνες o-methylated coumarin (osthole) και 7-methoxy-8-(2-oxo-3-methylbutyl) coumarin που έχουν αναφερθεί προηγουμένως στο αιθέριο έλαιο περικαρπίου του υβριδίου γρέιπφρουτ με κωδικό GREP1.

Στο αιθέριο έλαιο των φύλλων ταυτοποιήθηκαν 21 συστατικά, με κυριότερες ενώσεις τις hexahydrofarnesyl acetone (12.00%) που αποτελεί φυσικό αντίδοτο του φυτού έναντι μικροβιακών προσβολών (Lin *et al.*, 2012), και τα οξείδια λιναλόλης (9.39%) και καρυοφυλλενίου (3.74%), ενώ οι κανονικοί υδρογονάνθρακες εμφάνισαν ποσοστό 38%. Σε αυτό το αιθέριο έλαιο, όπως και στο προηγούμενο (FO-TrSin5), παρατηρήθηκαν πολύ μικρά ποσοστά λιμονενίου (0.45%) και σαβινενίου (0.34%).

Στη βιβλιογραφία δεν γίνεται αναφορά για το συγκεκριμένο υβρίδιο φράπας. Το αιθέριο έλαιο μελετάται για πρώτη φορά σε αυτή την εργασία.

3.2.7 *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata (Κωδικός: MANT7 & FMANT7)

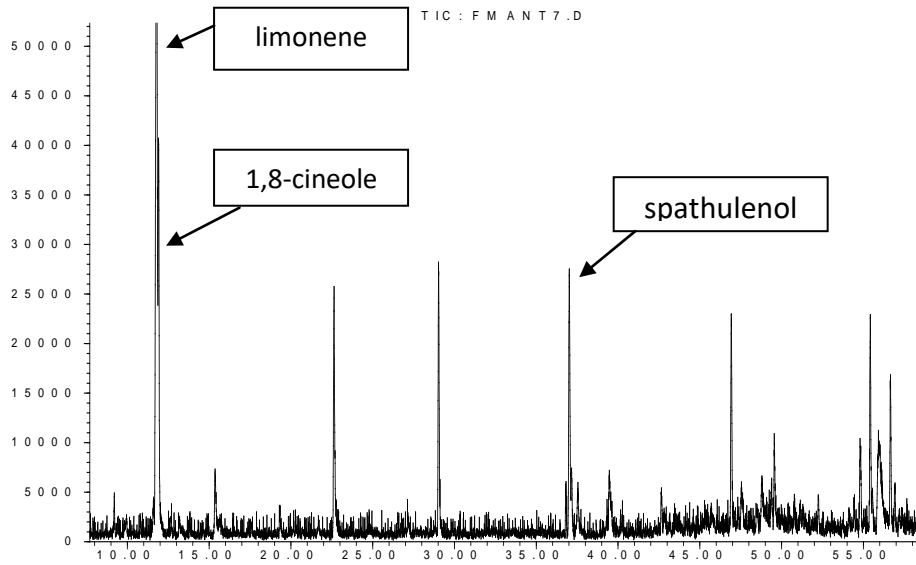
Abundance



Time-->

Εικ. 3.13 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου περικαρπίου του MANT7

Abundance



Time-->

Εικ. 3.14 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου φύλλων του FMANT7

Πίνακας 3.7 Συστατικά αιθερίου ελαίου περικάρπιων του MANT7 & FMANT7

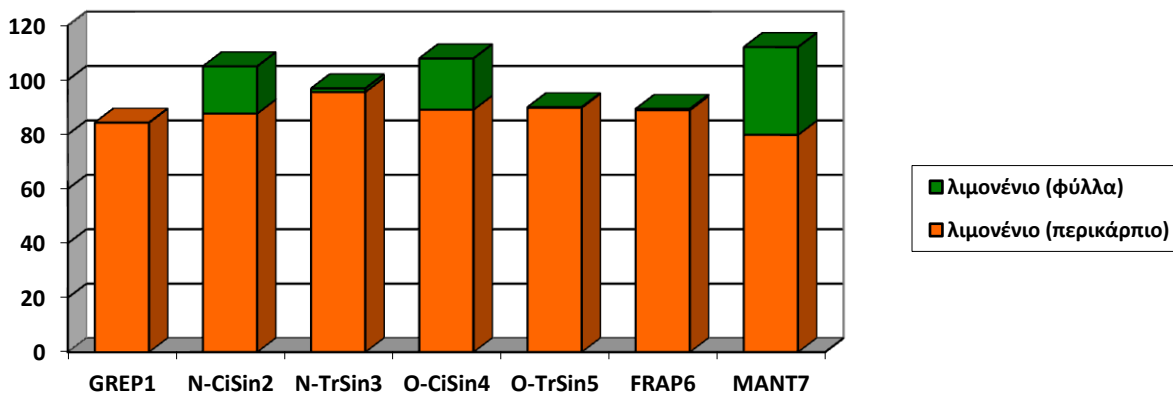
A/A	Ένωση	Περικάρπιο %	Φύλλα %
1	α-thujene	0.27	
2	α-pinene	1.39	
3	sabinene	0.08	
4	myrcene	1.54	
5	α-terpinene	0.11	
6	limonene	79.86	32.25
7	trans-β-ocimene	0.17	
8	1,8-cineole		10.31
9	γ-terpinene	4.98	
10	terpinolene	0.31	
11	linalool	0.73	2.31
12	terpinen-4-ol	0.32	
13	thymol methyl ether	0.08	
14	thymol	0.08	
15	δ-elemene	0.33	
16	citronellyl acetate	0.06	
17	α-copaene	0.08	
18	linalyl acetate		7.70
19	β-elemene	0.17	7.48
20	trans-caryophyllene	0.09	
21	γ-elemene	0.51	
22	β-cubebene	0.40	
23	valencene	1.73	
24	δ-cadidene	0.25	
25	nootkatone	0.20	
26	spathulenol		8.20
27	caryophylla-4(12),8(13) diene 5 β-ol		1.95
28	hexahydrofarnesyl acetone		5.80
29	phytosterol		3.90
30	phytol		5.36
31	palmitic acid	0.25	
32	oleic acid	0.15	
33	heptamethoxyflavone	0.20	
34	hexamethoxyflavone	0.18	
35	unknown		5.63
Σύνολο		95.66	90.93

Στο αιθέριο έλαιο περικαρπίου του υβριδίου *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata ταυτοποιήθηκαν 27 συστατικά, εκ των οποίων το λιμονένιο βρέθηκε σε ποσοστό 79.86%. Σε σχετικά υψηλό ποσοστό στο αιθέριο έλαιο βρέθηκαν επίσης το γ-τερπινένιο (4.98%), το σεσκιτερπένιο βαλενσένιο και τα μονοτερπένια μυρκένιο και α-πινένιο. Παρατηρήθηκε επίσης η ύπαρξη σε μικρά ποσοστά πολυμεθοξυφλαβονών.

Στο αιθέριο έλαιο των φύλλων του υβριδίου ταυτοποιήθηκαν 10 συστατικά, με κυριότερο το λιμονένιο σε ποσοστό 32.25%, ακολουθούμενο από 1,8-cineole (10.31%), spathulenol (8.20%), linalyl acetate (7.70%) και β-elemene (7.48%) ενώ εδώ παρατηρήθηκε χαρακτηριστική απουσία σαβινενίου.

Διεθνώς και αυτό το αιθέριο έλαιο του υβριδίου μανταρινιού μελετάται για πρώτη φορά.

Ύστερα από τις αναλύσεις των αιθερίων ελαίων των περικαρπίων και των φύλλων των υβριδίων εσπεριδοειδών διαπιστώνεται ότι το κύριο συστατικό λιμονένιο ανιχνεύεται στα περικάρπια των υβριδίων σε μεγαλύτερη συγκέντρωση συγκριτικά με τα φύλλα τους. Παρ'όλα αυτά, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα, είναι αισθητή η παρουσία του λιμονενίου στα υβρίδια του πορτοκαλιού N-CiSin2 και O-CiSin4 καθώς και του μανταρινιού MANT7.



Σχήμα 3.1 Λιμονένιο σε φύλλα και περικάρπια

3.3 Συμπεράσματα από την χημική ανάλυση των αιθερίων ελαίων των περικαρπίων των επιλεγμένων ελληνικών υβριδίων εσπεριδοειδών.

Ανιχνεύθηκαν συνολικά στα 7 υβρίδια εσπεριδοειδών 45 δευτερογενείς μεταβολίτες με κύριο σε όλα τα δείγματα το λιμονένιο (79.86%-95.61%) ακολουθούμενο από τα σαβινένιο (0.08%-1.29%), μυρκένιο (0.54%-2.51%), λιναλόλη (0.13%-1.34%) και βαλενσένιο (0.03%-1.73%).

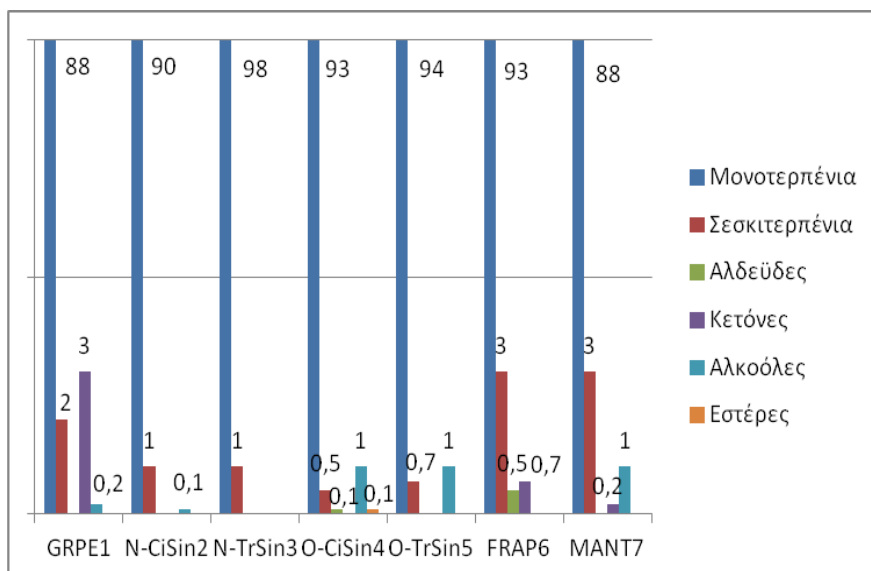
Επίσης, ανιχνεύθηκαν σε μικρά ποσοστά οι **κουμαρίνες** (auraptene, 7-methoxy-8-(2-oxo-3-methylbutyl)coumarin και osthole) στα υβρίδια με κωδικούς GREP1 και FRAP6 και οι **πολυμεθοξυφλαβόνες** (tetramethoxy-, pentamethoxy-, hexamethoxy-, heptamethoxy-flavone) σε όλα τα υβρίδια *Citrus sinensis* (εκτός απο το N-TrSin5) αλλά και στα GREP1 και MANT7.

Στον Πίνακα 3.8 και στο Σχήμα 3.2 που ακολουθεί συνοψίζονται, στις κυριότερες τερπενικές ομάδες, οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα μελετηθέντα είδη εσπεριδοειδών.

Πίνακας 3.8 Κατηγοριοποίηση των ενώσεων σε ομάδες τερπενίων.

Ενώσεις	Ποσοστο %						
	GREP1	N-CiSin2	N-Trsin3	O-CiSin4	O-TrSin5	FRAP6	MANT7
Μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες	88	90.51	98.51	93.26	94.23	93.34	88.71
Σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες	2.19	1.55	1.26	0.46	0.73	3.54	3.56
Αλδεύδες	α	α	α	0.16	α	0.51	α
Κετόνες	3.76	α	α	0.03	α	0.74	0.20
Αλκοόλες	0.21	0.13	α	1.52	1.33	α	1.21
Εστέρες	α	α	α	0.10	α	0.07	0.06

^α Δεν εντοπίστηκε



Σχήμα 3.2 Απεικόνιση των κατηγοριοποιημένων ενώσεων σε ομάδες τερπενίων

Είναι γνωστό ότι οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες βρίσκονται στο μεγαλύτερο ποσοστό στα αιθέρια έλαια περικαρπίων εσπεριδοειδών ακολουθούμενοι από τους σεσκιτερπενικούς υδρογονάνθρακες, γεγονός που δικαιολογείται από την οικολογική τους χρησιμότητα στα συγκεκριμένα φυτά, ως αποτρεπτικοί παράγοντες ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων στους ιστούς του φυτού ή/και εντομοαπωθητικά (Tholl, 2015). Σε μικρότερα ποσοστά στα αιθέρια έλαια ανιχνεύονται αλδεΐδες που προσφέρουν ευχάριστο άρωμα, ακολουθούν οι «αντιοξειδωτικής δράσης» αλκοόλες, οι κετόνες που χρησιμοποιούνται ως τεχνητά και/ή φυσικά πρόσθετα στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ οι εστέρες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία καλλυντικών, για την αρωματισμό ποτών, γλυκισμάτων κλ.π.

3.4 Συμπεράσματα από την χημική ανάλυση των αιθερίων ελαίων των φύλλων των μελετηθέντων εσπεριδοειδών.

Στα 6 υβρίδια εσπεριδοειδών το κύριο συστατικό ήταν το σαβινένιο, το ποσοστό του οποίου φτάνει μέχρι το 43.74%. Επίσης, παρατηρήθηκε σε σημαντικό ποσοστό η ανίχνευση αλκανίων σε αντίθεση με τα αιθέρια έλαια των περικαρπίων. Στα αιθέρια έλαια των φύλλων όπως και στα περικάρπια ανάμεσα στα τερπένια παρατηρείται ότι οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες βρίσκονται στο μεγαλύτερο ποσοστό, ακολουθούμενοι από τους σεσκιτεπενικούς

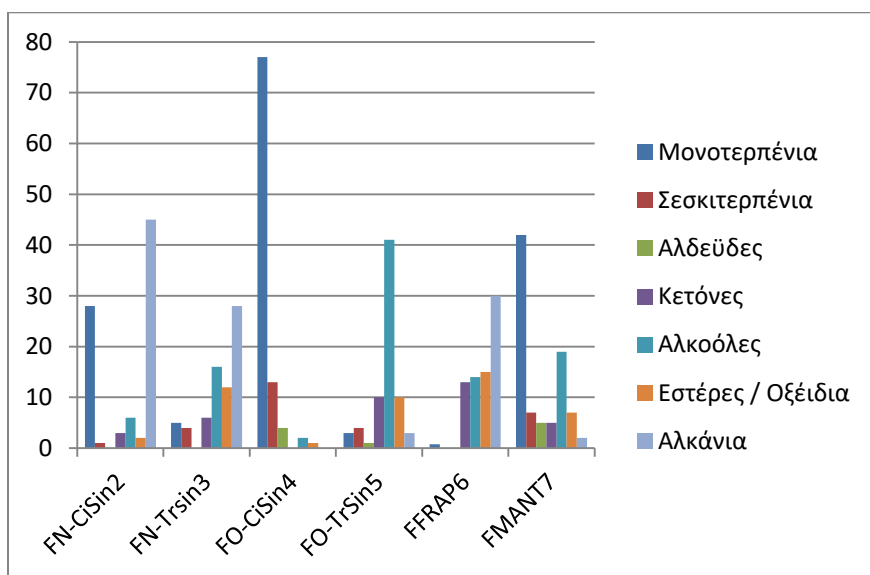
υδρογονάνθρακες. Οι αλκοόλες και οι κετόνες βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα φύλλα σχετικά με τα περικάρπια.

Στον παρακάτω Πίνακα 3.9 και το Σχήμα 3.3 που ακολουθεί συνοψίζονται οι κυριότερες τερπενικές ομάδες αλλά και τα αλκάνια, ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα μελετηθέντα είδη εσπεριδοειδών.

Πίνακας 3.9 Κατηγοριοποίηση των ενώσεων σε ομάδες τερπενίων

Ενώσεις	Ποσοστο %					
	FN-CiSin2	FN-Trsin3	FO-CiSin4	FO-TrSin5	FFRAP6	FMANT7
Μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες	28.56	5.19	77.71	3.27	0.79	42.57
Σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες	1.23	4.97	13.23	4.64	α	7.48
Αλδεΐδες	α	α	4.61	1.13	α	5.63
Κετόνες	2.99	6.42	α	10.50	13.94	5.80
Αλκοόλες	6.31	16.29	2.80	41.14	14.81	19.78
Εστέρες / Οξείδια	2.87	12.89	1.28	10.96	15.21	7.70
Αλκάνια	45.43	28.76	α	2.97	30.44	1.95

^α Δεν εντοπίστηκε



Σχήμα 3.3 Απεικόνιση των κατηγοριοποιημένων ενώσεων σε ομάδες τερπενίων

3.5 Απομόνωση και ταυτοποίηση δευτερογενών μεταβολιτών των υβριδίων O-CiSin4 και Mant7.

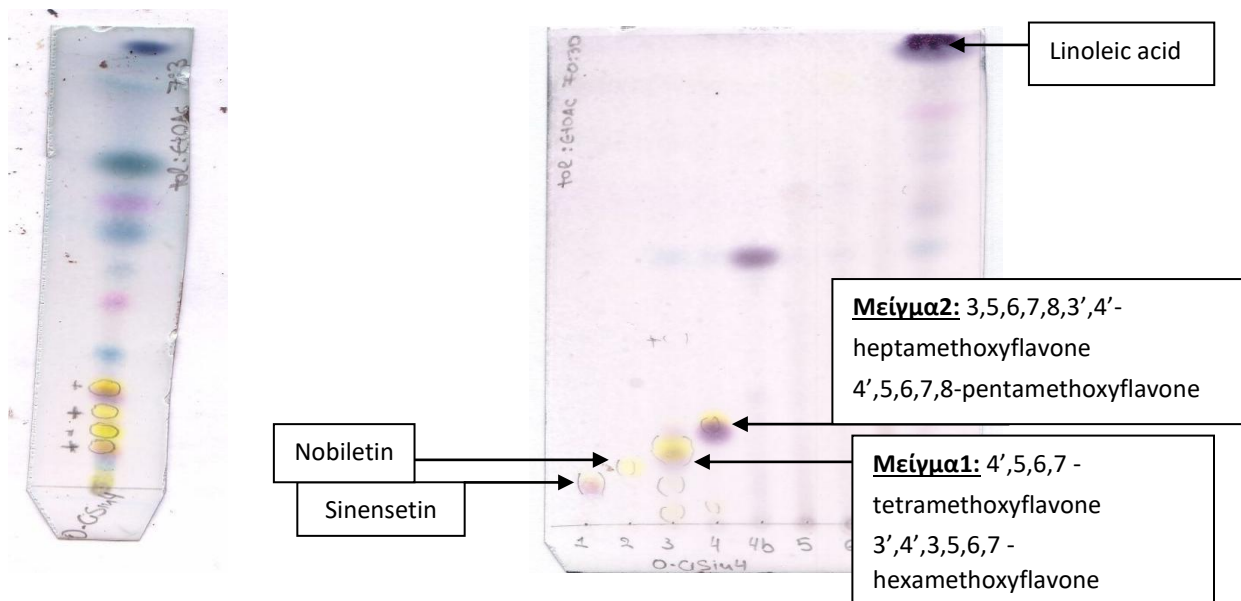
Από τις παρασκευαστικές χρωματογραφίες λεπτής στιβάδας (PREP-TLC) που πραγματοποιήθηκαν στα υβρίδια O-CiSin4 και Mant7 σε σύστημα ανάπτυξης τολουόλιο - οξικός αιθυλεστέρας 70:30, απομονώθηκαν τρεις καθαρές πολυμεθοξυφλαβόνες και δυο μείγματα πολυμεθοξυφλαβονών καθώς και ένα λιπαρό οξύ. Επιλέχθηκαν τα παραπάνω υβρίδια διότι από τα συγκεκριμένα παραλήφθηκαν επαρκείς ποσότητες αιθερίου ελαίου (30.5 mg για το O-CiSin4 και 15.1 mg για το Mant7 αντίστοιχα).

3.5.1 Ταυτοποίηση με φασματοσκοπία NMR – O-CiSin4

Από το αιθέριο έλαιο του υβριδίου O-CiSin4 απομονώθηκαν:

- δυο καθαρές πολυμεθοξυφλαβόνες οι: nobiletin, sinensetin,
- δυο μείγματα αυτών: Μείγμα1: 4',5,6,7 tetramethoxyflavone & 3',4',3,5,6,7 – hexamethoxyflavone και Μείγμα2: 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone & 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone
- και ένα λινολεϊκό οξύ.

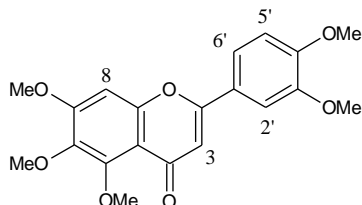
Παρακάτω ακολουθεί η φασματοσκοπική ανάλυση των απομονωμένων ουσιών.



Εικ. 3.15 αιθέριο έλαιο O-CiSin4

Εικ. 3.16 απομονωμένες ουσίες O-CiSin4

Κλάσμα 1: 3',4',5,6,7-pentamethoxyflavone (Sinensetin)



Σχήμα 3.4 Sinensetin

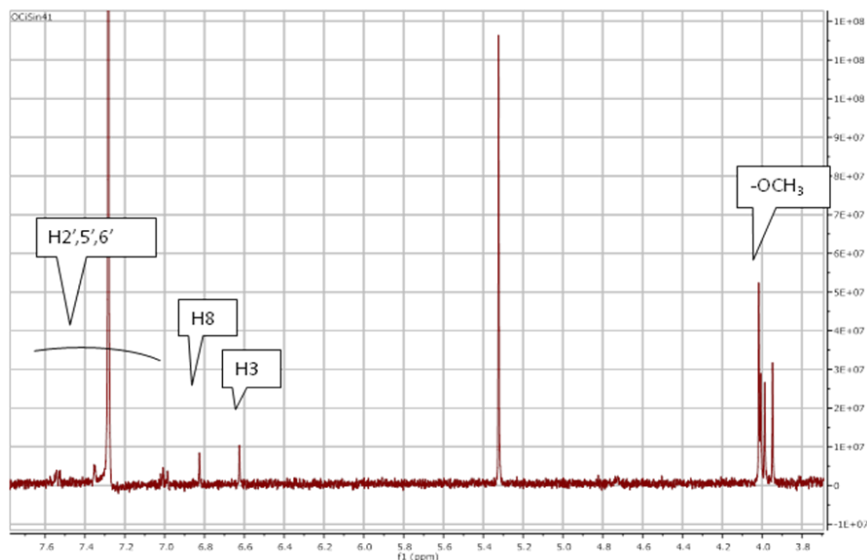
Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρούμε τέσσερις απλές κορυφές στην περιοχή 3.93-3.99 ppm, εκ των οποίων οι τρεις ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία ενώ αυτή στα 3.99 για έξι πρωτόνια και αντιστοιχούν συνολικά σε πέντε μεθόξυ ομάδες. Τα σήματα στην αρωματική περιοχή δείχνουν την ύπαρξη σκελετού φλαβονοειδούς.

Απλή κορυφή στα 6.60 ppm αποδίδεται σε ολεφινικό πρωτόνιο και είναι αυτό του C-3. Στον αρωματικό δακτύλιο A, το σήμα στα 6.80 ppm που εμφανίζεται ως μια απλή κορυφή δείχνει ένα πρωτόνιο στη θέση 8. Στον αρωματικό δακτύλιο B, το πρωτόνιο στη θέση 5' έχει όρθο-σύζευξη ($J=9\text{Hz}$) με το πρωτόνιο της θέσης 6' και εντοπίζεται στα 6.97 ppm ως μια διπλή κορυφή. Το H2' έχει μια μέτα-σύζευξη ($J=2\text{Hz}$) με το H6' στα 7.33 ppm και εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή. Ενώ το H6' έχει ορθο- ($J=9\text{Hz}$) και μέτα- ($J=2\text{Hz}$) σύζευξη με τα H5' και H2' αντίστοιχα και εντοπίζεται ως μια διπλή διπλής κορυφή στα 7.52 ppm.

Τα δεδομένα αυτά συγκρινόμενα και με την βιβλιογραφία (Li et al., 2006), οδηγούν στην δομή της μεθόξυ φλαβόνης sinensetin.

Πίνακας 3.10: Φασματοσκοπικά δεδομένα της sinensetin.

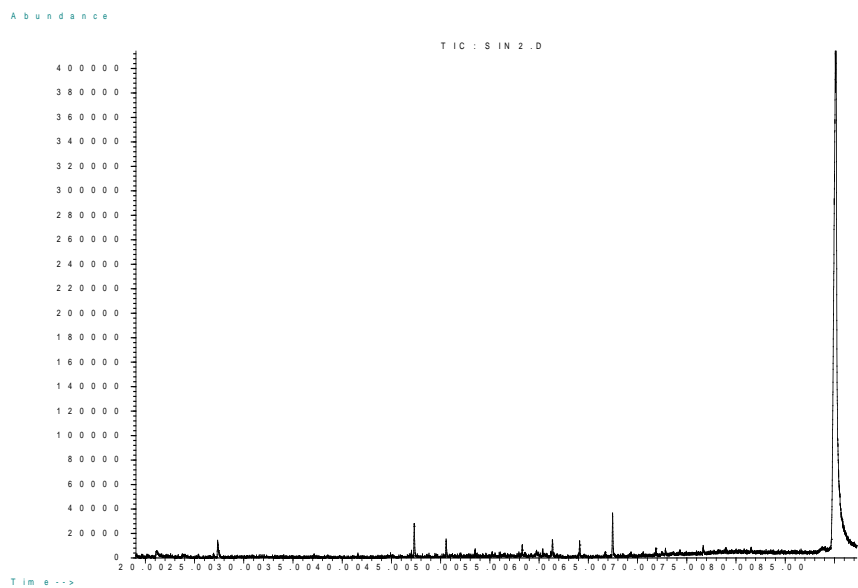
δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα/ J	Πρωτόνιο
3.93	3H	s	-OCH ₃
3.97	3H	s	-OCH ₃
3.98	3H	s	-OCH ₃
3.99	6H	s	-OCH ₃
6.60	1H	s	H3
6.80	1H	s	H8
6.97	1H	d ($J=9\text{Hz}$)	H5'
7.33	1H	d ($J=2\text{Hz}$)	H2'
7.52	1H	dd ($J=9\text{ Hz}, 2\text{Hz}$)	H6'



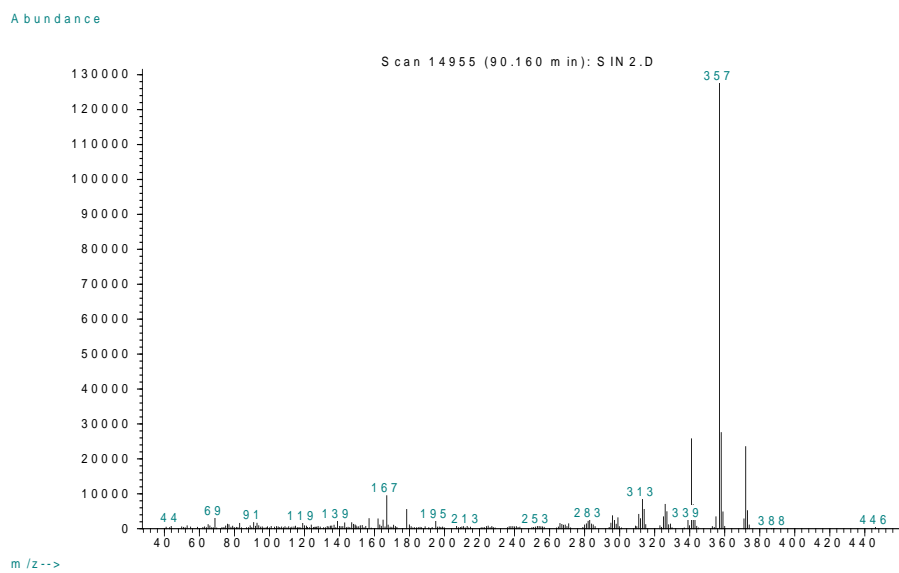
Εικ. 3.17 Φάσμα πρωτονίου της sinensetin

Η sinensetin έχει απομονωθεί σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία από αιθέριο έλαιο των ειδών *Citrus reticulata*, *Citrus paradisi*, *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium* (Steinke *et al.*, 2013) και είναι σημαντική πολυμεθοξυφλαβόνη καθώς αποτελεί βιοδραστικό φυσικό προϊόν με ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων όπως αντιβακτηριακές, αντιμυκητιασικές, αντιπαρασιτικές και αντινεοπλασματικές (Amzad *et al.*, 2016). Έχει εμφανίσει *in vitro* δράση κατά της παχυσαρκίας και αναστολή της έκφρασης λιπογενών ενζύμων προάγοντας την λιπόλυση (Kang *et al.*, 2013). Σε πειραματικό επίπεδο έχει εμφανίσει επίσης αντιφλεγμονώδη δράση *in vivo* σε ποντίκια (Shin *et al.*, 2012).

Παρακάτω εμφανίζεται το χρωματογράφημα και το φάσμα του GC-MS της ουσίας sinensetin. Στο χρωματογράφημα η κορυφή της πολυμεθοξυφλαβόνης εμφανίζεται σε χρόνο 90.16 min και απο το φάσμα μάζας επιβεβαιώνεται το μοριακό βάρος (m/z) 373 και τα κύρια θραύσματα: 341, 372.

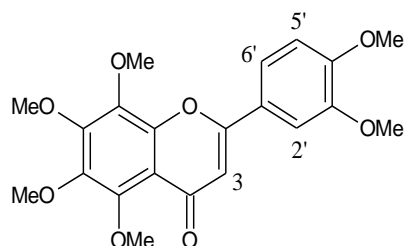


Εικ. 3.18 Χρωματογράφημα της sinensetin



Εικ. 3.19 Φάσμα μάζας της sinensetin

Κλάσμα 2: 3',4',5,6,7,8-hexamethoxyflavone (Nobiletin)



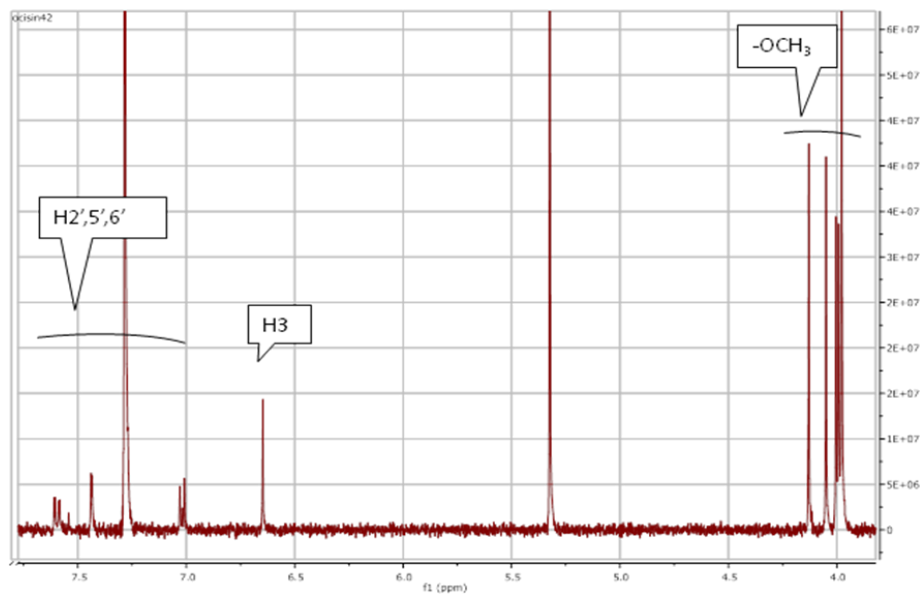
Σχήμα 3.5 Nobiletin

Στο φάσμα πρωτονίου εντοπίζονται πέντε απλές κορυφές στην περιοχή 3.95-4.11 ppm, εκ των οποίων οι τέσσερις ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία ενώ αυτή στα 3.95 ppm για έξι πρωτόνια και αντιστοιχούν συνολικά σε έξι μεθόξυ ομάδες. Τα σήματα στην αρωματική περιοχή δείχνουν την ύπαρξη σκελετού флаβονοειδούς ίδιας δομής με τον προηγούμενο σκελετό που μελετήσαμε με την διαφορά ότι δεν υπάρχει το σήμα της απλής κορυφής στα 6.80 ppm που αντιστοιχούσε στο πρωτόνιο της θέσης 8 στον δακτύλιο A.

Τα δεδομένα αυτά συγκρινόμενα και με την βιβλιογραφία (Li *et al.*, 2006), οδηγούν στην δομή μιας εξαμεθοξυφλαβόνης nobiletin, η οποία αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (Zhao *et al.*, 2018).

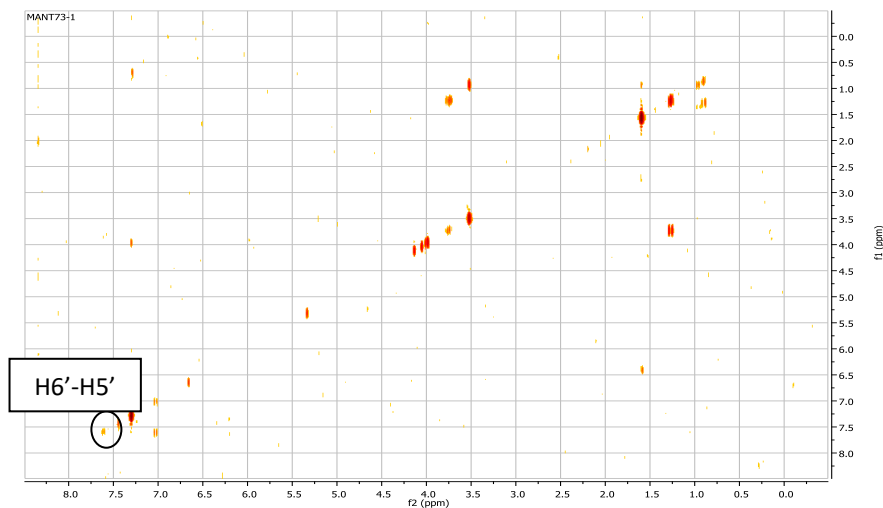
Πίνακας 3.11: Φασματοσκοπικά δεδομένα της φλαβόνης nobiletin

δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα/ J	Πρωτόνιο
3.95	6H	s	-OCH ₃
3.97	3H	s	-OCH ₃
3.98	3H	s	-OCH ₃
4.03	3H	s	-OCH ₃
4.11	3H	s	-OCH ₃
6.63	1H	s	H ₃
7.00	1H	d(J=9Hz)	H _{5'}
7.42	1H	d(J=2Hz)	H _{2'}
7.57	1H	dd(J=9Hz, 2Hz)	H _{6'}



Εικ. 3.20 Φάσμα πρωτονίου της φλαβόνης nobiletin

Με την βοήθεια του φάσματος COSY καθορίστηκαν οι συσχετισμοί συντονισμού μεταξύ των πρωτονίων. Παρατηρούμε ότι τα φαινολικά πρωτόνια H6' και H5' του Β-δακτυλίου εμφανίζουν σύζευξη με χημική μετατόπιση 7.57/7.00 ppm αντίστοιχα. Παρακάτω ακολουθεί το φάσμα COSY.

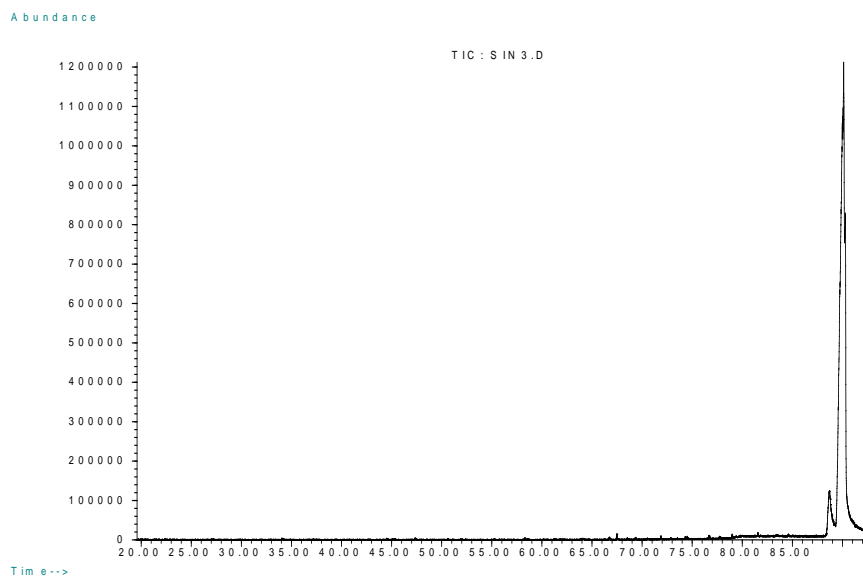


Εικ. 3.21 Φάσμα COSY της φλαβόνης nobiletin

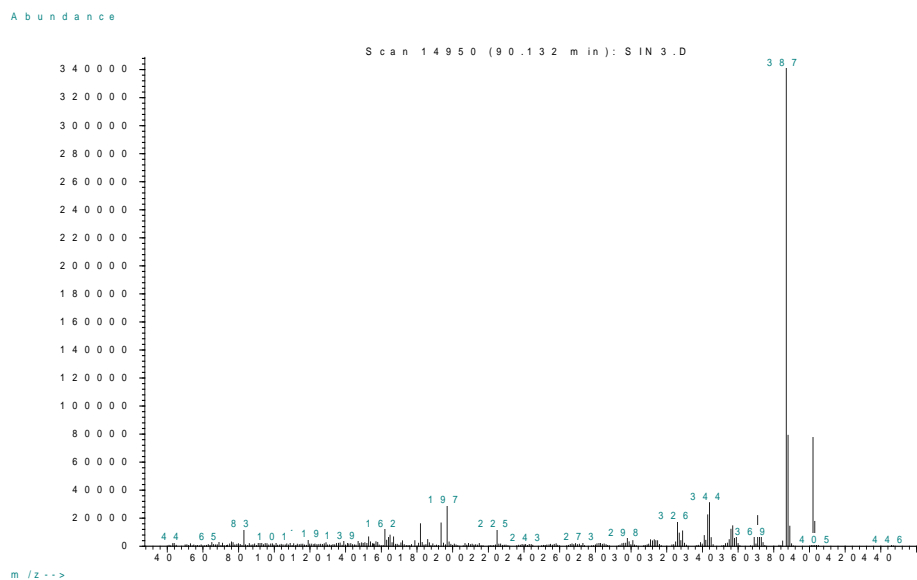
Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, ο δευτερογενής μεταβολίτης nobiletin, που έχει απομονωθεί από τα είδη *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium* είναι ισχυρός

αναστολέας ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων (σύμφωνα με *in vivo* πειράματα σε ποντικούς) (Chen and Montanari, 1998). Η συνεργιστική δράση των ενώσεων nobiletin και atorvastatin (στατίνη) έδωσε ενισχυμένα αποτελέσματα στην αναστολή της καρκινογένεσης παχέος εντέρου. Τα αποτελέσματα αυτά συσχετίστηκαν με την αναστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, την επαγωγή κυτταρικής απόπτωσης, καθώς και με την αναστολή των προφλεγμονωδών κυτοκινών (Wu *et al.*, 2017). Επίσης, λόγω δραστηκότητάς της nobiletin στην βελτίωση της εξασθενημένης μνήμης θεωρείται ότι δυνητικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά στην ανάπτυξη φαρμάκων έναντι νευροεκφυλιστικών διαταραχών (Nagase *et al.*, 2005). Η δράση αυτή, που παρουσιάζουν τα περισσότερα πολυμεθοξυλιωμένα флаβονοειδή, οφείλεται δυνητικά στη μεγάλη απορρόφηση τους από τις κυτταρικές μεμβράνες αφού η μεθοξυλίωση των φαινολικών ομάδων μειώνει την υδροφιλία των флаβονοειδών (Chen *et al.*, 1997).

Όπως και προηγουμένως, παρακάτω εμφανίζεται το χρωματογράφημα και το φάσμα του GC-MS της ουσίας nobiletin. Στο χρωματογράφημα η κορυφή της πολυμεθοξυφλαβόνης εμφανίζεται σε χρόνο 90.12 min και απο το φάσμα μάζας επιβεβαιώνεται το μοριακό βάρος (m/z) 403 και φαίνεται η θραυσματοποίηση με κύρια θραύσματα τα: 197, 326, 344 και 402.

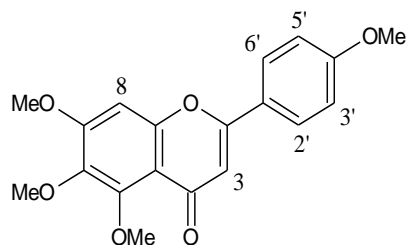


Εικ. 3.22 Χρωματογράφημα της ουσίας nobiletin



Εικ. 3.23 Φάσμα μάζας της nobiletin

Κλάσμα 3: Μείγμα1: 4',5,6,7-tetramethoxyflavone και 3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone



Σχήμα 3.6 4',5,6,7-tetramethoxyflavone

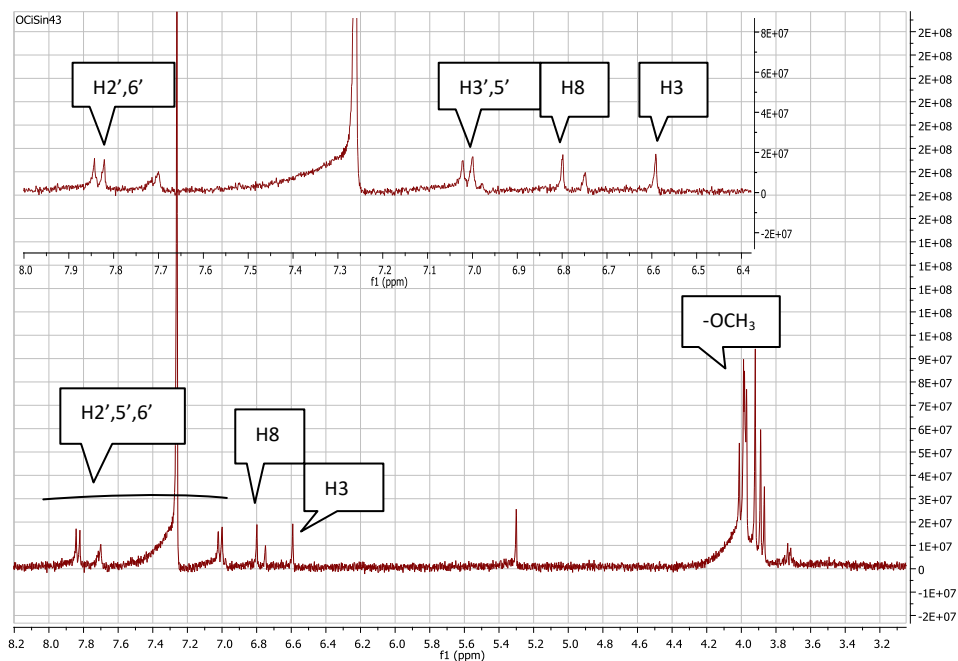
Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρούμε τέσσερις απλές κορυφές στην περιοχή 3.89-3.99 ppm που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν σε τέσσερις μεθόξυ ομάδες.

Τα σήματα στην αρωματική περιοχή δείχνουν την ύπαρξη σκελετού флаβονοειδούς όπως και στις προηγούμενες δομές. Έτσι η απλή κορυφή στα 6.59 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 3. Στον αρωματικό δακτύλιο A, το σήμα στα 6.80 ppm που εμφανίζεται ως μια απλή κορυφή δείχνει ένα πρωτόνιο στη θέση 8. Ο αρωματικός δακτύλιος B, έχει δύο διαφορετικά ζεύγη (μοτίβο A_2B_2) ορθο-αρωματικών πρωτονίων που εμφανίζονται ως διπλές κορυφές στα 7.01 και 7.83 ppm με σταθερά συζεύξεως 9 Hz (H_2' , $6'$ και H_3' , $5'$).

Τα δεδομένα αυτά συγκρινόμενα και με την βιβλιογραφία (Li *et al.*, 2006), οδηγούν στην δομή της 5,6,7,4'-tetramethoxyflavone.

Πίνακας 3.12: Φασματοσκοπικά δεδομένα της 5,6,7,4'-tetramethoxyflavone.

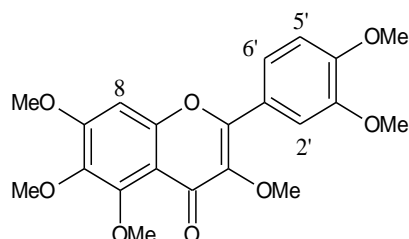
δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα / J	Πρωτόνιο
3.89	3H	s	-OCH ₃
3.92	3H	s	-OCH ₃
3.98	3H	s	-OCH ₃
3.99	3H	s	-OCH ₃
6.59	1H	s	H3
6.80	1H	s	H8
7.01	2H	d ($J=9\text{Hz}, 2\text{Hz}$)	H3', 5'
7.83	2H	d ($J=9\text{Hz}, 2\text{Hz}$)	H2', 6'



Εικ. 3.24 Φάσμα πρωτονίου 5,6,7,4'-tetramethoxyflavone

β) 3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone

Στο κλάσμα αυτό απομονώθηκε σε μικρότερη ποσότητα μια ακόμη πολυμεθοξυφλαβόνη, η **3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone** ή 3-methoxy-sinensetin.

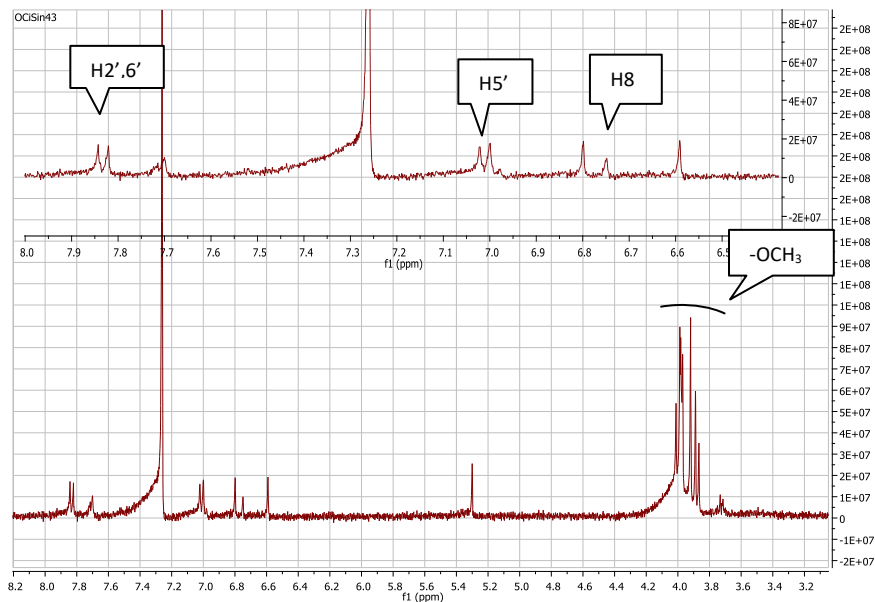


Σχήμα 3.7 3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone

Οι διαφορές με την sinensetin εντοπίζονται στην απουσία του σήματος που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3 και στην ύπαρξη ενός επιπλέον σήματος που αντιστοιχεί σε μεθόξυ ομάδα. Έτσι παρουσιάζονται πέντε μεθοξύ ομάδες στα 3.87-4.01 ppm ως απλές κορυφές. Το αρωματικό πρωτόνιο του δακτυλίου Α στη θέση 8 δίνει μια απλή κορυφή χαμηλού συντονισμού (6.75 ppm) και τα αρωματικά πρωτόνια του δακτυλίου Β δίνουν στο φάσμα στο 6.99 μια διπλή κορυφή, στο 7.70 πάλι μια διπλή και στα 7.71 ppm μια διπλή διπλής κορυφή. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Li *et al.*, 2006) και τα φασματοσκοπικά δεδομένα η δομή αυτή είναι της 3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone (3-methoxy-sinensetin).

Πίνακας 3.13: Φασματοσκοπικά δεδομένα της 3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone

δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα / J	Πρωτόνιο
3.87	3H	s	-OCH ₃
3.92	3H	s	-OCH ₃
3.97	3H	s	-OCH ₃
3.98	3H	s	-OCH ₃
4.01	3H	s	-OCH ₃
6.75	1H	s	H8
6.99	1H	d (J=9Hz)	H5'
7.70	1H	d (J=2Hz)	H2'
7.71	1H	dd (J=9Hz, 2Hz)	H6'



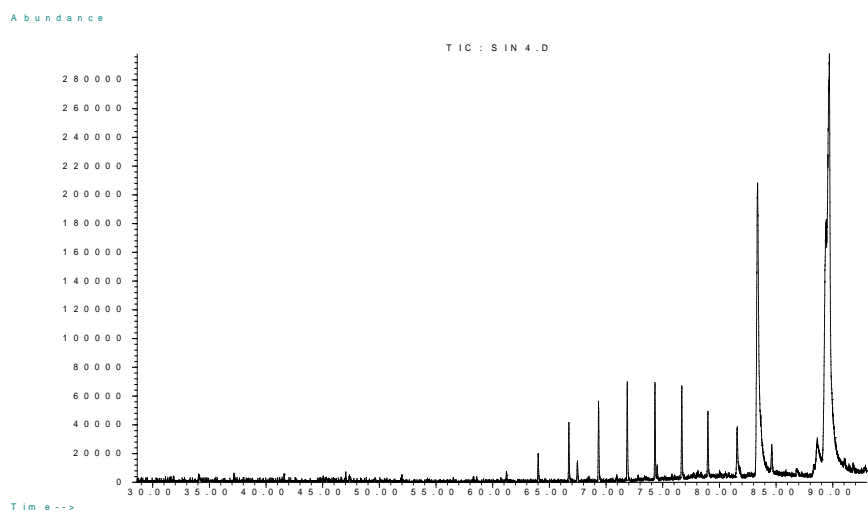
Εικ. 3.25 Φάσμα πρωτονίου **3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone**

Τα δυο αυτά πολυμεθοξυλιωμένα παράγωγα φλαβονών έχουν ανιχνευθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στο περικάρπιο αρκετών ειδών *Citrus* όπως *C. keraji*, *C. kinokuni*, *C. depressa*, *C. leiocarpa* (Mizuno *et al.*, 1991). Η tetramethoxyflavone είναι ο συνηθέστερος τύπος, ενώ η 3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα αποδείχθηκε ότι ήταν κυτταροτοξική έναντι των καρκινικών κυττάρων (Borah *et al.*, 2017).

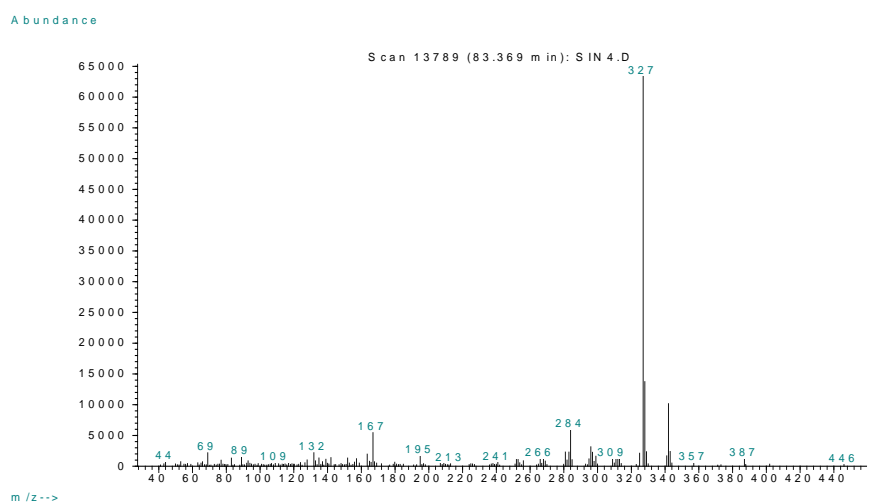
Παρακάτω εμφανίζεται το χρωματογράφημα και το φάσμα απο το GC-MS του μείγματος ουσιών 4',5,6,7-tetramethoxyflavone και 3',4',3,5,6,7-hexamethoxyflavone. Στο χρωματογράφημα οι δυο κορυφές των πολυμεθοξυφλαβονών εμφανίζονται στους χρόνους 83.36 min και 89.69 min, αντίστοιχα. Απο το φάσμα μάζας της 4',5,6,7-tetramethoxyflavone επιβεβαιώνεται το μοριακό βάρος (m/z) 343 και φαίνεται η θραυσματοποίηση με κύρια θραύσματα τα: 167, 284, 311 και 327. Επιπλέον, από το φάσμα μάζας της 3',4',3,5,6,7-

hexamethoxyflavone επιβεβαιώνεται το μοριακό βάρος (m/z) 403 και φαίνεται η θραυσματοποίηση με κύρια θραύσματα τα: 197, 326, 344 και 387.

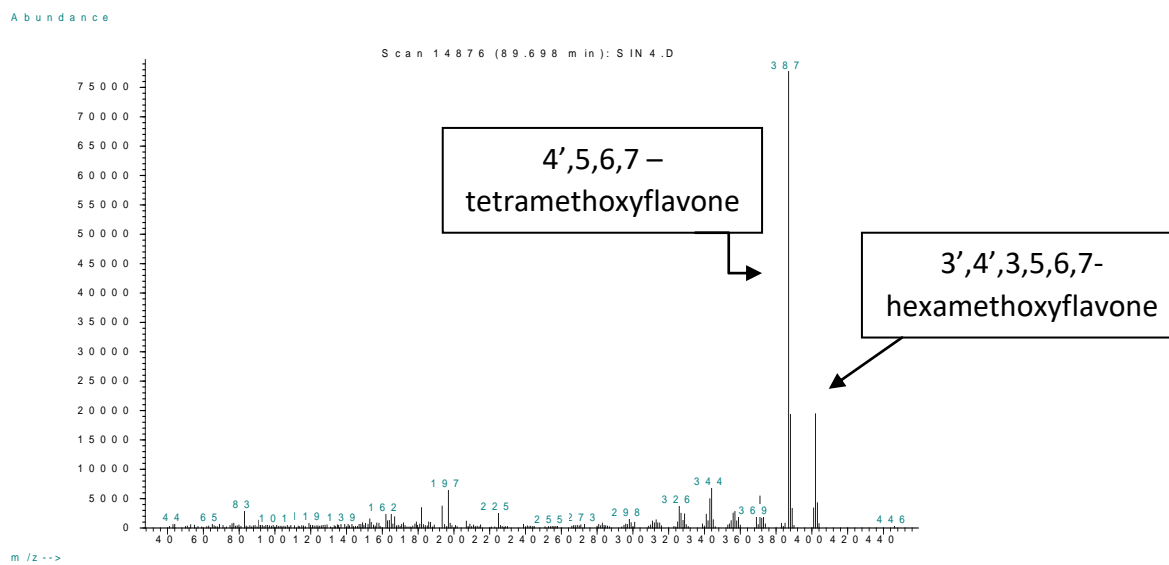
Παρακάτω ακολουθούν το χρωματογράφημα του μείγματος και τα φάσματα μάζας των 4',5,6,7-tetramethoxyflavone και 3',4',3,5,6,7-hexamethoxyflavone, αντίστοιχα.



Εικ. 3.26 Χρωματογράφημα του μείγματος 4',5,6,7-tetramethoxyflavone και 3',4',3,5,6,7-hexamethoxyflavone

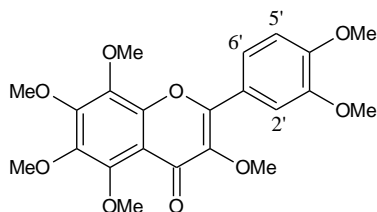


Εικ. 3.27 Φάσμα μάζας της 4',5,6,7-tetramethoxyflavone



Εικ. 3.28 Φάσμα μάζας της 3',4',3,5,6,7-hexamethoxyflavone

Κλάσμα 4: Μείγμα2: 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone και 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone ή αλλιώς tangeretin



Σχήμα 3.8 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone

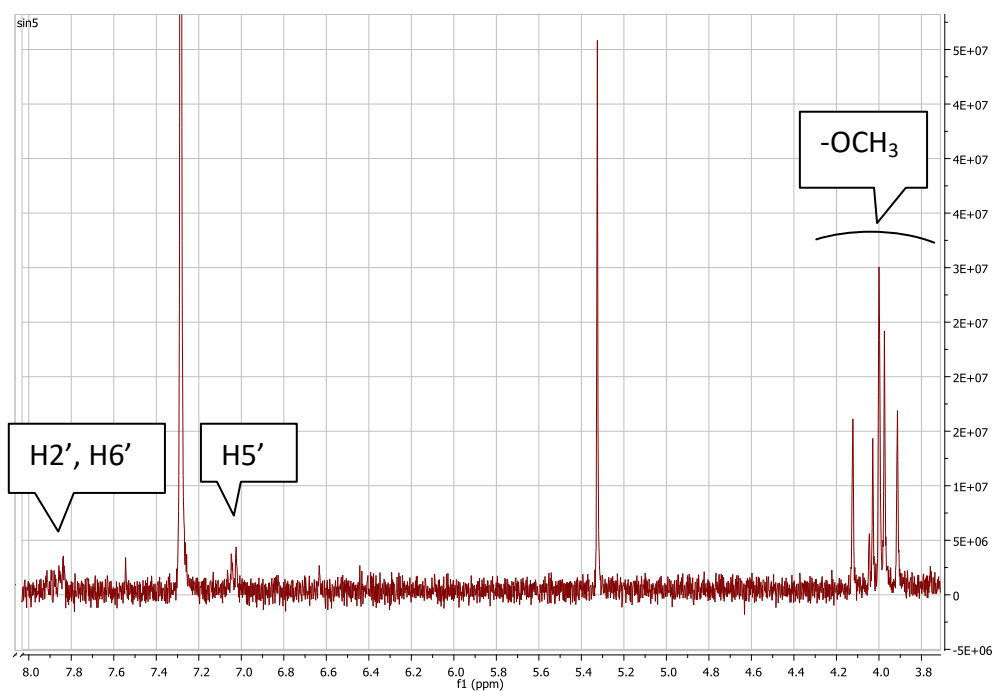
Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρούμε τέσσερις απλές κορυφές στην περιοχή 3.89-4.10 ppm που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία, πλην αυτής στα 3.97 ppm που ολοκληρώνει για εννιά πρωτόνια και αντιστοιχούν σε επτά μεθόξυ ομάδες.

Τα σήματα στην αρωματική περιοχή δείχνουν την ύπαρξη σκελετού флаβονοειδούς. Στον αρωματικό δακτύλιο Β, το σήμα στα 7.01 ppm που εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή δείχνει ένα πρωτόνιο στη θέση 5'. Στα 7.80 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή που δείχνει ένα πρωτόνιο στη θέση 2', ενώ στα 7.84 ppm υπάρχει μια διπλή διπλής κορυφή που υποδηλώνει το πρωτόνιο της θέσης 6'.

Τα δεδομένα αυτά συγκρινόμενα και με την βιβλιογραφία (Li *et al.*, 2006), οδηγούν στην δομή της 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone.

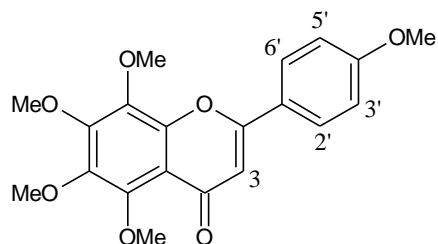
Πίνακας 3.14: Φασματοσκοπικά δεδομένα της 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone.

δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα / J	Πρωτόνιο
3.89	3H	s	-OCH ₃
3.95	3H	s	-OCH ₃
3.97	9H	s	-OCH ₃
4.00	3H	s	-OCH ₃
4.10	3H	s	-OCH ₃
7.01	1H	d (J=9Hz)	H5'
7.80	1H	d (J=9Hz)	H2'
7.84	1H	dd (J=9Hz, 2Hz)	H6'



Εικ. 3.29 Φάσμα 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone

Σε αυτό το φάσμα, όπως και προηγουμένως, απομονώθηκε σε μικρότερη ποσότητα μια ακόμη πολυμεθόξυφλαβόνη, η **4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone** ή αλλιώς tangeretin.



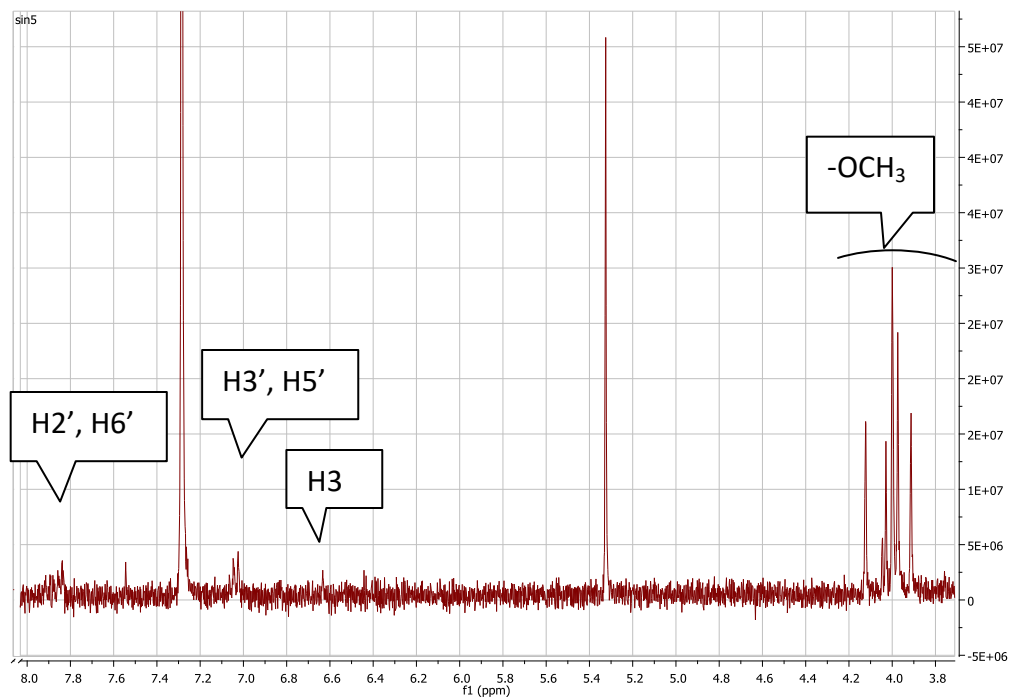
Σχήμα 3.9 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone

Οι διαφορές με την 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone εντοπίζονται στην ύπαρξη σήματος που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3 και στην απουσία του επιπλέον σήματος που αντιστοιχεί σε μεθόξυ ομάδα στον αρωματικό δακτύλιο Β. Έτσι παρουσιάζονται πέντε ομάδες μεθοξύ στα 3.89-4.10 ppm ως απλές κορυφές έχοντας από τρία πρωτόνια η κάθε μια, εκτός από την κορυφή στα 3.95 ppm που ολοκληρώνει για 6 πρωτόνια. Ο αρωματικός δακτύλιος Β, έχει δύο διαφορετικά ζεύγη (μοτίβο A_2B_2) ορθο-αρωματικών πρωτονίων που εμφανίζονται ως διπλές κορυφές στα 7.02 και 7.87 ppm με σταθερά συζεύξεως 9 Hz ($H_{2'}$, $6'$ και $H_{3'}$, $5'$).

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Li *et al.*, 2006) και τα φασματοσκοπικά δεδομένα η δομή αυτή είναι της 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone.

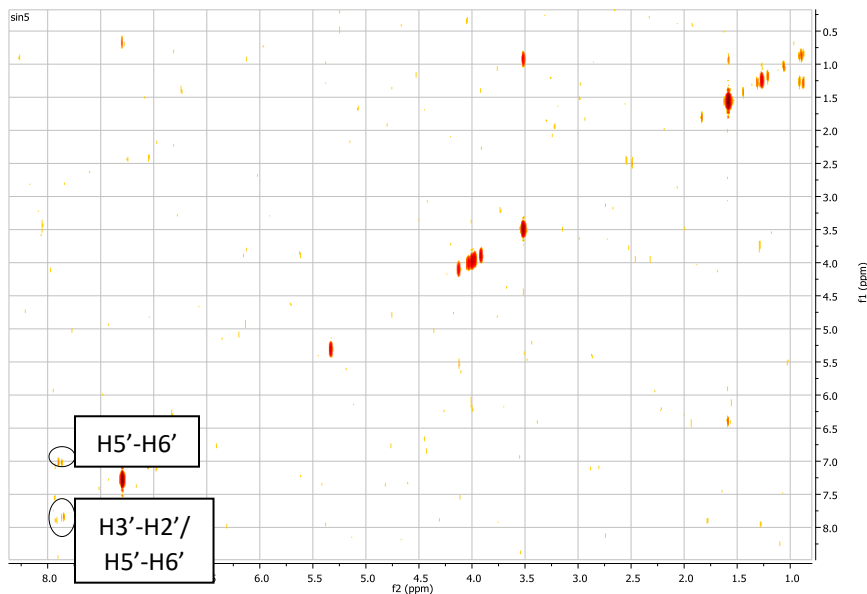
Πίνακας 3.15: Φασματοσκοπικά δεδομένα της 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone

δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα / J	Πρωτόνιο
3.89	3H	s	-OCH ₃
3.95	6H	s	-OCH ₃
4.02	3H	s	-OCH ₃
4.10	3H	s	-OCH ₃
6.61	1H	s	H ₃
7.02	2H	d (J=9Hz)	H _{3'} H _{5'}
7.87	2H	d (J=9Hz)	H _{2'} H _{6'}



Εικ. 3.30 Φάσμα πρωτονίου 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone

Με την βοήθεια του φάσματος COSY καθορίστηκαν οι συσχετισμοί συντονισμού μεταξύ των πρωτονίων. Παρατηρούμε ότι στην 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone τα φαινολικά πρωτόνια H5' και H6' του Β-δακτυλίου εμφανίζουν σύζευξη με χημική μετατόπιση 7.01/7.84 ppm αντίστοιχα. Επιπλέον, εμφανίζεται ένα επιπλέον σήμα στα 7.02/7.87 ppm, το οποίο αντιστοιχεί στα πρωτόνια του Β φαινολικού δακτυλίου της 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone, H3'-H2'/ H5'-H6'. Παρακάτω ακολουθεί το φάσμα COSY.

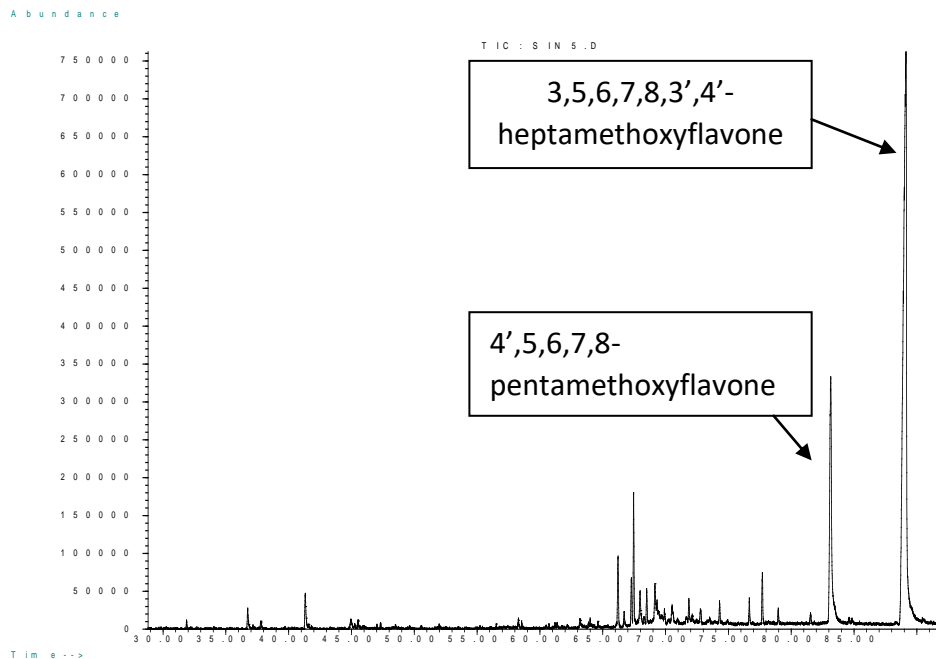


Εικ. 3.31 Φάσμα μείγματος 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone και 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone

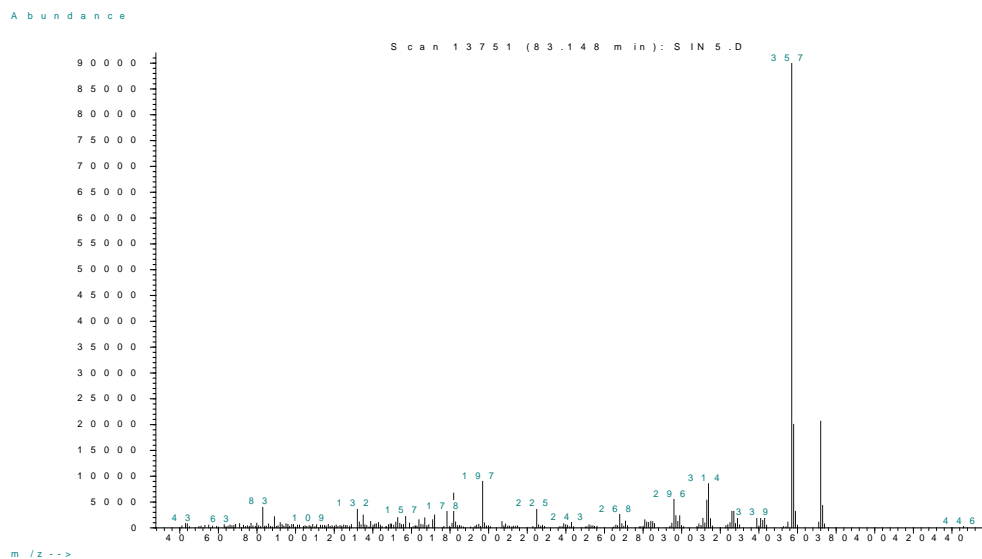
Επιπροσθέτως, η 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone παρουσιάζει μείωση της χοληστερόλης, αντικαρκινική δράση, και νευροπροστατευτική δράση (Vanhoecke *et al.*, 2005). Σε *in vitro* μελέτες, η 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone έχει αποδειχθεί ότι επάγει την απόπτωση στα κύτταρα λευχαιμίας ενώ δεν δείχνει κυτταροτοξικότητα έναντι φυσιολογικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Hirano *et al.*, 1995). Οι μεθοξυλιωμένες φλαβόνες φαίνεται να δείχνουν ισχυρές αντι-πολλαπλασιαστικές δράσεις κατά ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Manthey and Guthrie, 2002).

Παρακάτω εμφανίζεται το χρωματογράφημα και το φάσμα απο το GC-MS του μείγματος ουσιών 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone και 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone. Στο χρωματογράφημα οι δυο κορυφές των πολυμεθοξυφλαβονών εμφανίζονται στους χρόνους 83.14 min και 89.13 min, αντίστοιχα. Απο το φάσμα μάζας της 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone επιβεβαιώνεται το μοριακό βάρος (m/z) 373 και φαίνεται η θραυσματοποίηση με κύρια θραύσματα τα: 182, 197, 296, 314 και 357.

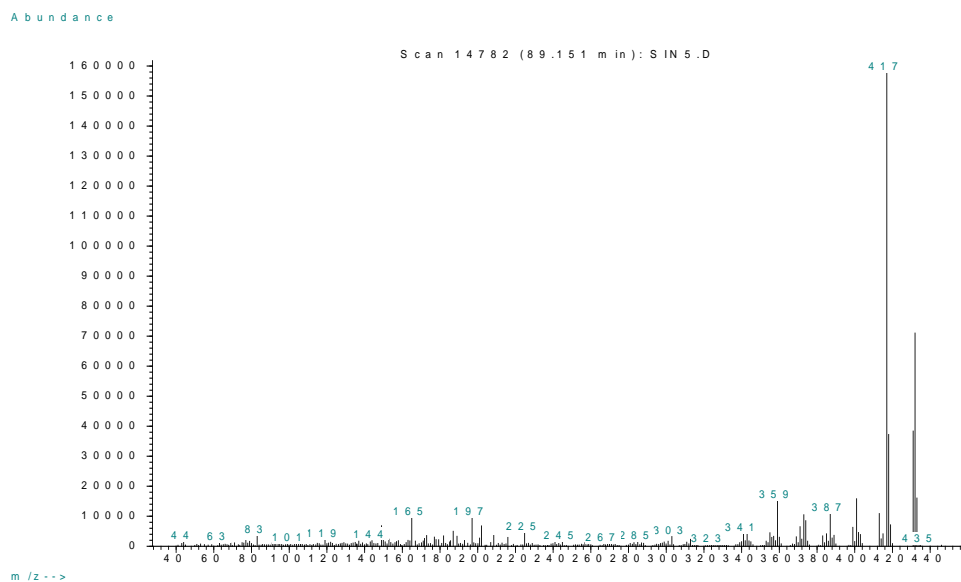
Επιπλέον, από το φάσμα μάζας της 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone επιβεβαιώνεται το μοριακό βάρος (m/z) 433 και φαίνεται η θραυσματοποίηση με κύρια θραύσματα τα: 359, 373, 387, 401 και 417.



Εικ. 3.32 Χρωματογράφημα μίγματος 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone και 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone

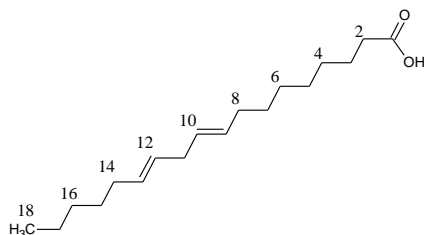


Εικ. 3.33 Φάσμα μάζας της 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone



Εικ. 3.34 Φάσμα μάζας της 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone

Κλάσμα 8: Λινολεϊκό οξύ



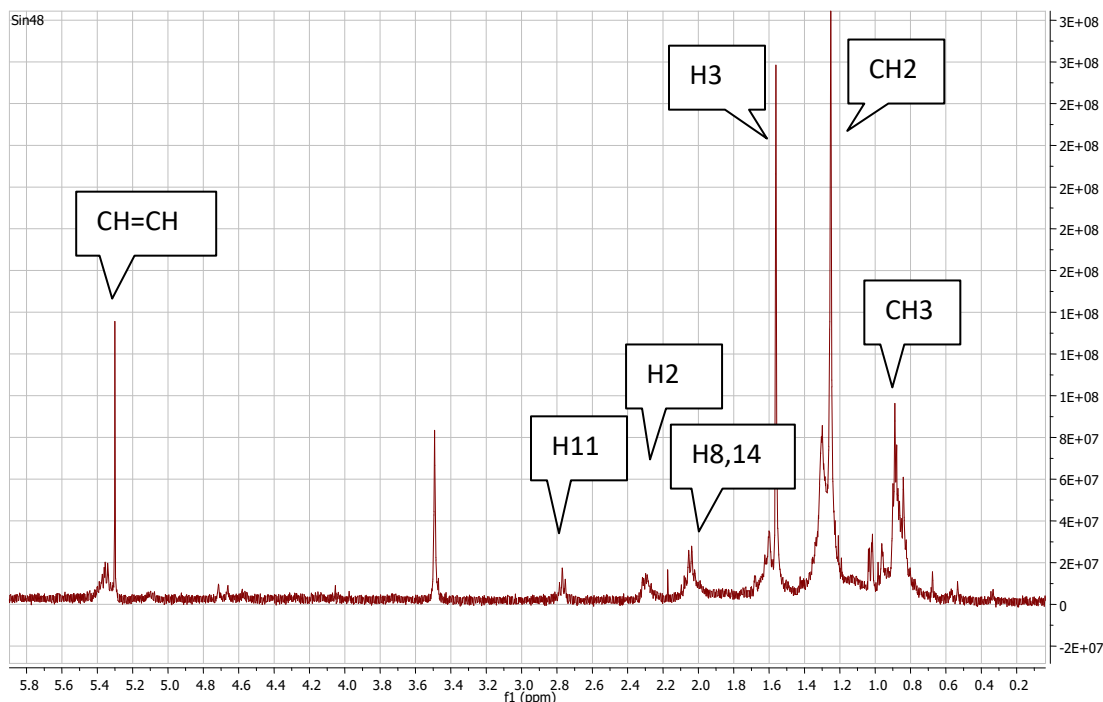
Σχήμα 3.10. Λινολεϊκό οξύ

Στο φάσμα πρωτονίου του λιπαρού οξέος, στα 0.89 ppm εμφανίζονται ως μια τριπλή κορυφή τα πρωτόνια του τελικού μεθυλίου και στη περιοχή 1.29-1.30 ppm εμφανίζονται ως ευρεία απλή κορυφή πρωτόνια μεθυλενίων. Τα πρωτόνια του άνθρακα 2 λόγω της γεινίασης με την καρβοξυλομάδα εντοπίζονται στα 2.30 ppm ενώ τα πρωτόνια της θέσης 3 εντοπίζονται στα 1.60 ppm. Τα μεθυλένια των θέσεων 8 και 14 λόγω των γειτονικών διπλών δεσμών εντοπίζονται στα 2.05 ppm ως πολλαπλή κορυφή ενώ τα ολεφινικά πρωτόνια ως πολλαπλή κορυφή στα 5.34 ppm.

Τα δεδομένα αυτά συγκρινόμενα και με την βιβλιογραφία (Stefanova *et al.*, 1988) οδηγούν στη δομή του λινολεϊκού οξέος.

Πίνακας 3.16: Φασματοσκοπικά δεδομένα του λινολεϊκού οξέος

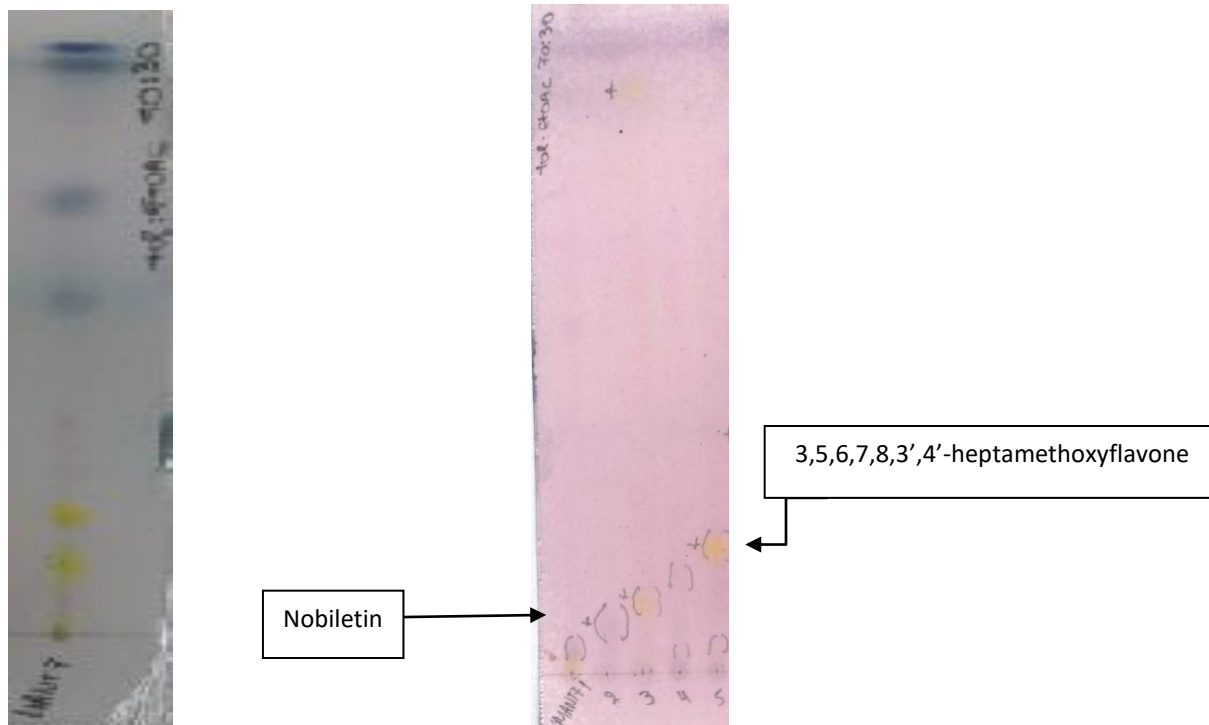
δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα / J	Πρωτόνιο
0.89	3H	t ($J=7.0$ Hz)	-CH ₃
1.29-1.32	14H	m	H4, H5, H6, H7, H15, H16, H17
1.60	2H	m	H3
2.05	4H	m	H8, H14
2.30	2H	dd ($J=2.5/7.3$ Hz)	H2
2.76	2H	t ($J=6.4$ Hz)	H11
5.34	4H	m	CH=CH



Εικ. 3.35 Φάσμα πρωτονίου λινολεϊκού οξέος

Το λινολεϊκό όπως και γενικότερα τα λιπαρά οξέα βρίσκονται σε πολλούς φυτικούς οργανισμούς και μπορούν να ταξινομηθούν ως δομικά και αποθηκευτικά συστατικά του φυτού. Το λινολεϊκό ανήκει στα ω-6-λιπαρά οξέα και χρησιμοποιείται εκτενώς στην βιομηχανία καλλυντικών λόγω των ευεργετικών του δράσεων στο δέρμα ενώ πολλές επιστημονικές δημοσιεύσεις εστιάζουν στην αντιφλεγμονώδη δράση του (Veras *et al.*, 2013).

Επίσης από το αιθέριο έλαιο του υβριδίου MANT7 απομονώθηκαν δυο καθαρές πολυμεθοξυφλαβόνες οι nobiletin και 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone. Η φασματοσκοπική ανάλυση των απομονωμένων ουσιών έγινε προηγουμένως στο υβρίδιο πορτοκαλιού O-CiSin4.



Εικ. 3.36 αιθέριο έλαιο MANT7

Εικ. 3.37 TLC 3: κλάσματα μετά τη prep-TLC του Mant7

Συμπεράσματα

Μελετήθηκαν με την αναλυτική μέθοδο GC-MS τα αιθέρια έλαια περικαρπίων και φύλλων από 7 επτά υβρίδια ελληνικής προέλευσης των παρακάτω εσπεριδοειδών.

1. *Citrus paradisi* cv Star Ruby x νερατζιά (*Citrus aurantium* L.)
2. *Citrus sinensis* cv New Hall x citrusmelo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*)
3. *Citrus sinensis* cv New Hall x trifoliata
4. *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x citrusmelo
5. *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x trifoliata
6. *Citrus grandis* cv Cuba Shaddock x trifoliata
7. *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata

Η ανάλυση των αιθερίων ελαίων όλων των παραπάνω υβριδίων **γίνεται για πρώτη φορά** στη συγκεκριμένη εργασία. Παρατηρείται ότι τα πτητικά συστατικά που ανιχνεύθηκαν βρίσκονται σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν σε άλλα υβρίδια των *C. sinensis*, *C. paradisi*, *C. grandis*, *C. reticulata*. της διεθνούς βιβλιογραφίας

Στα 7 περικάρπια που μελετήθηκαν ταυτοποιήθηκε ένα μεγάλο ποσοστό τερπενίων (94% έως 99%) εκ των οποίων τα μονοτερπένια σε ποσοστό 88-98% με κύριο εκπρόσωπο το λιμονένιο (80-95%). Το σεσκιτερπένιο nootkatone, εντοπίστηκε σε σχετικά χαμηλά ποσοστά (3.76%) στο αιθέριο έλαιο έλαιο του περικάρπιου του υβριδίου *Citrus paradisi* cv Star Ruby x νερατζιά.

Επίσης, παρατηρήθηκε η ύπαρξη **κουμαρινών** (auraptene, 7-methoxy-8-(2-oxo-3-methylbutyl)coumarin και osthole) (Hung *et al.*, 2017) στα αιθέρια έλαια των περικαρπίων των υβριδίων *Citrus paradisi* cv Star Ruby x νερατζιά και *Citrus grandis* cv Cuba Shaddock x trifoliata καθώς επίσης και **πολυμεθοξυφλαβονών** (tetramethoxy-, pentamethoxy-, hexamethoxy-, heptamethoxy-flavone) σε όλα τα περικάρπια των υβριδίων *Citrus sinensis* (εκτός από το *Citrus sinensis* cv New Hall x trifoliata) αλλά και στα *Citrus paradisi* cv Star Ruby x νερατζιά και *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata .

Οι πολυμεθοξυφλαβόνες (PMFs) βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε ιστούς και τα περικάρπια (φλούδες) διαφόρων ειδών του γένους *Citrus* και ειδικότερα σε *Citrus reticulata*,

Citrus paradisi, *Citrus sinensis* και *Citrus aurantium*, αποτελώντας χημειοταξινομικό δείκτη των εσπεριδοειδών (Mizuno *et al.*, 1991).

Το αιθέριο έλαιο των φύλλων των 7 ίδιων υβριδίων διαφέρει σημαντικά από αυτό των περικαρπίων. Το μονοτερπένιο σαβινένιο, που θεωρείται κύριο συστατικό σύμφωνα με την βιβλιογραφία, παρουσίασε μια μεγάλη διακύμανση 0.6%-43.74% με παντελή απουσία του στο υβρίδιο *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata, ενώ τα αλκάνια ανιχνεύθηκαν σε ποσοστά από 2-45%, γεγονός που εξηγείται από διάφορους παράγοντες επίδρασης όπως εποχικές διακυμάνσεις αλλά κυρίως το είδος και την ηλικία του φυτικού οργανισμού (των φύλλων) (Silva *et al.*, 2017; Scora *et al.*, 1982).

Ενδιαφέρον αποτέλεσε η απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών σε μεγαλύτερη ποσότητα από τα υβρίδια *Citrus sinensis* cv Oval Valencia Πόρου x citrumelo και *Citrus reticulata* cv Tangelo Minneola x trifoliata.

Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν φασματοσκοπικά τα παρακάτω πολυμεθοξυφλαβονοειδή:

- 3',4',5,6,7-pentamethoxyflavone (sinensetin),
- 3',4',5,6,7,8-hexamethoxyflavone (nobiletin),
- Μείγμα1: 3',4',3,5,6,7-hexamethoxyflavone & 4',5,6,7-tetramethoxyflavone
- Μείγμα2: 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (3-methoxy-nobiletin) & 4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone (tangeretin).

Επίσης απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε και το ω6 λιπαρό οξύ, λινολικο οξύ.

Οι ουσίες αυτές απομονώνονται για πρώτη φορά επίσης από τα μελετηθέντα υβρίδια ελληνικών εσπεριδοειδών.

Βιβλιογραφία

Ελληνική

- Βασιλακάκης, Μ. **2004**. "Γενική και Ειδική Δενδροκομία", Εκδόσεις Γαρταγάνης. Θεσσαλονίκη.
- Καραουλάνης, Γ. **2003**. "Τεχνολογία Επεξεργασίας Οπωροκηπευτικών", 1η Εκδ Σταμούλης Α.Ε., Αθήνα.
- Κονταράτου, Β. **2008**. "Χημική Ανάλυση – Βιολογικοί Έλεγχοι Αιθερίων Ελαίων Ειδών Κουμοκουάτ (*Fortunella*) καλλιεργούμενων στην Ελλάδα.", Αθήνα.
- Εφημερίδα της Κυβερνήσεως ΦΕΚ. **1996**. Αρ. Φύλλου 890/Β.
- Λέκκας, Δ. **2005**. "Συγκριτική Μελέτη της Χημικής Σύστασης των Αιθερίων Ελαίων των Καρπών και των Φύλλων Επτά Υβριδίων της Οικογένειας Rutaceae.", Αθήνα.
- Πρωτοπαπαδάκης, Ε. Ε. **1992**. "Εσπεριδοειδή. Γεωργίας και Κτηνοτροφίας."
- Σφλώμος, Κ. **2010**. "Στοιχεία Διατροφής. Χημεία Τροφίμων Με Στοιχεία Διατροφής" Τόμος ΙΙ. Εκδόσεις Εύδοξος.
- Σκουμπής, Β., **1988**. Αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια. Θεσσαλονίκη.

Ξενόγλωσση

- Aboobaker, V. S., A. D. Balgi, and R. K. Bhattacharya. **1994**. "In Vivo Effect of Dietary Factors on the Molecular Action of Aflatoxin B1: Role of Non-Nutrient Phenolic Compounds on the Catalytic Activity of Liver Fraction." *In Vivo* 8: 1095–1098.
- Ajaiyeoba, E. O., O. Oladepo, O. I. Fawole, O. M. Bolaji, D. O. Akinboye, O. A. T. et al. **2003**. "Cultural Categorization of Febrile Illnesses in Correlation with Herbal Remedies Used for Treatment in Southwestern Nigeria." *J Ethnopharmacol* 85 (2–3): 179–185.
- Amzad Hossain, M., and Z. Ismail. **2016**. "Quantification and Enrichment of Sinensetin in the Leaves of *Orthosiphon stamineus*." *Arab J Chem* 9: 1338–1341.
- Arias, B. Á., and L. Ramón-Laca. **2005**. "Pharmacological Properties of *Citrus* and Their Ancient and Medieval Uses in the Mediterranean Region." *J Ethnopharmacol* 97 (1): 89–95.
- Bagge D. **1999**. "Limonoids: Pesticide to anticancer applications from secondary metabolites of the Rutaceae and Meliaceae."
- Baghurst, K. **2003**. "The Health Benefits of *Citrus* Fruits." In, 68. Horticultural Australia Ltd.

- Barrett, H.C., and A. M. Rhodes. **1976**. "A Numerical Taxonomic Study of Affinity Relationships in Cultivated *Citrus* and Its Close Relatives." *Syst Bot* 1 (2): 105–136.
- Benavente-Garcia, O., J. Castillo, R. Francisco, M. Ana-Ortuno, and J. Delrio. **1997**. "Uses and Properties of *Citrus* Flavonoids." *J Agric Food Chem* 45: 4505–4515.
- Berhow, M.A., C.H. Fong, and S. Hasegawa. **1996**. "Limonoid and flavonoid composition in varieties of papeda and papedocitrus." *Biochem System Ecol* 24: 237–242.
- Bok, S. H., S. H. Lee, Y. B. Park, K. H. Bae, K. H. Son, T. S. Jeong, and M. S. Choi. **1999**. "Plasma and Hepatic Cholesterol and Hepatic Activities of 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA Reductase and Acyl CoA: Cholesterol Transferase Are Lower in Rats Fed *Citrus* Peel Extract or a Mixture of *Citrus* Bioflavonoids." *J Nutr* 129: 1182–1185.
- Borah, N., S. Gunawardana, H. Torres, S. McDonnell, and S. Van Slambrouck. **2017**. "5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone Inhibits Growth of Triplenegative Breast Cancer Cells via Suppression of MAPK and Akt Signaling Pathways and Arresting Cell Cycle". *International Journal of Oncology* 51 (6): 1685–1693.
- Calabrese, F. **2004**. "1 Origin and History." In *Citrus: The Genus Citrus*, edited by D. Giovanni and Di A. Giacomo, 1–15. London: Taylor and Francis.
- Chen, J., and A. M. Montanari. **1998**. "Isolation and Identification of New Polymethoxyflavonoids from Dancy Tangerine Leaves." *J Agric Food Chem* 46 (4): 1235–38.
- Chen, J., A. M. Montanari, and W. W. Widmer. **1997**. "Two New Polymethoxylated Flavones, a Class of Compounds with Potential Anticancer Activity, Isolated from Cold Pressed Dancy Tangerine Peel Oil Solids." *J Agric Food Chem* 45 (2): 364–368.
- Darjazi, B. B. **2014**. "Comparison of Peel Components of Pummelo (*Citrus grandis*) Obtained Using Cold-Press and Hydrodistillation Method." *Int J Agric and Biosci* 3 (1): 13–17.
- Dugo, G., and I. Bonaccors. **2013**. *Citrus Bergamia: Bergamot and Its Derivatives*. Illustrate. Vol. 1. CRC Press.
- Economos, C., and W. D. Clay. **1999**. "Nutritional and Health Benefits of *Citrus* Fruits." *Food, Nutr Agricult- FAO* 24: 11–18.
- Edris, A. E. **2007**. "Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review." *Phytother Res* 21: 308–323.

- Ekundayo, O., O. Bakare, A. Adesomoju, and E. Stahl-Biskup. **1990**. "Leaf Volatile Oil Composition of Mandarin (*Citrus reticulata*) from Nigeria." *J Ess Oil Res* 2 (6): 329–330.
- Engler, A. **1931**. "Rutaceae. In: Engler, A.; Prantl, K.(Ed.) *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*." In, Second edi, 187–359. Leipzig.
- Fraisse, D., and C. Scharff. **1988**. "Analysis of Leaf Oils from Four Varieties of Sweet Orange by Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry" *Wiley* 3: 47–52.
- Franco-Vega, A., F. Reyes-Jurado, G. A. Cardoso-Ugarte, M. E. Sosa-Morales, E. Palou, and A. López-Malo. **2016**. *Sweet Orange (Citrus sinensis) Oils. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc.
- Freeman, B. **1978**. "Cuticular Waxes of Developing Leaves and Fruits of *Citrus* and Blueberry: Ultra Structure and Chemistry." University of Florida, Gainesville.
- Fritz, W.D. **1970**. *Citrus Cultivation and Fertigation*. RUHR, Stickstoff A.G., Bochum.
- Furusawa, M., T. Hashimo, Y. Noma, and Y. Asakawa. **2005**. "Highly Efficient Production of Nootkatone, the Grapefruit Aroma from Valencene, by Biotransformation." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 53 (11): 1513–1514.
- Gallesio, G. **1829**. *Traité Du Citrus*. Paris: L. Fantin libraire.
- Garcia, M. A., and J. L. Garcia-Martinez. **1984**. "Endogenous Plant Growth Substances Content in Young Fruits of Seeded and Seedless Clementine Mandarin as Related to Fruit Set and Development." *Sci Hort* 22: 265–274.
- Garg, A., S. Garg, L. J. D. Zaneveldand, and A. K. Singla. **2001**. "Chemistry and Pharmacology of the *Citrus* Bioflavonoid Hesperidin." *Phytother Res* 15: 655–669.
- Guidong, L., Cuncang, J., & Yunhua, W. **2011**. "Distribution of boron and its forms in young "Newhall" navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) plants grafted on two rootstocks in response to deficient and excessive boron. *Soil Science and Plant Nutrition*." 57(1): 93–104.
- Gurib-Fakim, A., and F. Demarne. **1995**. "Aromatic Plants of Mauritius: Volatile Constituents of the Leaf Oils of *Citrus aurantium* L., *Citrus paradisi* Macfad and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck." *J Essent Oil Res* 7 (1): 105–109.

- Herrero, R., M. J. Asins, E. A. Carbonell, and L. Navarro. **1996**. "Genetic Diversity in the Orange Subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and Intragenus Genetic Variability." *Theor Appl Gen* 92: 599–609.
- Hirano, T., K. Abe, M. Gotoh, and K. Oka. **1995**. "Citrus Flavone Tangeretin Inhibits Leukaemic HL-60 Cell Growth Partially through Induction of Apoptosis with Less Cytotoxicity on Normal Lymphocytes." *British J Cancer* 72 (6): 1380–1388.
- Hodgson, R.W. **1967**. "Horticultural Varieties of *Citrus*." In *The Citrus Industry*, edited by W. Reuther, H. J. Webber, L. D. Batchelor, and Eds, 431–459. University of California, Berkeley.
- Huang, S. M., and L. J. Lesko. **2004**. "Drug-Drug, Drug-Dietary Supplement, and Drug-Citrus Fruit and Other Food Interactions: What Have We Learned?" *J Clin Pharmacol* 44 (6): 559–569.
- Kang, S. I., H. S. Shin, H. C. Ko, and S. J. Kim. **2013**. "Effects of Sinensetin on Lipid Metabolism in Mature 3t3-l1 Adipocytes." *Phytother Res* 27 (1): 131–134.
- Kazuhito, O., M. Kiyotaka, and S. Takayuki. **1990**. "Variation in Leaf Terpenoids with Ploidy Level in *Citrus* Cultivars and Hybrids." *Phytochem* 29 (6): 1889–1891.
- Kokwaro, J. O. **2009**. *Medicinal Plants of East Africa*. Third. University of Nairobi Press.
- Ladaniya, M. **2008**. "Fruit Morphology, Anatomy, and Physiology." In *Citrus Fruit, Biology Technology and Evaluation*, edited by C. A Minihane, First, 103–121. London: Elsevier.
- Lee, A. T. C., J. Joubert, and S. P. Van Vuuren. **2009**. "Rootstock Choice." In *Rootstock Choice Intergrated Production Guidelines for Export Citrus*. Vol I.
- Li, S., C. Y. Lo, and C. T. Ho. **2006**. "Hydroxylated Polymethoxyflavones and Methylated Flavonoids in Sweet Orange (*Citrus sinensis*) Peel." *J Agric Food Chem* 54 (12): 4176–4185.
- Li, S., H. Wang, L. Guo, H. Zhao, and C. T. Ho. **2014**. "Chemistry and Bioactivity of Nobiletin and Its Metabolites." *J Funct Foods* 6: 2–10.
- Lin, N., T. Sato, Y. Takayama, Y. Mimaki, Y. Sashida, M. Yano, and A. Ito. **2003**. "Novel Anti-Inflammatory Actions of Nobiletin, a *Citrus* Polymethoxy Flavonoid, on Human Synovial Fibroblasts and Mouse Macrophages." *Biochem Pharmacol* 65: 2065–2071.
- Liu, Y., E. Heying, and S. A. Tanumihardjo. **2012**. "History, Global Distribution, and Nutritional Importance of *Citrus* Fruits." *Compr Rev Food Sci Food Safety* 11 (6): 530–545.

- Ljubesic, N. **1984**. "Structural and Fuctional Changes of Plastids during Yellowing and Regreening of Lemon Fruits." *Act Bot Croat* 43: 25–30.
- Lota, M. L., D. de Rocca Serra, F. Tomi, and J. Casanova. **2000**. "Chemical Variability of Peel and Leaf Essential Oils of Mandarins from *Citrus Reticulata* Blanco." *Biochem System and Ecol* 28 (1): 61–78.
- Mabberley, D. J. **1997**. "A Classification for Edible *Citrus* (Rutaceae)." *Telopea* 7 (2): 167–172.
- Manthey, J. A. **2006**. "Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of the Polymethoxylated Flavone Content of Orange Oil Residues." *J Agric Food Chem* 54 (9): 3215–3218.
- Manthey, J. A., and K. Grohmann. **2001**. "Phenols in *Citrus* Peel Byproducts. Concentrations of Hydroxycinnamates and Polymethoxylated Flavones in *Citrus* Peel Molasses." *J Agric Food Chem* 49 (7): 3268–3273.
- Manthey, J., and N. Guthrie. **2002**. "Antiproliferative Activities of Citrus Flavonoids against Six Human Cancer Cell Lines." *J Agric Food Chem* 50: 5837–5843.
- Martinez, A. L., and J. M. Wallace. **1967**. "*Citrus* Leaf-Mottle-Yellows Disease in the Philippines and Transmission of the Causal Virus by a Psyllid, *Diaphorina Citri* Kuway." *Plant Dis Reprtr.* 51 (6): 92–95.
- Miyazawa, M., Y.Okuno, M.Fukuyama, S. Nakamura, and H.Kosaka. **1999**. "Antimutagenic activity of polymethoxyflavonoids from *Citrus aurantium*. Journal of agricultural and food chemistry". *J agric food chem.* 47: 5239-5244.
- Mizuno, M., M. Iinuma, M. Ohara, T. Tanaka, and M. Iwamasa. **1991**. "Chemotaxonomy of the Genus *Citrus* Based on Polymethoxyflavones." *Chemical and Pharmac Bul* 39 (4): 945–949.
- Morley, K. L., P. J. Ferguson, and J. Koropatnick. **2007**. "Tangeretin and Nobiletin Induce G1 Cell Cycle Arrest but Not Apoptosis in Human Breast and Colon Cancer Cells." *Cancer Letts* 251 (1): 168–178.
- Morton, J. F. **1975a**. "Current Folk Remedies of Northern Venezuela." *J Crude Drug Res* 13: 97–121.
- Morton, J. F. **1975b**. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*. Springfield, Illinois: Thomas.

- Nagase, H., N. Omae, A. Omori, O. Nakagawasai, T. Tadano, A. Yokosuka, Y. Sashida, Y. Mimaki, T. Yamakuni, and Y. Ohizumi. **2005**. "Nobiletin and Its Related Flavonoids with CRE-Dependent Transcription-Stimulating and Neuritegenic Activities." *Biochem Biophys Res Commun* 337 (4): 1330–1336.
- Ng, Tzi B., A. El-Din Ahmed Bekhit, E. F. Fang, Xi. Li, Q. Lu, H. Guo, and J.Ho Wong. **2015**. *Grapefruit (Citrus paradisi) Oils. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc.
- Nicolosi, E. **2007**. "Origin and Taxonomy." In *Citrus: Genetics, Breeding and Biotechnology*, edited by I. A. Khan, 19–41, 49–50. UK : Biddles Ltd, Kings, Lynn: CABI.
- Nicolosi, E., Z. N. Deng, A. Gentile, S. La Malfa, G. Continella, and E. Tribulato. **2000**. "Citrus Phylogeny and Genetic Origin of Important Species as Investigated by Molecular Markers." *Theor Appl Gen* 100 (8): 1155–1166.
- Njoroge, S. M., H. Koaze, P. N. Karanja, and M. Sawamura. **2005**. "Volatile Constituents of Redblush Grapefruit (*Citrus paradisi*) and Pummelo (*Citrus grandis*) Peel Essential Oils from Kenya." *J Agric Food Chem* 53 (25): 9790–9794.
- Okunowo, W. O., O. Oyedeji, L. O. Afolabi, and E. Matanmi. **2013**. "Essential Oil of Grape Fruit (*Citrus paradisi*) Peels and Its Antimicrobial Activities." *Am J Plant Sci* 4 (7): 1–9.
- Ortiz, M. J. **2002**. "Botany: Taxonomy, Morphology and Physiology of Fruits, Leaves and Flowers." In *Citrus: The Genus Citrus*, edited by A. Di Giovanni and G. Dugo, 16–32. London: Taylor and Francis.
- Ou, M. C., Y. H. Liu, Y. W. Sun, and C. F. Chan. **2015**. "The Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Cold-Pressed and Distilled Essential Oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Parmar, H. S., and A. Kar. **2007**. "Protective Role of *Citrus sinensis*, *Musa paradisiaca*, and *Punica granatum* Peels against Diet-Induced Atherosclerosis and Thyroid Dysfunctions in Rats." *Nutr Res* 27 (11): 710–718.
- Pizzorno, J., and M. Murray. **1999**. *Textbook of Natural Medicine*. Second. New York: Churchill Livingstone.

- Prasad, D. A., B. R. Prasad, D. K. Prasad, P. Shetty, and K. N. S. Kumar. **2016**. "GC-MS Compositional Analysis of Essential Oil of Leaf and Fruit Rind of *Citrus maxima* (Burm.) Merr. from Coastal Karnataka, India." *J Appl Pharmac Sci* 6 (5): 68–72.
- Proteggente, A. R., A. Saija, A. De Pasquale, and C. A. Rice-Evans. **2003**. "The Compositional Characterisation and Antioxidant Activity of Fresh Juices from Sicilian Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Varieties." *Free Rad Res* 37 (6): 681–687.
- Qiao, Y., J. X. Bi, Y. Zhang, Y. Zhang, G. Fan, L. Y. Xiao, and Y. P. Si. **2008**. "Characterization of Aroma Active Compounds in Fruit Juice and Peel Oil of Jincheng Sweet Orange Fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) by GC-MS and GC-O." *Molecules* 13 (6): 1333–1344.
- Rodrigues, A., A. Sandström, T. Cá, H. Steinsland, H. Jensen, and P. Aaby. **2000**. "Protection from Cholera by Adding Lime Juice to Food - Results from Community and Laboratory Studies in Guinea-Bissau, West Africa." *Trop Med Intern Health* 5 (6): 418–422.
- Sawamura, M., N. Thi Minh Tu, Y. Onishi, E. Ogawa, and H. S. Choi. **2004**. "Characteristic Odor Components of *Citrus reticulata* Blanco (Ponkan) Cold-Pressed Oil." *Biosci Biotechnol Biochem* 68 (8): 1690–1697.
- Scora, R. W. **1988**. "Biochemistry, Taxonomy and Evolution of Modern Cultivated *Citrus*." Edited by R. Goren, K. Mendel, and Eds. *Proc Int Soc Citricult* 1: 277–289.
- Scora, R. W., J. Kumamoto, and W. A. Clerx. **1982**. "Leaf Hydrocarbons in the Genus *Citrus*." *J Agric Food Chem* 30 (4): 692–695.
- Shanshan, G., Q. Peiju, X. Guang, W. Xian, D. Ping, Y. Guanpin, Z. Jinkai, J. David, McClements, and X. Hang. **2012**. "Synergistic Anti-Inflammatory Effects of Nobiletin and Sulforaphane in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells." *J Agric Food Chem* 60: 2157–2164.
- Shin, H., J. Nam, U. Yoon, A. Han, and E. Seo. **2012**. "Identification of Three New Flavonoids from the Peels of *Citrus Unshiu*." *Helvet Chim Acta* 95 (2): 240–245.
- Silva, R. M., R. Tasso Moreira Ribeiro, R. J. C. Souza, A. F. M. Oliveira, S. I. Silva, and M. I. Gallão. **2017**. "Cuticular N-Alkane in Leaves of Seven Neotropical Species of the Family Lecythidaceae: A Contribution to Chemotaxonomy." *Acta Botan Brasil* 31 (1): 137–140.
- Singh, G., and O. P. Singh. **2002**. "Chemistry of Essential Oils of *Citrus* Species." *Nat Product Radiance*, 21.

- Song, M., N. Charoensinphon, X. Wu, J. Zheng, Z. Gao, F. Xu, M. Wang, and H. Xiao. **2016**. "Inhibitory Effects of Metabolites of 5-Demethylnobiletin on Human Nonsmall Cell Lung Cancer Cells." *J Agric Food Chem* 64: 4943–4949.
- Steinke, K., E. Jose, D. Sicker, H. U. Siehl, K. P. Zeller, and S. Berger. **2013**. "Ein Flavon Sinensetin." *Chemie* 47 (3): 158–163.
- Suzuki, M., K. Sasaki, F. Yoshizaki, K. Oguchi, M. Fujisawa, and J. C. Cyong. **2005**. "Anti-Hepatitis C Virus Effect of *Citrus unshiu* Peel and Its Active Ingredient Nobiletin." *J Chin Med* 33: 87–88.
- Swift, J. **1964**. "Isolation from Orange-Peel Juice." *J Food Sci* 29 (6): 766–767.
- Tanaka, S., T. Sato, N. Akimoto, M. Yano, and A. Ito. **2004**. "Prevention of UVB-Induced Photoinflammation and Photoaging by a Polymethoxy Flavonoid, Nobiletin, in Human Keratinocytes *in Vivo* and *in Vitro*." *Biochem Pharmacol* 68: 433–439.
- Tholl, D. **2015**. *Biotechnology of Isoprenoids. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Edited by J. Schrader and J. Bohlmann. Advances i. Cham, Switzerland: Springer.
- USDA. **2017**. "Citrus Fruits." *United States Department of Agriculture*, no. August.
- Vanhoecke, B., F. Delporte, E. Van Braeckel, A. Heyerick, H. Depypere, M. Nuytinck, D. De Keukeleire, and M. Bracke. **2005**. *A Safety Study of Oral Tangeretin and Xanthohumol Administration to Laboratory Mice. In Vivo*. Vol. 19.
- Varkey, T. K., J. Mathew, and S. Baby. **2014**. "Chemical Variability of *Citrus maxima* Essential Oils from South India." *Asian J Chem* 26 (8): 2207–2210.
- Venkata, R. B., L. A. Samuel, S. M. Pardha, R. B. Narashimha, K. A. Naga Vamsi, M. Sudhakar, and T. M. Radhakrishnan. **2012**. "Antibacterial, Antioxidant Activity and GC-MS Analysis of *Eupatorium Odoratum*." *As J Pharmac Clin Res* 5 (2): 99–106.
- Veras, H. N. H., M. K. A. Araruna, J. G. M. Costa, H. D. M. Coutinho, M. R. Kerntopf, M. A. Botelho, and I. R. A. Menezes. **2013**. "Topical Antiinflammatory Activity of Essential Oil of *Lippia Sidoides* Cham: Possible Mechanism of Action." *Phytother Res* 27 (2): 179–185.
- Viuda-Martos, M., Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, and J. Perez-Álvarez. **2008**. "Antibacterial Activity of Lemon (*Citrus lemon* L.), Mandarin (*Citrus reticulate* L.),

- Grapefruit (*Citrus paradise* L.) and Orange (*Citrus sinensis* L.) Essential Oils." *J Food Safety* 28 (4): 567–576.
- Wang, L., J. Wang, L. Fang, Z. Zheng, D. Zhi, S. Wang, S. Li, Chi T. Ho, and H. Zhao. **2014**. "Anticancer Activities of *Citrus* Peel Polymethoxyflavones Related to Angiogenesis and Others." *BioMed Res Int*, 10.
- Wills, R., B. McGlasson, D. Graham, and D. Joyce. **1998**. "Postharvest: An Introduction to the Physiology and Handling." *CAB Int*, 262.
- Wren, R. C. **1988**. *Potter's New Cyclopaedia of Botanical Drugs and Preparations*. C.W. Daniel Company Ltd.
- Wu, X., M. Song, P. Qiu, K. Rakariyatham, F. Li, Z. Gao, X. Cai, *et al.* **2017**. "Synergistic Chemopreventive Effects of Nobiletin and Atorvastatin on Colon Carcinogenesis." *Carcinogenesis* 38 (4): 455–464.
- Wutscher, H. K., and K. D. Bowman. **1999**. "Performance of 'Valencia' Orange on 21 Rootstocks in Central Florida." *Hort Science* 34 (4): 622–624.
- Zhao, G., G. Wen, Z. Su-Ling, L. Ping, and L. E-Hu. **2018**. "Chemical Structures, Bioactivities and Molecular Mechanisms of Citrus Polymethoxyflavones." *J Funct Foods* 40: 498–509.
- Ziegler, H. **2007**. *Flavourings Production, Composition, Applications, Regulations*. Sec. ed. Germany: Wiley-VCH.

Διαδικτυακές πηγές

- <http://citruspages.free.fr/sweetoranges.html>. "Citrus Pages." **2011**. Ημερομηνία πρόσβασης 31.05.2018.
- <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>. "FAO." **2014**. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Ημερομηνία πρόσβασης 31.05.2018

ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ

Χημική ανάλυση αιθερίων ελαίων επιλεγμένων δειγμάτων γλυκανίσου

Κεφάλαιο 1 Γενικό Εισαγωγικό Μέρος

1.1 Φαρμακευτικά (medicinal) -Αρωματικά (aromatic) Φυτά (Φ.Α.Φ)

Τα Φαρμακευτικά (medicinal)-Αρωματικά (aromatic) Φυτά (Φ.Α.Φ) και οι δευτερογενείς μεταβολίτες αυτών, μπορούν να αποτελέσουν πηγές νέων φαρμάκων για τον άνθρωπο και νέων ουσιών για τη βελτίωση της διατροφής του. Η χρήση των Φ.Α.Φ εστιάζεται σε διαφορετικά εκχυλίσματά τους καθώς και τα αιθέρια έλαιά τους. Οι διαφορετικές κατηγορίες ενώσεων που χαρακτηρίζουν κάθε μορφή (κυρίως φαινολικά συστατικά στα εκχυλίσματα και πτητικά συστατικά στα αιθέρια έλαια) μπορεί να παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες, όπως π.χ. ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA, 2014) έχει ήδη προχωρήσει στην αποδοχή περισσότερων από 150 φυτικών ειδών των οποίων τα αιθέρια έλαια, και τα φυσικά εκχυλίσματα θεωρούνται ασφαλή για να χρησιμοποιηθούν από τον άνθρωπο χωρίς περιορισμούς στη χρήση τους. Στην Ε.Ε. έχει τεθεί σε εφαρμογή από το 2004 η οδηγία 24/EC στην οποία περιλαμβάνονται προδιαγραφές για την απόκτηση άδειας κυκλοφορίας των φυτικών φαρμάκων, ως Παραδοσιακά Φάρμακα φυτικής προέλευσης (Traditional Herbal Medicinal Products, THMPs) ή Φυτικά φάρμακα καλώς καθιερωμένης χρήσης (Well Established Use Herbal Medicinal Products, WEU). Επιπρόσθετα, για τα αρωματικά φυτά που χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα, όλες οι διαδικασίες παραγωγής και επεξεργασίας τους θα πρέπει να συμμορφώνονται πλήρως με τις δυο σχετικές κατευθυντήριες γραμμές της Ε.Ε. για την υγιεινή των τροφίμων. Αυτές αφορούν τις γενικές αρχές για την υγιεινή των τροφίμων του Διατροφικού Κώδικα (Codex Alimentarius) καθώς και την Ευρωπαϊκή Οδηγία για την ορθή παρασκευαστική πρακτική.

Η δημιουργία λειτουργικών τροφίμων που θα στηρίζονται στον αρμονικό συνδυασμό της υψηλής διατροφικής αξίας τροφίμων, με τις ευεργετικές ιδιότητες επιλεγμένων φυτικών εκχυλισμάτων, με έμφαση στην Ελληνική χλωρίδα, προσδίδει ανταγωνιστικό πλεονέκτημα λόγω της υψηλής θρεπτικής αξίας των προϊόντων και λόγω των σπάνιων ενδημικών ειδών που περιλαμβάνονται στην ελληνική χλωρίδα.

Η καλλιέργεια και η αξιοποίηση στην Αγροδιατροφική Βιομηχανία Φαρμακευτικών Αρωματικών Φυτών (Φ.Α.Φ) είναι ένας δυναμικός και πολλά υποσχόμενος οικονομικός κλάδος

με σημαντική παρουσία στις Μεσογειακές χώρες, αλλά ασθενή παρουσία στην Ελλάδα (Πολυσίου, 2015). Ειδικά στον τομέα των Πράσινων Εκχυλισμάτων (Green Extracts) η Ελλάδα διαθέτει ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα (γεωμορφολογία, κλιματικές συνθήκες, βιοποικιλότητα, χημειότυποι Φ.Α.Φ) και αξιόλογο δυναμικό που δεν έχουν ακόμη αξιολογηθεί με σκοπό την αξιοποίησή τους (Ταραντίλης, 2015).

Τα βιολογικά καλλιεργημένα ή αυτοφυή Φ.Α.Φ περιέχουν βιοδραστικά συστατικά που τα καθιστούν περιζήτητα ως πρώτες ύλες νέων προϊόντων αυξημένης διατροφικής αξίας (Αναστασάκη, 2014; Ζαρλαχά, 2016). Όμως η αποτελεσματικότητα και η οικονομική επιτυχία των εκμεταλλεύσεων εξαρτάται από παράγοντες όπως η επιλογή του κατάλληλου Φ.Α.Φ για την περιοχή ενδιαφέροντος, ο χημειότυπος του φυτού, το κατάλληλο πιστοποιημένο πολλαπλασιαστικό υλικό, τα κόστη καλλιέργειας, τα κόστη διαχείρισης και διακίνησης (logistics) από το χωράφι στην μονάδα επεξεργασίας, η μέθοδος ποιοτικής και ποσοτικής παραγωγής (ξήρανσης, απόσταξης *drying & extraction*) αιθέριων ελαίων από την φυτική μάζα που καθορίζουν την ποιότητα και τιμή του τελικού προϊόντος. Ειδικά η γνώση του χημειότυπου του Φ.Α.Φ είναι σημαντική, πρώτον διότι σε μεγάλο βαθμό καθορίζει την τιμή πώλησης αιθέριου ελαίου και δεύτερον διότι ο σχεδιασμός αποδοτικών μονάδων ξήρανσης, απόσταξης εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των συστατικών των αποσταζόμενων αιθέριων ελαίων.

Για την παραγωγή ελαίων υψηλής ποιότητας και τιμής είναι απαραίτητο η φυτική μάζα να έχει συλλεχθεί την καταλληλότερη περίοδο (Ozkan *et al.*, 2009), να έχει υποστεί τις ηπιότερες δυνατόν διεργασίες ξήρανσης και απόσταξης (Parageorgiou *et al.*, 2008; Jimenez-Carmona *et al.*, 1999), με στόχο να διατηρηθούν μέχρι το τελικό προϊόν τα πιο σημαντικά συστατικά των αιθέριων ελαίων, τα φαινολικά συστατικά, που είναι ουσίες ευαίσθητες σε θερμότητα, που οξειδώνονται εύκολα.

Για το λόγο αυτό, η φυσική ξήρανση και η υδραπόσταξη σε χαμηλές πιέσεις και θερμοκρασίες θεωρούνται καλύτερες, έχουν όμως το μειονέκτημα της μεγάλης χρονικής διάρκειας στις διεργασίες και επομένως χαμηλά δυναμικά παραγωγής.

Ταυτόχρονα, η φυσική ξήρανση και η υδραπόσταξη είναι οι πιο προσιτές οικονομικά μέθοδοι παραγωγής για τις Ελληνικές συνθήκες. Η βέλτιστη ξήρανση (*optimum drying*) είναι εκείνη με

την ελάχιστη χρονική διάρκεια και κατανάλωση ενέργειας με ταυτόχρονη μέγιστη διατήρηση των δραστικών συστατικών στην ξηρή φυτική μάζα.

Στην Ελλάδα έχει γίνει έρευνα για τα αγρονομικά, βιολογικά (Παναγόπουλος, 2012) και χημικά χαρακτηριστικά των Φ.Α.Φ, για τις συνθήκες καλλιέργειας και εργαστηριακής επεξεργασίας τους, για τη χημική τους σύσταση καθώς και για τις νέες μεθόδους απόσταξης (Γαρδέλη, 2009; Δαφερέρα, 2003; Προεστός, 2005).

Τα θέματα έχουν μελετηθεί εκτενέστερα σε χώρες με παρόμοιες κλιματολογικές συνθήκες ή σε χώρες με παράδοση στην παραγωγή και αξιοποίηση αρωματικών φυτών (π.χ. Ισπανία, Μεξικό, Κολομβία, Ιράν, Τουρκία, Μαλαισία (Nurul et al. 2004; Moralizadeh, 2013; Peredo – Luna, 2009).

1.1.1 Τα κυριότερα αυτοφυή ή/και καλλιεργούμενα ΦΑΦ στην Ελλάδα

Στην Ευρώπη αυτοφύονται περίπου 200 είδη Φ.Α.Φ, ενώ στη χώρα μας, λόγω των ευνοϊκών και κλιματολογικών συνθηκών αυτοφύονται πάνω από 112 είδη Φ.Α.Φ, από τα οποία τα 68 είναι συγχρόνως και μελισσοτροφικά. Τα σπουδαιότερα αυτοφυή ή και καλλιεργούμενα Φ.Α.Φ συνοψίζονται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1 Τα σπουδαιότερα αυτοφυή ή και καλλιεργούμενα Φ.Α.Φ, η λατινική ονομασία τους και η οικογένειά τους

Ελληνική ονομασία	Λατινική ονομασία	Οικογένεια
Βασιλικός	<i>Ocimum basilicum</i>	Lamiaceae
Γιασεμί	<i>Jasminum grandiflorum</i>	Oleaceae
Γλυκάνισος	<i>Pimpinella anisum</i>	Apiaceae
Δίκταμος	<i>Origanum dictamnus</i>	Lamiaceae
Θυμάρι	<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae
Κάππαρη	<i>Capparis spinosa</i>	Capparidaceae
Κορίανδρος	<i>Coriandrum sativum</i>	Apiaceae

Κρόκος	<i>Crocus sativus</i>	Iridaceae
Κύμινο	<i>Cuminum cyminum</i>	Apiaceae
Λεβάντα	<i>Lavandula vera</i>	Lamiaceae
Μάραθος	<i>Foeniculum vulgare</i>	Apiaceae
Ματζουράνα	<i>Origanum majorana</i>	Lamiaceae
Ρίγανη	<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae
Τσάι του βουνού	<i>Sideritis sp.</i>	Lamiaceae
Φασκόμηλο	<i>Salvia officianalis</i>	Lamiaceae
Χαμομήλι	<i>Matricaria chamomila</i>	Asteraceae

Γλυκάνισος *Pimpinella anisum* (Apiaceae)

Στη παρούσα εργασία επιλέχθηκε ο γλυκάνισος για την ανάλυση του αιθερίου ελαίου του. Συγκεκριμένα αναλύθηκε ο γλυκάνισος από τη περιοχή Λισβορίου της Λέσβου που θεωρείται ο καλύτερος λόγω του μικροκλίματος της περιοχής, δίνοντας τελικά μια εξαιρετικής ποιότητας πρώτη ύλη για την ποτοποιία, τη αρτοποιία- ζαχαροπλαστική και τη φαρμακοποιία. Ο γλυκάνισος Λισβορίου αποστάχθηκε σε τρεις διαφορετικούς χρόνους (1h, 2h και 3h) και στον χρόνο της μιας ώρας η απόδοση του ελαίου ήταν η μεγαλύτερη. Ακολούθησε η συγκριτική ανάλυση του αιθερίου ελαίου Λισβορίου με άλλους γλυκάνισους της ελληνικής αγοράς.

1.2 Δρογοβοτανική



Εικόνα 1.1 Το φυτό γλυκάνισος

Όνομα: *Pimpinella anisum* L. **Οικογένεια:** Apiaceae

Ιστορικό: Ιθαγενές φυτό της Μέσης Ανατολής, όμως πολλοί βοτανολόγοι υποστηρίζουν ότι η πατρίδα του είναι η Αίγυπτος. Είναι γνωστό από αρχαιστάτους χρόνους.

Περιγραφή: Είναι μονοετές φυτό με ποώδη βλαστό που το ύψος φτάνει μέχρι και τα 70 εκ. Τα κατώτερα φύλλα έχουν μακρύ μίσχο και έλασμα στρογγυλό έως καρδιάσχημο ακανόνιστα οδοντωτό και μοιάζουν πολύ με τα φύλλα του μαϊντανού, ενώ τα άνω φύλλα του ανθοφόρου στελέχους της ταξιανθίας είναι πτεροσχιδή. Τα άνθη του έχουν άσπρο έως υποκίτρινο χρώμα, μικρά σε μέγεθος και φέρονται σε ταξιανθίες σύνθετου σκιαδίου (ομπρέλας). Ο καρπός έχει σχήμα κυρτό, ωοειδές ή επίμηκες και χρώμα καστανό. Από αυτόν εξάγεται το πτητικό έλαιο που παραλαμβάνεται και η χρήση του βρίσκει πολλές εφαρμογές (Ross, 2001).

Οικολογία: Στην Ελλάδα καλλιεργείται σε ορισμένα νησιά του Ανατολικού Αιγαίου και την Εύβοια. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε όλα σχεδόν τα πεδινά και τα ημιορεινά μέρη της Ελλάδας. Ανέχεται και τα ελαφρώς όξινα (pH μέχρι 6.0) και τα ελαφρώς αλκαλικά εδάφη (pH μέχρι 8.0).

Συλλογή: Όταν οι περισσότεροι καρποί μιας ταξιανθίας βρίσκονται στο στάδιο της ωρίμανσης, πραγματοποιείται το θέρισμα των φυτών, αφήνονται στο χωράφι για 2-3 μέρες να ξεραθούν και κατόπιν αλωνίζονται.

Σήμερα, το φυτό καλλιεργείται σε ολόκληρο τον κόσμο, αλλά κυρίως στη Νότια Ευρώπη, την Τουρκία, τη Κεντρική Ασία, την Ινδία, τη Κίνα, την Ιαπωνία και τη Κεντρική και Νότια Αμερική.

Η συστηματική κατάταξη του γλυκανίσου φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1.2 Συστηματική κατάταξη

Βασίλειο	Φυτά
Άθροισμα ή Διαίρεση	Σπερματοφύτα
Συνομοταξία	Αγγειόσπερμα
Ομοταξία	Ευδικοτυλήδονα
Υπέρταξη	Asteranae
Τάξη	Apiales

Οικογένεια	Ariaceae/Umbelliferae
Υποοικογένεια	Arioideae
Φυλή	Ariaceae
Γένος	<i>Pimpinella</i>
Είδος	<i>Pimpinella anisum</i> L.

Ο γλυκάνισος ανήκει στην οικογένεια Ariaceae ή Umbelliferae και στο είδος *Pimpinella anisum* L. Η οικογένεια Ariaceae περιλαμβάνει 300-455 γένη και 3000-3750 είδη κατανεμημένα στο βόρειο ημισφαίριο (Heywood, 1971).

Η ποιότητα του γλυκάνισου καθορίζεται κυρίως από την περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο και τη χημική του σύσταση. Και για τις δύο παραμέτρους ποιότητας, είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν οι περιβαλλοντικοί παράγοντες υπό τους οποίους δίνονται υψηλότερες αποδόσεις και καλύτερη ποιότητα (Omidbaigi, 2000). Ο γλυκάνισος, περιέχει περίπου 1.5-5.0% αιθέριο έλαιο. Η περιεκτικότητα του αιθερίου ελαίου μπορεί να ποικίλει σημαντικά ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και το γενετικό δυναμικό της καλλιέργειας (Zheljazkon *et al.*, 2008; Oran *et al.*, 2008).



Εικόνα 1.2 Οι καρποί του γλυκάνισου και η διατομή του όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο.

Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του φυτού είναι 8 έως 23 °C, αρκετά ομοιόμορφη χωρίς πολύ θερμές περιόδους. Ο γλυκάνισος καλλιεργείται πιο αποτελεσματικά, όταν

φυτεύεται μαζί με κορίανδρο (κόλιανδρο). Η απόδοση σε καρπό στο στρέμμα ανέρχεται σε 60-70 κιλά για τις ξηρικές εκτάσεις και 100-120 κιλά για τις ποτιστικές εκτάσεις (Staub, 2008).

Ιδιότητες: Είναι αρωματικό και φαρμακευτικό φυτό. Χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία και τη βιομηχανία τροφίμων (αρωματικές σάλτσες, παρασκευή ζαχαρωδών προϊόντων, αρτοποιία) και ποτών (οι σπόροι του γλυκάνισου χρησιμοποιούνται για τον αρωματισμό ποτών, ιδιαίτερα του ούζου και του τσίπουρου). Το φαρμακευτικό αυτό φυτό σύμφωνα με την European Medicines Agency (EMA/HMPC/321181/2012) χρησιμοποιείται παραδοσιακά για τη συμπτωματική θεραπεία ήπιων, σπαστικών γαστρεντερικών διαταραχών, όπως φούσκωμα και μετεωρισμός και ως αποχρεμπτικό του βήχα που σχετίζεται με το κοινό κρυολόγημα.

1.3 Δρογοϊστορία

Καταγωγή του γλυκάνισου θεωρείται η Ανατολική Μεσόγειος ή η Μέση Ανατολή, ενώ σήμερα έχει διαδοθεί στην Ευρώπη, Ασία και Αμερική. Η πρώιμη αραβική ονομασία για το γλυκάνισο ήταν *anysum* από την οποία προέκυψε η ελληνική *anison* ή *anneson* και η λατινική *anisum* (Turner, 1548). Η βοτανική ονομασία *Pimpinella* προέρχεται από τη λατινική λέξη *dipinella* ή από το *twice pinnate*, το οποίο αναφέρεται στην μορφή των φύλλων του. Είναι ένα από τα παλαιότερα γνωστά φυτά που το άρωμα του ήταν πολύτιμο ως άρωμα καλλωπισμού και χρησιμοποιήθηκε τόσο για γαστρονομικούς όσο και θεραπευτικούς σκοπούς στην αρχαιότητα. Στους βιβλικούς χρόνους, ήταν τόσο πολύτιμος που χρησιμοποιήθηκε με τη μορφή νομίσματος, π.χ. για την πληρωμή φόρων. Υπάρχουν στοιχεία ότι ο γλυκάνισος χρησιμοποιήθηκε στην Αίγυπτο από το 1500 π.Χ.

Ο γλυκάνισος αναφέρεται το 17^ο αι. π.Χ στα έργα του Hammurabi – 6^{ος} βασιλιά της Βαβυλωνίας (Hammurabi, 1996) ως μια από τις πρώτες νομικές πραγματείες στην καταγεγραμμένη ιστορία.

Φαραωνικά ιατρικά κείμενα δείχνουν ότι οι σπόροι χρησιμοποιήθηκαν ως διουρητικό, για τη θεραπεία των πεπτικών προβλημάτων και για την ανακούφιση του πονόδοντου (Turner, 1551).

Ο **Ιπποκράτης**, πατέρας της ιατρικής, τον 4^ο αι. π.Χ. συνέστηνε τον γλυκάνισο για προβλήματα του αναπνευστικού συστήματος.

Ο Έλληνας βοτανολόγος **Διοσκουρίδης**, το 1^ο αι. μ.Χ., το θεωρούσε φαρμακευτικό φυτό και το συνιστούσε ως διουρητικό και εφιδρωτικό αλλά και ως φάρμακο εναντίον των πονοκεφάλων. Σύμφωνα με τον Διοσκουρίδη, οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι θεωρούσαν τον γλυκάνισο αφροδισιακό και πίστευαν ότι διατηρεί τη νεότητα και διώχνει τα άσχημα όνειρα όταν τοποθετηθεί κάτω από το μαξιλάρι τη νύχτα.

Ο **Πλίνιος** αναφέρει ότι οι γυναίκες που επρόκειτο να γεννήσουν, όταν μύριζαν γλυκάνισο είχαν εύκολο τοκετό, ενώ για να απαλλαγεί κάποιος από τη δυσσομία του στόματος συνέστηνε να το μασήσει (Staub, 2008).

Κατά τους Ρωμαϊκούς χρόνους καλλιεργήθηκε στη Τοσκάνη. Οι Ρωμαίοι συχνά προσέφεραν κέικ με καρυκεύματα στο τέλος μιας «πλούσιας ψυχαγωγίας» για να αποφευχθεί η δυσπεψία και ο μετεωρισμός. Έχουν βρεθεί δύο ελαφρώς διαφορετικές συνταγές γι' αυτό το είδος κέικ (Dyer, 2017). Η μια συνταγή περιελάμβανε πληγούρι, γλυκάνισο, κύμινο και άλλα αρωματικά. Ενώ η άλλη σπόρους γλυκανίσου, κύμινο, λίπος, κρασί και τυρί.

Στα Βυζαντινά χρόνια χρησιμοποιούσαν σπόρους γλυκάνισου για να φτιάχνουν τον «ανισίτη οίνο», ενώ στην αρχαία Κίνα το θεωρούσαν φυτό ιερό.

Κατά τον Μεσαίωνα η καλλιέργειά του εξαπλώθηκε στην Κεντρική Ευρώπη. Χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση της αμυγδαλίτιδας σε συνδυασμό με μέλι και ξύδι και είναι επίσης γνωστό ότι ο Καρλομάγνος θαύμαζε αυτό το αρωματικό βότανο και το φύτευε εκτενώς στους κήπους του στο Ακουϊσγκράνα (σημερινή πόλη στο Άαχεν της δυτικής Γερμανίας). Τον 9^ο αιώνα, ο ίδιος διέταξε να καλλιεργηθεί στα αυτοκρατορικά αγροκτήματα. Ο Αλμπέρτος Μάγκνους (1200-1280), ένας ιερέας και γνωστός συγγραφέας της εποχής του, κάνει συχνές αναφορές στο γλυκάνισο (Turner, 1551). Ο Τζεράρντ, συγγραφέας του βιβλίου *Herbal or History of Plants* (Gerard, 1597), ένα έργο το οποίο δανείζεται τις πληροφορίες του από το παλαιότερο έργο του Δρ. Πρίεστ, *Pemptades* (1583), προτείνει το γλυκάνισο στην αντιμετώπιση του λόξυγγα, καθώς και τη χορήγηση του σε μικρά παιδιά που πάσχουν από επιληψία ή άλλη κληρονομική ασθένεια.

Ο γλυκάνισος ήταν επίσης γνωστός στους Βρετανούς βοτανικούς από τον 14^ο αιώνα μ.Χ. και καλλιεργήθηκε στη Μ Βρετανία από τα μέσα του 16^{ου} αιώνα, παράλληλα με την εισαγωγή του στη Νότια Αμερική από τους ισπανούς κατακτητές (Grieve, 1992).

Σύμφωνα με τους ιστορικούς, το ψευδώνυμο που είχαν δώσει στο γλυκάνισο είναι *solamen intestinorum*, το οποίο μεταφράζεται ως «ανακουφιστικό των εντέρων», στην περίπτωση της αντιμετώπισης των κοιλιακών διαταραχών (Turner, 1551).

Παρά το γεγονός ότι έχει αξιοσημείωτη ιστορία στη Μεσόγειο, χρησιμοποιείται επίσης ευρύτατα και στη Νότια Αμερική.

Οι ισπανοί άποικοι το έφεραν στον Νέο Κόσμο τον 16^ο αι. και οι Λατινοαμερικανοί το έχουν χρησιμοποιήσει από τότε, τόσο στη μαγειρική όσο και ως φαρμακευτικό βότανο.

Οι Γερμανοί πίστευαν τόσο έντονα στη φαρμακευτική αξία του φυτού όπου κατά τη διάρκεια του 1800 αρωμάτιζαν το ψωμί τους με ολόκληρα σπέρματα γλυκανίσου (“History of Anise”, 2008).

Όταν το αναμείγνυαν με το λαρδί χρησίμευε ως αποτελεσματική θεραπεία για τα τσιμπήματα εντόμων και άλλων ενοχλητικών ερεθισμών του δέρματος. Εκτός από τη θεραπευτική δράση, έδινε ευχάριστο άρωμα και γεύση σε ψημένα προϊόντα, τυριά, καραμέλες και σούπες (Dyer, 2017) και φυσικά ο γλυκάνισος ήταν και εξακολουθεί να είναι το κύριο συστατικό γεύσης σε στα αλκοολούχα ποτά και ηδύποτα: νέκταρ anis, pastis, absinthe, ρακή και ούζο (Staub, 2008).

1.4 Δρογοχημεία

Η χημική σύσταση του γλυκανίσου μπορεί να ποικίλει σημαντικά ανάλογα με την προέλευση, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τη μέθοδο της καλλιέργειας (τρόπος καλλιέργειας στο χωράφι ή/και στο θερμοκήπιο, συχνότητα ύδρευσης, χρόνος και πυκνότητα σποράς κλπ) (Awad, *et al.*, 2005; Tuncturk and Yildirim, 2006).

Ο γλυκάνισος σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (EP) (*Anisi fructus*) αναφέρεται σε ολόκληρο το ξηρό τμήμα των σπερμάτων του φυτού *P. anisum* L., το οποίο περιέχει τουλάχιστον 20 mL/kg αιθέριο έλαιο (European Pharmacopoeia, 2005). Η Γαλλική Φαρμακοποιία ορίζει ως έλαιο γλυκανίσου αυτό που λαμβάνεται από τους ώριμους και αποξηραμένους καρπούς της *P. anisum* L. ή του *Illicium verum* Hook. fil. επειδή η σύνθεση των δύο αιθέριων ελαίων είναι παρόμοια (Bruneton, 1999).

Ο γλυκάνισος που καλλιεργείται στην Ευρώπη και την Ασία περιέχει περίπου 1.5 έως 5.0% αιθέριο έλαιο και συνήθως αποτελείται από μονοτερπένια (όπως λιμονένιο, σαβινένιο, α-

πινένιο, β-πινένιο, γ-τερπινένιο), C₁₂ σεσκιτερπένια (geijerene, pregeijerene), σεσκιτερπένια (himachalene, δ-elemene, β-bisabolone, caryophyllene, germacrene D), φαινυλοπροπανοειδή παράγωγα (Askari and Sefidkon, 2005; Velasco-Negueruela *et al.*, 2002) όπως επίσης, και απο 8-11% λιπαρά οξέα, όπως παλμιτικό και ελαϊκό οξύ, περίπου 4% υδατάνθρακες, και 18% πρωτεΐνη (Besharati-Seidani *et al.*, 2005). Οι πιο σημαντικές ενώσεις του γλυκάνισου ανήκουν στα φαινυλοπροπανοειδή και τα σεσκιτερπένια.

Φαινυλοπροπανοειδή

Οι κύριοι δευτερογενείς μεταβολίτες > 90% του αρώματος ανήκουν στα πτητικά φαινυλοπροπανοειδή, όπως η trans-ανηθόλη, εστραγόλη, ανισαλδεΐδη και α-zingiberene (Omidbaigi *et al.*, 2003). Ο Kubeczka ταξινομεί τα φαινυλοπροπανοειδή σε δύο κατηγορίες, την propenylphenol-type (4-μονοϋποκατεστημένο φαινυλοπροπανοειδές) και την pseudoisoeugenol-type (2,5-δισυποκατεστημένο φαινυλοπροπανοειδές). Ο σκελετός των μορίων, 2-hydroxy-5-methoxy-1-(E)-propenylbenzene, γνωστός και ως pseudoisoeugenol, είναι μοναδικός για την *Pimpinella* (Kubeczka, 1997).

Από τα φαινυλοπροπανοειδή, η cis-ανηθόλη έχει τοξικές και γονοτοξικές ιδιότητες με αποτέλεσμα η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (2005) να περιορίζει τη συγκέντρωση αυτής της ένωσης < 0.4%. Όλα τα προϊόντα οξείδωσης της ανηθόλης (anisic alcohol, anisaldehyde, anisic acid, anethol epoxide, p-methoxyphenylacetone, p-methoxypropionophenone, anisyl alcohol, and ketone) μπορεί να ανιχνεύονται στο αιθέριο έλαιο γλυκάνισου. Η παρουσία αυτών των ενώσεων αποτελεί ένδειξη χαμηλής ποιότητας του αιθερίου ελαίου (Barnes *et al.*, 2002).

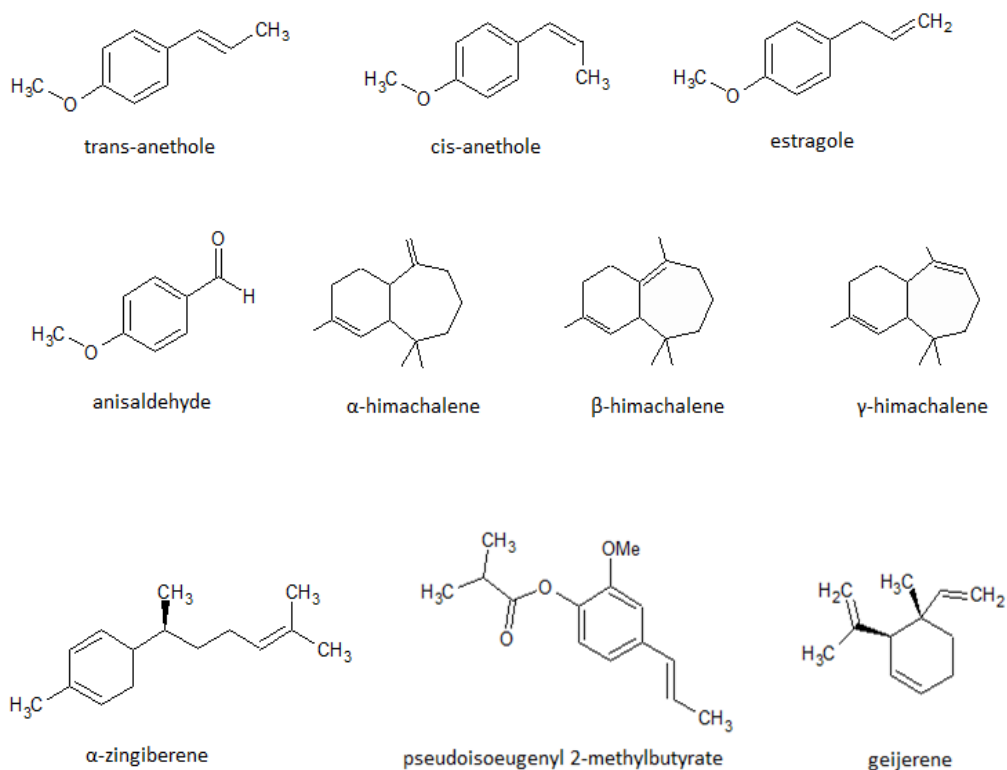
Σεσκιτερπένια

Χαρακτηριστικές ενώσεις του αιθερίου ελαίου είναι τα C₁₂ σεσκιτερπένια (trinoresesquiterpenes), geijerenes και azulenes (Tabanca *et al.*, 2006; Velasco-Negueruela *et al.*, 2005). Τα σεσκιτερπένια geijerenes αναφέρθηκαν στις οικογένειες Asteraceae, Lamiaceae, Rosaceae, Rutaceae και Leguminosae ενώ στην Apiaceae το μοναδικό είδος που περιέχει την ένωση αυτή είναι ο γλυκάνισος (Santos *et al.*, 1998).

Μεταξύ των ενώσεων γ -himachalene και εστραγόλη υπάρχει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση. Υψηλότερη συγκέντρωση γ -himachalene συνδέεται με χαμηλότερες ποσότητες εστραγόλης και το αντίθετο. Η χαμηλότερη συγκέντρωση γ -himachalene μπορεί να οφείλεται σε μεγαλύτερη περίοδο αποθήκευσης και πρόκληση οξειδωσης/αλλοίωσης των χημικών συστατικών γλυκάνισου (Ullah *et al.*, 2013).

Τα C₁₂ σεσκιτερπένια (geijerene, pregeijerene) και φαινυλοπροπανοειδή (pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate, eroxypseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate) είναι χαρακτηριστικά του γένους *Pimpinella* και αποτελούν τους φυτοχημικούς δείκτες του γένους. Αμφότερες οι χημικές τάξεις φαίνεται να μοιράζονται την ίδια βιοσυνθετική οδό ξεκινώντας από την l-phenylalanine και φθάνοντας στην propenylphenol (Tabanca *et al.*, 2006; Velasco-Negueruela *et al.*, 2005).

Παρακάτω παρουσιάζονται οι χημικοί τύποι των χημικών συστατικών που εμφανίζονται σε μεγαλύτερα ποσοστά.



Σχήμα 1.1 Χημικοί τύποι των κυριότερων πτητικών συστατικών του γλυκάνισου

1.5 Δρογοφαρμακολογία

1.5.1 Μονογραφία του αιθερίου ελαίου γλυκανίσου από τον EMA (Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων)

Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων EMA (European Medicine Agency) και συγκεκριμένα η επιτροπή που ασχολείται με την αξιολόγηση των φυτικών προϊόντων HMPC (Herbal Medicinal Products Committee) εγκρίνει το αιθέριο έλαιο του φυτού *Pimpinella anisum* ως παραδοσιακό φυτικό φαρμακευτικό προϊόν με τις ακόλουθες ενδείξεις:

- για τη συμπτωματική θεραπεία ήπιων, σπαστικών γαστρεντερικών διαταραχών, όπως φούσκωμα και μετεωρισμός
- και ως αποχρεμπτικό του βήχα που σχετίζεται με κοινό κρυολόγημα (EMEA/HMPC/321181/2012)

Οι παραπάνω συνιστώμενες ενδείξεις βασίζονται αποκλειστικά στην παραδοσιακή χρήση του γλυκανίσου και όχι σε δεδομένα κλινικών δοκιμών.

Παρακάτω εμφανίζεται η χημική σύσταση του γλυκανίσου σύμφωνα με τη Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία.

Ένωση	Ποσοστό (%)
trans-ανηθόλη	87-94
εστραγόλη	0.5-5.0
ανισαλδεΰδη	0.1-1.4
λιναλόλη	0.1-1.5
α-τερπινεόλη	<1.2
cis-ανηθόλη	0.1-0.4
Pseudoisoeugenyl 2-methylbutirate	0.3-2.0

1.5.2 Ενδείξεις χρήσης του αιθερίου ελαίου

Για τη συμπτωματική θεραπεία των παραπάνω ενδείξεων η Βρετανική Φυτική Φαρμακοποιία (British Herbal Pharmacopoeia - BHP, 1983), συνιστά δόση 0.05-0.2ml ελαίου γλυκανίσου τρεις φορές ημερησίως.

Η συνιστώμενη ημερήσια δόση από την Commission E είναι 0.3g (0.4ml) λόγω της παρουσίας ενώσεων που δεν έχουν σαφές τοξικολογικό προφίλ (όπως οι εστραγόλη και trans-ανηθόλη).

Εξαιτίας της εστραγόλης, η χρήση σε ευαίσθητες ομάδες, όπως τα μικρά παιδιά, οι έγκυες και θηλάζουσες, πρέπει να ελαχιστοποιηθούν. Ως εκ τούτου, η χρήση του αιθερίου ελαίου γλυκανίσου δεν συνιστάται σε αυτές τις ομάδες πληθυσμού (EMA/HMPC/137212/2005). Επίσης, δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με τη χρήση αιθέριου ελαίου σε εφήβους κάτω των 18 ετών.

Τρόπος χορήγησης

Από στόματος χρήση.

Διάρκεια χρήσης

Λόγω της έλλειψης διαθέσιμων στοιχείων ασφάλειας για την επί μακρόν χρήση του αιθερίου ελαίου και λόγω της παρουσίας ενώσεων όπως η trans-ανηθόλη και η εστραγόλη, το όριο των δύο εβδομάδων ενδείκνυται για αυτοθεραπεία, όπως συμβαίνει με τα παραδοσιακά φυτικά φαρμακευτικά προϊόντα. Αυτό υποστηρίζεται επίσης από την αναφορά του EMA σχετικά με τη χρήση φυτικών φαρμακευτικών προϊόντων που περιέχουν εστραγόλη. Όταν η έκθεση στην εστραγόλη μέσα από την λήψη του αιθερίου ελαίου γλυκανίσου είναι στα όρια της συνιστώμενης δοσολογίας, δεν αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την εμφάνιση καρκίνου.

Ειδικές προειδοποιήσεις και προφυλάξεις κατά τη χρήση

- Προληπτικά, η χρήση του γλυκανίσου δεν συνιστάται σε παιδιά κάτω των 12 ετών λόγω της έλλειψης επαρκών στοιχείων για την αξιολόγηση της ασφάλειας.
- Τα παρασκευάσματα με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκάνισο (> 5g) δεν πρέπει να λαμβάνονται για περισσότερο από δύο εβδομάδες χωρίς ιατρική συμβουλή.
- Οι ασθενείς πρέπει να ζητήσουν ιατρική συμβουλή εάν τα συμπτώματα επιμείνουν για περισσότερο από δύο εβδομάδες ή επιδεινώνονται κατά τη διάρκεια της χρήσης του φαρμακευτικού προϊόντος.

In vitro πειράματα σε πειραματόζωα έχουν αποδείξει ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις trans-ανηθόλης επηρεάζουν αρνητικά την οιστρογονική δραστηριότητα και γονιμότητα κάτι το οποίο

δεν συμβαίνει στον άνθρωπο όταν λαμβάνει τη συνιστώμενη δοσολογία (μόνο βραχυχρόνια χρήση σε ενήλικες και ηλικιωμένους) (EMEA/HMPC/321181/2012).

Η φαρμακευτική χρήση του αιθερίου ελαίου γλυκανίσου δεν υποστηρίζεται από κλινικές μελέτες. Μπορεί να προταθεί μόνο η παραδοσιακή ιατρική χρήση του.

Μη κλινικές μελέτες

Αντιμικροβιακή δράση

Το έλαιο γλυκανίσου παρουσίασε *in vitro* ισχυρή ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος βακτηρίων και μυκήτων που είναι γνωστό ότι είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο και για άλλα είδη. Ισχυρότερη αναστολή ανάπτυξης έδειξε στους μικροοργανισμούς *Yersinia enterocolitica*, *Aspergillus niger* και *Geotrichum candidum*, ενώ μέτρια αναστολή έδειξε στους *Lactobacillum plantarum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Salmonella typhimurium* (EMEA/HMPC/321181/2012). Αυτές οι αντιμικροβιακές δράσεις του γένους *Pimpinella* οφείλονται κυρίως στην παρουσία της epoxy-pseudoisoeugenol και των παραγώγων της (Tabanca *et al.*, 2005).

Αντιοξειδωτική δράση

Το αιθέριο έλαιο έδειξε ηπατοπροστατευτική δράση μέσω της αντιοξειδωτικής δράσης των ενζύμων ορού καθώς και της αναστολής του οξειδωτικού στρες και των υπεροξειδίων (Rajeshwari *et al.*, 2011).

Άλλες δράσεις

Η βρογχοδιασταλτική δράση του αιθερίου ελαίου λόγω της trans-ανηθόλης μειώνει τον αριθμό των φλεγμονωδών κυττάρων (Kang *et al.*, 2013; EMEA/HMPC/321181/2012).

Η ευγενόλη και η εστραγόλη έχουν ήπια αναισθητική, υποθερμική και μυοχαλαρωτική δράση (Dallmeier and Carlini, 1981; Boskabady and Ramazani, 2001). Η μυοχαλαρωτική δράση οφείλεται στην αναστολή των μουσκαρινικών υποδοχέων (Boskabady and Ramazani, 2001). Πειράματα έχουν αποδείξει ότι το αιθέριο έλαιο αποτελεί ασφαλή εναλλακτική επιλογή για τη

θεραπεία της δυσκοιλιότητας μειώνοντας το χρόνο διέλευσης του παχέος εντέρου (Picon *et al.*, 2010).

Η **trans-ανηθόλη** που περιέχεται στο αιθέριο έλαιο του γλυκανίσου έχει εμφανίσει αντικαρκινική και κυτταροτοξική δράση (Bruneton, 1999; ESCOP, 2003; Gautam *et al.*, 2014). Άλλες μελέτες έδειξαν σημαντική αντιθρομβωτική δράση της ένωσης αυτής. Είναι επίσης αποτελεσματική η αντιφλεγμονώδης δράση της, καθώς αναστέλλει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων μέσω αναστολής της σύνθεσης της θρομβοξάνης και εμποδίζοντας την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος (Tognolini *et al.*, 2007; Selley *et al.*, 1992).

Το έλαιο γλυκανίσου έδειξε, επίσης, καλή **εντομοκτόνο δράση** έναντι των προνυμφών *Lycoriella ingenua*, (Park *et al.*, 2006). Ωστόσο, και η ένωση γ-himachalene, που αποτελεί βασικό συστατικό των αιθερίων ελαίων, έχει βρεθεί ότι έχει εντομοκτόνο δράση και θεωρείται ότι θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέα προϊόντα ελέγχου παρασίτων για εμπορική χρήση (Singh and Agarwal, 1988).

Τοξικότητα

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει καρκινογόνες επιδράσεις της εστραγόλης και μερικών μεταβολιτών της σε ποντίκια (κυρίως κακοήθεις όγκους του ήπατος). Ο ΕΜΕΑ/ΗΜΡC σχετικά με τη χρήση φυτικών φαρμακευτικών προϊόντων που περιέχουν εστραγόλη (ΕΜΕΑ/ΗΜΡC/137212/2005), αναφέρει ότι η μεταβολική δραστηριότητα της εστραγόλης είναι δόσο-εξαρτώμενη και τείνει να μειώνεται σημαντικά σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης. Ο γονοτοξικός κίνδυνος που σχετίζεται με την εστραγόλη δεν θεωρείται ότι είναι σημαντικός για τους ενήλικες και τους ηλικιωμένους στην συνιστώμενη δοσολογία λόγω της μικρής ποσότητας που υπάρχει στο αιθέριο έλαιο γλυκανίσου. Ωστόσο, ο κίνδυνος δεν μπορεί να υπολογιστεί όταν λαμβάνονται υψηλές δόσεις εστραγόλης από τα παιδιά ή για μεγάλο χρονικό διάστημα.

1.6 Βιβλιογραφικά δεδομένα για το αιθέριο έλαιο γλυκανίσου

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα που παρατίθενται αφορούν τη χημική σύσταση δειγμάτων γλυκανίσου από την Ελλάδα, Γαλλία, Τουρκία, Ισπανία, Ιταλία και Γερμανία καθώς και την

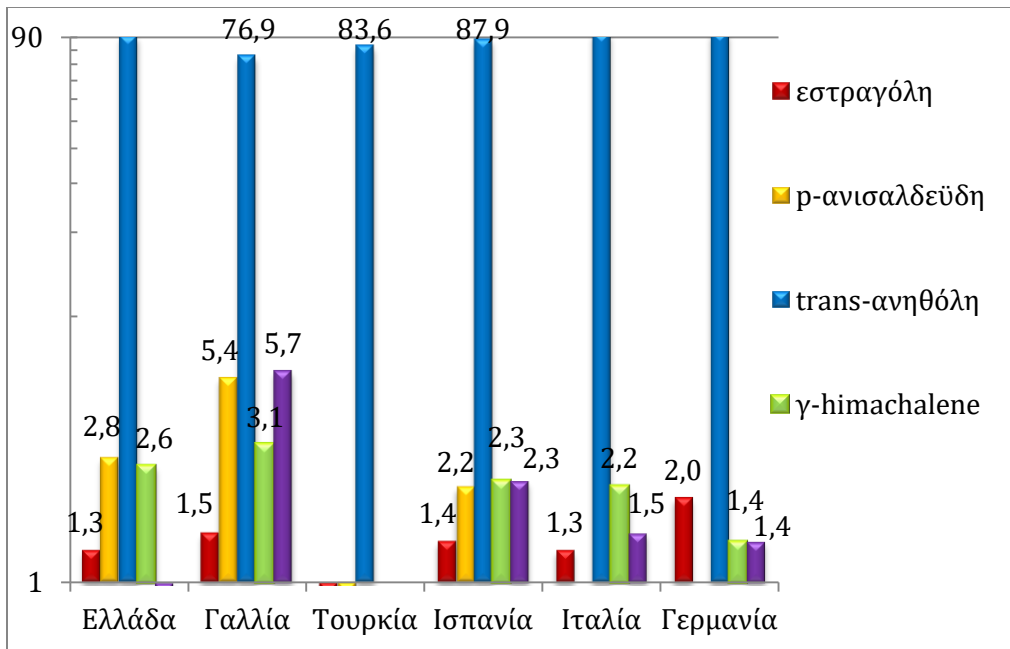
αποδεκτή χημική σύσταση του ελαίου για φαρμακευτική χρήση, όπως καθορίζεται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία.

Πίνακας 1.3 Χημική σύσταση γλυκάνισου σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία και την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (EP).

Χώρα προέλευσης	Χημικές Ενώσεις						Βιβλ. Πηγές
	Εστραγόλη	ρ-ανισαλδεϋδη	trans-ανηθόλη	γ-Himachalene	Pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate	Απόδοση Ελαίου (ml/kg)	
Ελλάδα 1 (Καλογερογιάννης company)	1.3	2.8	90.2	2.6	0.9	48.3	(Orav <i>et al.</i> , 2008)
Ελλάδα 2 (Αλεξανδρούπολη)	1.5	0.5	88.1	4.1	α	α*	(Fitsiou <i>et al.</i> , 2016)
Ελλάδα 3 (Θεσσαλονίκη)	2.4	0.2	86.0	1.1	α	α	(Ntalli <i>et al.</i> , 2010)
Γαλλία	1.5	5.4	76.9	3.1	5.7	10.0	(Orav <i>et al.</i> , 2008)
Τουρκία	0.6	0.2	83.65	α	α	27	(Derawi, 2016)
Ισπανία	1.4	2.2	87.9	2.3	2.3	25.4	(Orav <i>et al.</i> , 2008)
Ιταλία	1.3	α	92.2	2.2	1.5	20.4	(Orav <i>et al.</i> , 2008)
Γερμανία	2.0	α	92.7	1.4	1.4	12.1	(Orav <i>et al.</i> , 2008)
Ευρ Φαρμακ	0.5-5	0.1-1.4	87-94	α	0.3-2.0	>20	(Eur Pharm, 2005)

α: δεν ανιχνεύθηκε

α*: προσδιορίστηκαν μόνον τα κύρια αιθέρια έλαια.



Σχήμα 1.2 Απεικόνιση των κατηγοριοποιημένων ενώσεων γλυκανίσου διαφορετικών χωρών

Στις ευρωπαϊκές χώρες, η κατανάλωση γλυκανίσου είναι μεγαλύτερη από την παραγωγή του (Bown, 2001). Οι αποδόσεις των αιθερίων ελαίων κυμαίνονται από 10.0-48.3 mL/kg., ενώ η συγκέντρωση αιθέριου ελαίου μειώνεται ταχύτατα κατά την αποθήκευση (Bruneton, 1999). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις trans-ανηθόλης (> 90%) βρέθηκαν στα έλαια από την Ελλάδα, την Ιταλία και τη Γερμανία, αντίστοιχα. Το φυτό γλυκανίσου δεν είναι αυτοφυές της Γερμανίας, αλλά οι κλιματολογικές συνθήκες είναι κατάλληλες για την καλλιέργειά του (Heeger, 1956), ενώ το δείγμα από τη Γαλλία χαρακτηρίστηκε από υψηλή περιεκτικότητα σε pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate, αντίθετα με άλλα μελετηθέντα δείγματα, που η περιεκτικότητα αυτής της ένωσης ήταν < 3%. Από γλυκάνισο της Γαλλίας επίσης απομονώθηκε η p-ανισαλδεϋδη λόγω της υψηλής συγκέντρωσής της, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα περιείχαν αυτό το προϊόν οξείδωσης από 1-3%. Τα δείγματα από όλες τις χώρες είναι εντός των ποσοστών της εστραγόλης, όπως ορίζεται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία. Μάλιστα παρατηρείται ότι τα ποσοστά της trans-ανηθόλης στα δείγματα Ελλάδα 1 και Αλεξανδρούπολη είναι τα υψηλότερα.

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Φυτικό υλικό

Στα πλαίσια της εργασίας πραγματοποιήθηκε επίσης συγκριτική μελέτη του αιθερίου ελαίου τεσσάρων δειγμάτων γλυκανίσου (*Pimpinella anisum*) διαφορετικής προέλευσης.

Τρία ελληνικά δείγματα από τις περιοχές:

- 1.Λισβόρι (Λέσβου): (1A, 1B, 1C)
- 2.Βόλου (Θεσσαλίας),
- 3.Λιβαδειάς (Βοιωτίας) και
- 4.Δείγμα ελληνικής αγοράς Τουρκικής προέλευσης.

Όλα τα δείγματα τεμαχίσθηκαν αδρομερώς (κονιοποιήθηκαν) λίγο πριν την απόσταξη και άμεσα υποβλήθηκαν σε υδραπόσταξη.

2.2 Μέθοδοι παραλαβής των αιθερίων ελαίων

Η απόσταξη για το αιθέριο έλαιο Λισβορίου διήρκησε από 1 έως 3 ώρες, ενώ για τα δείγματα Βόλου, Λιβαδειάς και Τουρκίας 1 ώρα. Έπειτα, συλλέχθηκε αιθέριο έλαιο μαζί με hydrosol (νερό με μικρή συγκέντρωση διαλυμένου αιθερίου ελαίου) σε ειδική συσκευή διαχωρισμού.

Όλα τα αιθέρια έλαια παρελήφθησαν σε φιαλίδια με προσθήκη άνυδρου θειικού νάτριου για ελάττωση της υγρασίας. Είχαν ανοιχτό κίτρινο έως πορτοκαλί χρώμα, και χαρακτηριστική οσμή. Η φύλαξή τους έγινε στους 4-6°C μέχρι την ανάλυση τους. Η ποιοτική τους ανάλυση έγινε με αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματοσκοπία μάζας (GC-MS).

2.3 Χρωματογραφικός διαχωρισμός

2.3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC)

Όπως έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο των Εσπεριδοειδών.

2.3.2 Χρωματογραφία Στήλης (Column Chromatography)

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των συστατικών έγινε με χρωματογραφία στήλης (CC). Στην στατική φάση της στήλης χρησιμοποιήθηκε γέλη πυριτίου (silica gel) ενώ στην κινητή φάση

επιλέχθηκε το σύστημα διαλυτών με σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό/απομόνωση των συστατικών του μίγματος. Η διάμετρος της στήλης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10mm.

2.4 Μέθοδοι Ανάλυσης

Οι Μέθοδοι Ανάλυσης που πραγματοποιήθηκαν (GC-MS, NMR) έχουν περιγραφεί στο κεφάλαιο των Εσπεριδοειδών.

Κεφάλαιο 3 Φυτοχημική Ανάλυση του Γλυκανίσου

3.1 Ανάλυση αιθερίων ελαίων γλυκανίσων με Αέρια Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)

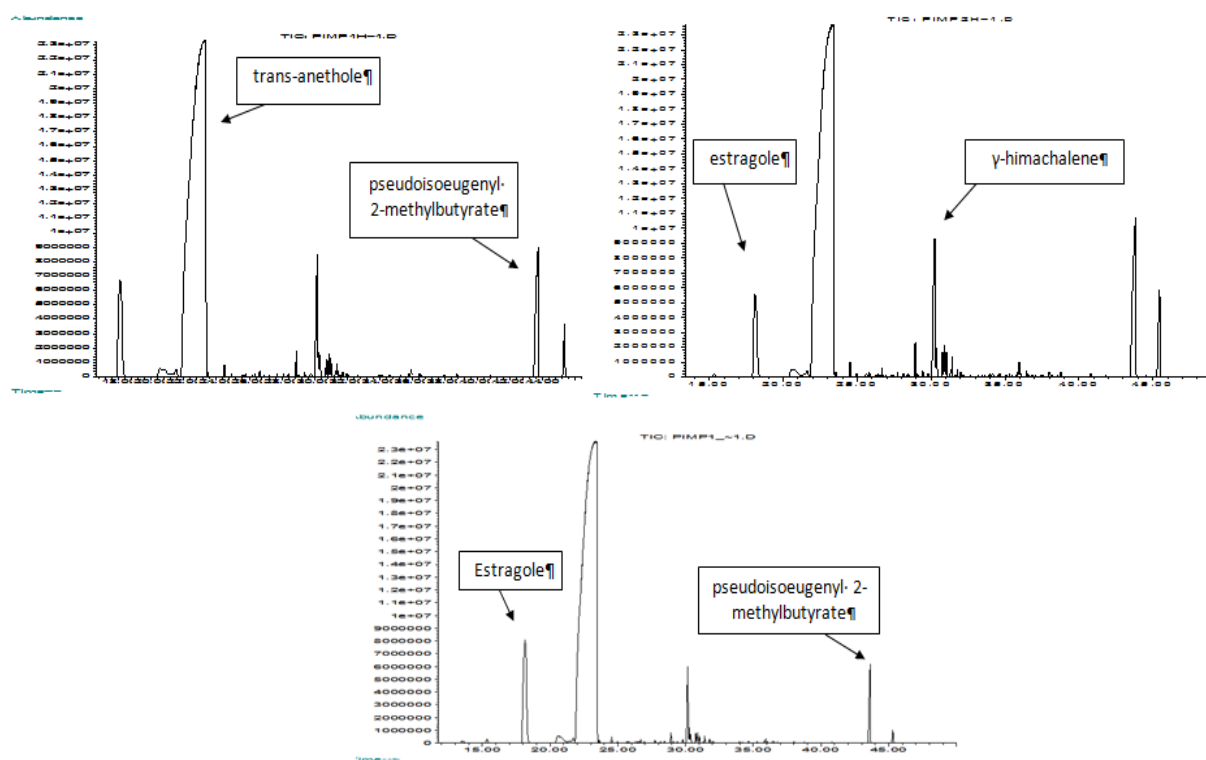
3.1.1 Αιθέριο έλαιο γλυκανίσου της περιοχής Λισβορίου (1A, 1B, 1C)

Παρακάτω ακολουθούν τα χρωματογραφήματα καθώς και η χημική σύσταση GC-MS του αιθερίου ελαίου γλυκανίσου από το Λισβόρι που αποστάχθηκε σε 3 διαφορετικούς χρόνους.

1A: 1 ώρα απόσταξης, Κωδικός δείγματος Pimran1H

1B: 2 ώρες απόσταξης, Κωδικός δείγματος Pimran2H

1C: 3 ώρες απόσταξης, Κωδικός δείγματος Pimran3H



Εικ. 3.1 Χρωματογραφήματα αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Λισβορίου 1A, 1B, 1C

Πίνακας 3.1 Συστατικά αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Λέσβου Pimpan1H.

A/A	ΕΝΩΣΕΙΣ	Pimpan1H	Pimpan2H	Pimpan3H
1	α-phellandrene	0.01	-	0.01
2	p-cymene	0.01	-	0.01
3	limonene	0.01	0.01	0.01
4	g-terpinene	0.01	-	0.01
5	linalool	0.10	0.03	0.09
6	geylene	0.05	0.04	0.06
7	estragole	3.84	3.39	5.51
8	cis anethole	0.25	0.18	0.31
9	trans anethole	87.35	87.00	89.99
10	α-himachalene	0.48	0.44	0.17
11	γ-himachalene	2.53	2.90	1.31
12	methyl eugenol	0.21	0.24	0.14
13	a-zingiberene	0.23	0.25	0.12
14	β-himichalene	0.28	0.25	0.11
15	β-bisabolene	0.16	0.15	0.08
16	β-sesquiphellandrene	0.07	0.04	-
17	cycloisolongifolene	-	0.09	-
18	apiole = 2,5-dimethoxysafrole	0.11	0.05	0.05
19	a-copaene-8-ol	0.12	-	-
20	a-longipinene	0.07	0.04	-
21	diepi-a-cedren	0.08	0.04	-
22	α-bisabolol	-	0.06	-
23	isoeugenol	0.05	0.03	-
24	pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate	2.09	2.68	1.24
25	2-(1',2'-epoxypropyl)-4-methoxyphenyl 2-methylbutanoate	0.76	0.38	0.16
26	isoquinoline, 1-[(3,5-dihydroxy)benzyl]-1,2,3,4-tetrahydro-6-hydroxy-	-	0.08	-
27	docosane	0.01	0.02	-
28	nonacosane	0.04	0.07	0.01
29	hexatriacontane	0.01	0.02	-
ΣΥΝΟΛΟ		98.83	98.50	99.39

1A: Η υδραπόσταξη του ελαίου διήρκησε **μία ώρα** και η απόδοση του ήταν στα 80ml/kg. Μεταξύ των συστατικών που ταυτοποιήθηκαν, η trans-ανηθόλη έχει το μεγαλύτερο ποσοστό

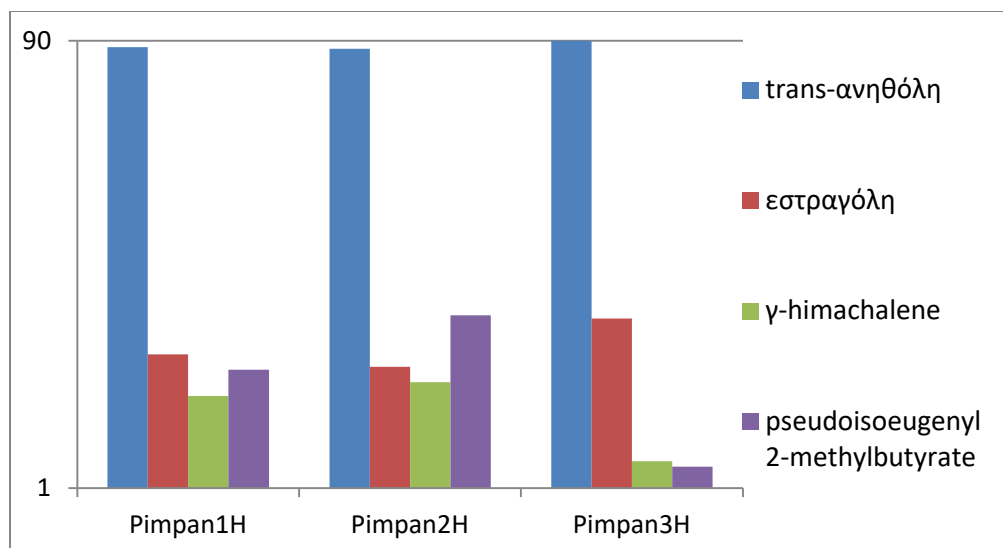
87.35%, ακολουθεί η εστραγόλη 3.84%, η 2-methylbutyrate-pseudoisoeugenyl 2.09%. και η γ-himachalene 2.53%. Όλες οι υπόλοιπες 26 ενώσεις βρίσκονται σε ποσοστά μικρότερα του 1%.

1B: Η υδραπόσταξη του ίδιου ελαίου για 2 ώρες είχε απόδοση, 60 ml/kg, ενώ η ποιοτική ανάλυση παρουσίασε μικρές διαφορές συγκρινόμενη με το προηγούμενο αιθέριο έλαιο όσον αφορά στην trans-ανηθόλη 87.00%, και τις εστραγόλη (3.39%), γ-himachalene (2.90%) και 2-methylbutyrate-pseudoisoeugenyl (2.68%).

1C: Η υδραπόσταξη του ίδιου ελαίου για 3 ώρες είχε απόδοση 25 ml/kg. Η ποιοτική ανάλυση παρουσίασε διαφορές συγκρινόμενη με το προηγούμενο αιθέριο έλαιο όσον αφορά στην trans-ανηθόλη 89.99% και τις γ-himachalene (1.31%), 2-methylbutyrate-pseudoisoeugenyl (1.24%), και εστραγόλη (5.51%) το ποσοστό της οποίας αποκλίνει από το μέγιστο όριο της ΕΡ.

Συμπερασματικά

Τα ποσοστά των ενώσεων, για το αιθέριο έλαιο που αποστάχθηκε σε τρεις διαφορετικούς χρόνους (1h, 2h και 3h) δεν έχουν σημαντικές διαφορές. Παρατηρείται όμως, ότι η trans-ανηθόλη βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό (89.99%) στο έλαιο που προέκυψε μετά από τρεις ώρες απόσταξη (**pimpran3H**). Ενώ τη μεγαλύτερη απόδοση ελαίου σε ml/kg που παραλαμβάνονται έχει η απόσταξη της μιας ώρας (**pimpran1H**) και είναι 80ml/kg. Για τον λόγο αυτό, οι αποστάξεις στα υπόλοιπα δείγματα πραγματοποιήθηκαν στη μια ώρα. Στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί εμφανίζονται τα βασικά συστατικά του παραπάνω αιθερίου ελαίου γλυκάνισου, που είναι η trans-ανηθόλη, ακολουθούμενη από τις εστραγόλη, pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate και γ-himachalene στους τρεις διαφορετικούς χρόνους απόσταξης.

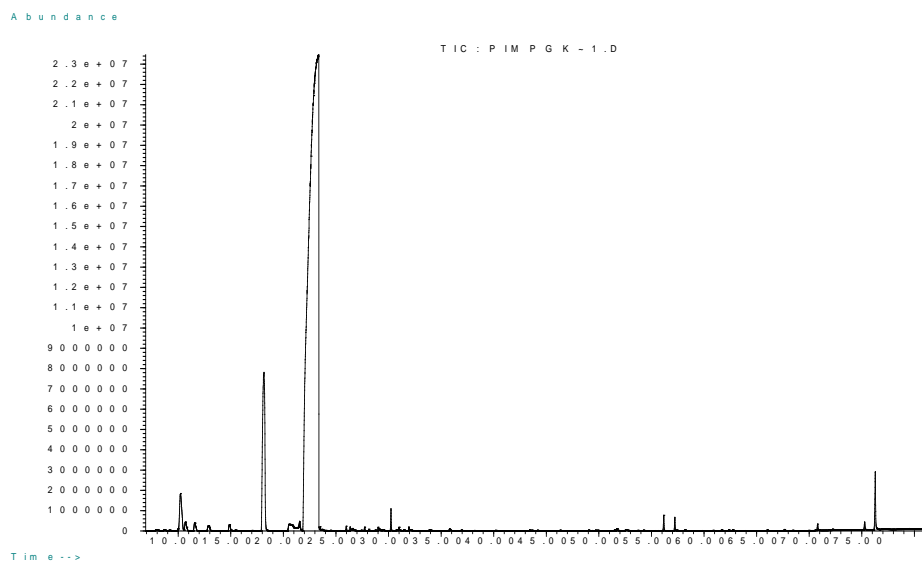


Σχήμα 3.1 Βασικά συστατικά του αιθερίου ελαίου γλυκάνισου από το Λισβόρι Λέσβου.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα η απόσταξη ελαίου του γλυκάνισου στις τρεις ώρες εμφανίζει τα υψηλότερα ποσοστά σε trans-ανηθόλη και εστραγόλη και τα μικρότερα σε γ-himachalene και pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate. Στο αιθέριο έλαιο που αποστάχθηκε για δυο ώρες παρατηρήθηκε ότι η pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate έχει το μεγαλύτερο ποσοστό σε σύγκριση με τα δυο άλλα δείγματα. Η pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate προέρχεται από μια παραλλαγή της φυσιολογικής οδού βιοσύνθεσης φαινυλοπροπανοειδούς δεδομένου ότι περιλαμβάνει ένα στάδιο υδροξυλίωσης (Caspi *et al.*, 2012). Ενώ, το ίδιο αιθέριο έλαιο που αποστάχθηκε για μια ώρα παρατηρήθηκε ότι τα ποσοστά όλων των ενώσεων είναι εντός των ορίων όπως ορίζει η ΕΡ.

3.1.4 Αιθέριο έλαιο γλυκανίσου Βόλου - βιολογικής καλλιέργειας (Κωδικός: PimpGK)

Παρακάτω παρατίθεται το χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Βόλου και στον Πίνακα 3.2 τα συστατικά του αιθερίου ελαίου του



Εικ. 3.2 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Βόλου PimpGK.

Πίνακας 3.2 Συστατικά αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Βόλου PimpGK.

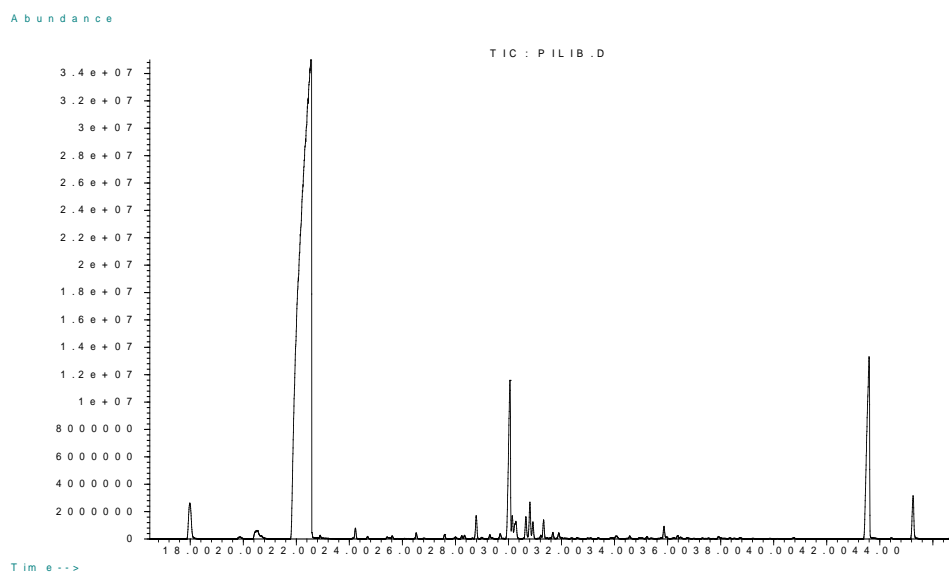
A/A	ΕΝΩΣΕΙΣ	AREA %
1	sabinene	0.05
2	myrcene	0.03
3	limonene	1.59
4	cis-ocimene	0.30
5	γ -terpinene	0.27
6	fenchone	0.20
7	β -ocimene	0.18
8	estragole	7.08
9	cis-anethole	0.6
10	trans-anethole	87.01
11	anisaldehyde	0.40
12	α -copaene	0.05
13	anisketone	0.06
14	germacrene D	0.31
15	trans- β -farnesene	0.01
16	methyl	0.05

	isoeugenol	
17	δ-cadinene	0.04
18	methyl linoleate	0.01
ΣΥΝΟΛΟ %		97.70

Η απόδοση του ελαίου στη χρονική διάρκεια της μιας ώρας είναι στα 30 ml/kg. Μεταξύ των συστατικών που ταυτοποιήθηκαν, η trans-ανηθόλη έχει το μεγαλύτερο ποσοστό (87.01%) ακολουθούμενο από εστραγόλη (7.08%), ενώ παρατηρείται απουσία των 2-methylbutyrate-pseudoisoeugenyl και himachalene που αποτελούσαν βασικά συστατικά του αιθερίου ελαίου Λισβορίου. Τα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν σε αυτό είναι 18 ενώ στα προηγούμενα αναλυθέντα έλαια από την Λέσβο ο αριθμός των συστατικών ήταν από 19-26. Παρακάτω παρατίθεται το χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Βόλου και στον Πίνακα 3.20 τα συστατικά του αιθερίου ελαίου του

3.1.5 Αιθέριο έλαιο γλυκανίσου Λιβαδειάς (Κωδικός: Pilib)

Παρακάτω παρατίθενται το χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Λιβαδειάς και τα συστατικά του αιθερίου ελαίου στον Πίνακα 3.3.



Εικ. 3.3 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Λιβαδειάς Pilib.

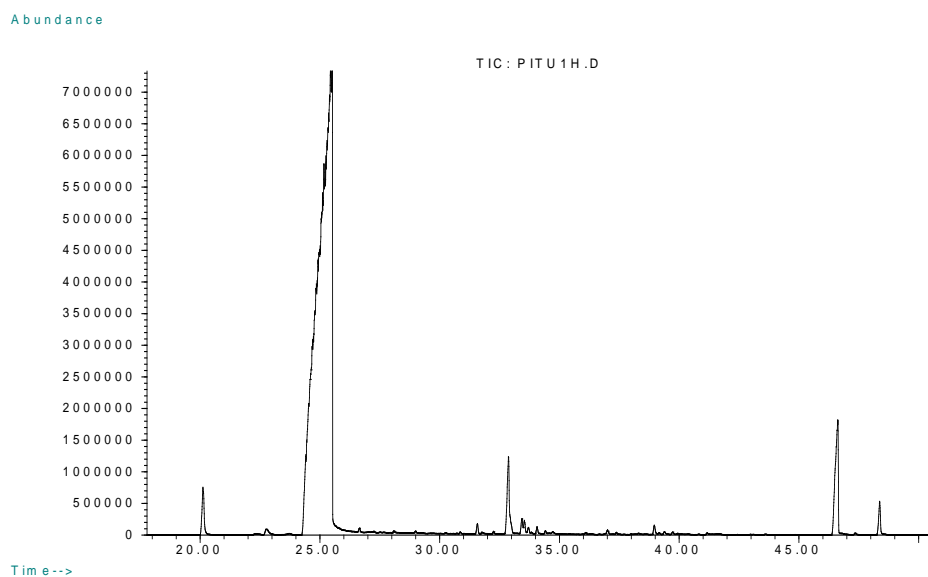
Πίνακας 3.3 Συστατικά αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Λιβαδειάς Pilib.

A/A	ΕΝΩΣΕΙΣ	AREA %
1	estragole	1.44
2	cuminaldehyde	0.08
3	cis-anethole	0.6
4	trans anethole	79.49
5	δ-elemene	0.22
6	α-longipinene	0.05
7	longicyclene	0.03
8	α-ylangene	0.06
9	β-elemene	0.12
10	γ-cadidene	0.09
11	germacrene D	0.06
12	γ-elemene	0.06
13	anisyl acetone	0.08
14	α-himichalene	0.48
15	alloaromadendrene	0.03
16	trans-β-farnesene	0.10
17	8,9-dehydro-neoisolongifolene	0.12
18	γ-himichalene	4.64
19	β-cubebene	0.45
20	ar-curcumene	0.58
21	methyl eugenol	0.47
22	α-zingiberene	0.76
23	β-himichalene	0.35
24	δ-cadidene	0.07
25	β-bisabolene	0.38
26	4,5-dehydro-isolongifolene	0.14
27	β-sequiphellandrene	0.13
28	α-calacorene	0.02
29	spathulenol	0.04
30	cycloisolongifolene	0.09
31	isospathulenol	0.07
32	bicyclogermacrene	0.02
33	α-copaene	0.04
34	α-cedrene	0.06
35	bergamotene	0.02
36	eugenol	0.06
37	pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate	7.44
38	2-(1',2'-epoxypropyl)-4-methoxyphenyl 2-methylbutanoate	1.05
ΣΥΝΟΛΟ%		99.94

Η υδραπόσταξη του ελαίου έγινε σε μια ώρα και η απόδοση ήταν 30 ml/kg. Μεταξύ των συστατικών που ταυτοποιήθηκαν, η trans-ανηθόλη έχει ποσοστό 79.49%, ακολουθούμενη από 2-methylbutyrate-pseudoisoeugenyl (7.44%), γ-himichalene (4.64%) και εστραγόλη (1.44%). Παρατηρήθηκε ότι τα βασικά συστατικά παραμένουν τα ίδια με ποσοτικές διακυμάνσεις και ταυτοποιήθηκαν συνολικά 38 συστατικά. Αυτός ήταν ο μεγαλύτερος αριθμός συστατικών σε σύγκριση με τα δείγματα από το Λισβόρι Λέσβου (19-26) και το Βόλο (18).

3.1.6 Αιθέριο έλαιο γλυκανίσου Τουρκίας (Κωδικός: Pitu1h)

Παρακάτω παρατίθενται το χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Τουρκίας Pitu1h και τα συστατικά αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Τουρκίας Pitu1h στον Πίνακα 3.4.



Εικ. 3.4 Χρωματογράφημα αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Τουρκίας Pitu1h.

Πίνακας 3.4 Συστατικά αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Τουρκικής προέλευσης Pitu1h.

A/A	ΕΝΩΣΕΙΣ	AREA %
1	linalool	0.06
2	estragole	3.37
3	cuminaldehyde	0.08
4	cis-anethole	0.27
5	p-anisaldehyde	0.06
6	trans-anethole	85.81
7	δ-elemene	0.08
8	isoestragole	0.08
9	α-himichalene	0.21
10	trans- caryophyllene	0.06
11	8,9-dehydro-neoisolongifolene	0.05
12	γ-himichalene	2.44
13	methyl eugenol	0.34
14	zingiberene	0.28
15	β-himichalene	0.14
16	δ-cadidene	0.03
17	β-bisabolene	0.15
18	4,5-dehydro-isolongifolene	0.07
19	β-sesquiphellandrene	0.08
20	alloaromadendrene	0.04
21	9,10-dehydro-isolongifolene	0.14
22	cis-α-copaene-8-ol	0.06
23	spathulenol	0.23
24	nealloocimene	0.04
25	p-octyloxytoluene	0.09
26	α-longipinene	0.05
27	acoradiene	0.02
28	widdrene	0.05
29	pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate	4.66
30	2-(1',2'-epoxypropyl)-4-methoxyphenyl 2-methylbutanoate	0.81
ΣΥΝΟΛΟ %		98.91

Η απόδοση του αιθερίου ελαίου σε απόσταξη 1 ώρας ήταν 30 ml/kg. Κατά την χημική ανάλυση η trans-ανηθόλη εμφανίσθηκε σε μεγαλύτερα ποσοστά 85.81%, ακολουθούμενη από τις: pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate (4.66%), γ-himachalene (2.44%) και εστραγόλη (3.37%). Παρατηρήθηκε ότι σε αυτό το αιθέριο έλαιο ταυτοποιήθηκαν 30 διαφορετικοί δευτερογενείς μεταβολίτες.

Στον παρακάτω Πίνακα 3.5 αναγράφονται συγκεντρωτικά τα μεγαλύτερα ποσοστά των ουσιών όλων των προηγούμενων ελαίων, καθώς και τα όρια αυτών όπως ορίζονται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (EP).

Πίνακας 3.5 Ποσοστά κυριότερων ενώσεων ελαίων γλυκανίσου.

ΕΝΩΣΕΙΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ %				
	Pimpran1H	PimpGK	Pilib	Pitu1h	EP
λιναλόλη	0.1	α	α	0.06	<1.5
α-τερπινεόλη	α	α	α	α	<1.2
cis-ανηθόλη	0.25	0.6	0.6	0.27	0.1-0.4
εστραγόλη	3.84	7.08	1.44	2.37	0.5-5
p-ανισαλδεΐδη	α	0.40	α	0.06	0.1-1.4
trans-ανηθόλη	87.35	87.01	79.49	85.81	87-94
pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate	2.09	α	7.44	4.66	0.3-2
Απόδοση ελαίου (ml/kg)	80	30	30	30	>20

α: Δεν εντοπίστηκε ποσοστό

Τα παραπάνω έλαια αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν όσον αφορά τα ποσοστά των ενώσεων τους με αυτά της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας. Αρχικά, η **trans-ανηθόλη** εμφανίζει κυτταροτοξική και αντικαρκινική δράση κάτω από τη συνιστώμενη δόση που ορίζει η EP. Μεταξύ των δειγμάτων το ποσοστό της παρουσιάζει διακυμάνσεις, έχοντας τιμές από 79.49% - 87.35%. Αντίθετα, η **cis-ανηθόλη** υποβαθμίζει τη ποιότητα του αιθερίου ελαίου καθώς έχει τοξικές και γονιδοτοξικές δράσεις με αποτέλεσμα η EP να περιορίζει τη συγκέντρωση αυτής της ένωσης < 0.4%.

Η αμέσως επόμενη σημαντική ένωση είναι η **εστραγόλη**. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τα φάρμακα φυτικής προέλευσης (Committee on Herbal Medicinal Products, HMPC) κατέληξε, με βάση τα διαθέσιμα τοξικολογικά δεδομένα, ότι η εστραγόλη σε μεγάλη συγκέντρωση είναι ένα γονιδιοτοξικό καρκινογόνο, με δραστικότητα επί του DNA παρόμοια με εκείνη της σαφρόλης (EMA/HMPC/321181/2012) Έχει ορίσει χαμηλά επιτρεπόμενα όρια της εστραγόλης στα αιθέρια έλαια και τα περισσότερα δείγματα ήταν μέσα στα όρια τιμών ασφάλειας με εξαίρεση αυτό από το Βόλο, που εμφάνισε υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με αυτά που ορίζονται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία.

Όσον αφορά την ένωση **pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate** τα δείγματα της Λιβαδειάς και της Τουρκίας παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά (4-7%) που δεν ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (0.3-2%), ενώ το δείγμα της Λέσβου στη 1 ώρα απόσταξη έχει ποσοστό μέσα στα όρια των προδιαγραφών. Μελέτη έχει δείξει ότι κυρίως η ένωση *epoxypseudoisoeugenol* αλλά και τα παράγωγα αυτής έχουν ισχυρές αντιμικροβιακές δράσεις (Tabanca *et al.*, 2005).

Η ανισαλδεΐδη, ένα προϊόν οξείδωσης της ανηθόλης αυξάνεται μετά από παρατεταμένη ή ακατάλληλη αποθήκευση (Tisserand, 2014). Συγκεκριμένα, η **p-ανισαλδεΐδη** σύμφωνα με το Μητρώο Τοξικών Επιδράσεων των χημικών ουσιών είναι μια ύποπτη νευροτοξική ένωση ακόμα και σε μικρές ποσότητες (Sweet, 1997). Όλα τα δείγματα αιθερίων ελαίων που αναλύθηκαν έχουν χαμηλότερες τιμές από το μέγιστο όριο, ενώ στα δείγματα Λισβορίου και Λιβαδειάς έχουμε πλήρη απουσία της.

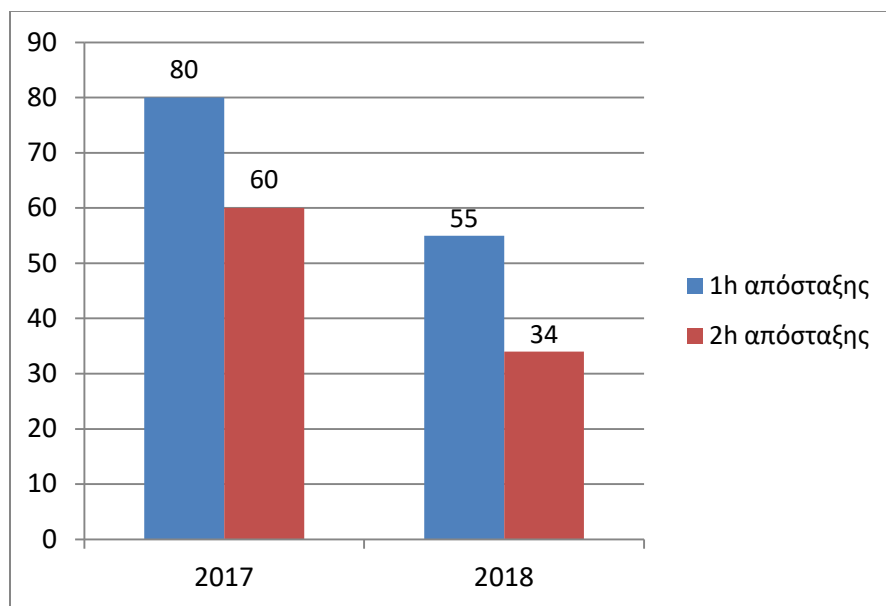
Από όλα τα δείγματα, αυτό το οποίο έδωσε την μεγαλύτερη απόδοση ελαίου (80ml/kg) μετά από απόσταξη μίας ώρας είναι το Pimran1H από το Λισβόρι της Λέσβου, σε σύγκριση με τα άλλα δείγματα που έδωσαν 30ml/kg.

Συγκριτική μελέτη των αιθερίων ελαίων μετά την παρέλευση 1 έτους.

Μετά τη παρέλευση ενός έτους, έγινε συγκριτική μελέτη της απόδοσης του αιθερίου ελαίου Λισβορίου. Συγκεκριμένα, έγινε υδραπόσταξη στα δείγματα της μιας ώρας και των δύο ωρών. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των αιθερίων ελαίων παρέμειναν σχετικά αμετάβλητα ενώ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της απόδοσης αυτών. Στην 1 ώρα απόσταξης η απόδοση του

αιθερίου ελαίου ήταν 55 ml/kg, μειούμενη κατά 25 ml/kg από την προηγούμενη χρονιά. Ενώ, η απόδοσή του στις 2 ώρες απόσταξης ήταν 34 ml/kg, μειούμενη κατά 26 ml/kg.

Παρακάτω, φαίνεται στο γράφημα η μεταβολή στην απόδοση των αιθερίων ελαίων γλυκανίσου από το Λισβόρι της Λέσβου μετά από ένα χρόνο.



Σχήμα 3.2 Μεταβολή της απόδοσης αιθερίων ελαίων γλυκανίσου από το Λισβόρι της Λέσβου μέσα στο διάστημα ενός χρόνου (2017-2018).

Μια από τις σημαντικότερες πτυχές που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την εμπορευματοποίηση των φυτών είναι η συσκευασία και η αποθήκευσή τους. Υπάρχει μια ευρέως διαδεδομένη πεποίθηση ότι τα φυτά, μόλις ξηραθούν, έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής από μικροβιολογικής απόψεως, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στη χαμηλή περιεκτικότητά τους σε νερό, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη σχεδόν όλων των μικροοργανισμών (Mahmoodi Sourestani *et al.*, 2014).

Παρ' όλα αυτά, οι οργανοληπτικές ιδιότητες των φυτών μπορούν να επηρεαστούν αξιοσημείωτα από τα υλικά συσκευασίας, το χρόνο και τις συνθήκες αποθήκευσης όπως θερμοκρασία, σχετική υγρασία και φως (Franke and Schilcher, 2005). Συχνά παρατηρείται ότι τα πτητικά συστατικά είναι αρκετά σταθερά στον φυτικό ιστό κατά τη διάρκεια της ξήρανσης, αλλά αργότερα επηρεάζονται από τις συνθήκες αποθήκευσης. Στην περίπτωση αυτή, οι

σχετικές απώλειες πτητικών ενώσεων οφείλονται κυρίως σε εξάτμιση και οξειδωτικές αντιδράσεις (Mahmoodi Sourestani *et al.*, 2014; Schweiggert *et al.*, 2007).

Επιπλέον, η απόδοση του αιθερίου ελαίου επηρεάζεται ιδιαίτερα από το χρόνο αποθήκευσης. Στη παρούσα εργασία, η απόδοση και των δυο αιθερίων ελαίων μετά την συγκομιδή έδωσε υψηλότερη περιεκτικότητα σε έλαιο, σε σύγκριση με την απόδοση μετά από αποθήκευση ενός χρόνου. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με άλλες βιβλιογραφίες των φυτών *Agastache foeniculum* (Mahmoodi Sourestani *et al.*, 2014) και δενδρολίβανου (Díaz-Maroto *et al.*, 2009). Ωστόσο, οι μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται αυτή η μείωση δεν είναι ακόμη σαφείς.

3.2. Διαχωρισμός και απομόνωση κύριων δευτερογενών μεταβολιτών αιθερίου ελαίου γλυκανίσου Λισβορίου Λέσβου

Το αιθέριο έλαιο που αποστάχθηκε στη 1h (Pimran1H) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε διαφορετικά συστήματα ανάπτυξης προκειμένου να βρεθεί το καταλληλότερο και η καλύτερη χρωματογραφική εικόνα παρουσιάσθηκε στο σύστημα ανάπτυξης τολουόλιο - οξικός αιθυλεστέρας (70:30)



Εικ 3.5 Σύστημα ανάπτυξης τολουόλιο - οξικός αιθυλεστέρας 70:30

Για την απομόνωση των κυριότερων συστατικών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης στο δείγμα ελαίου από την Λέσβο (Pimpran1H).

Χρησιμοποιήθηκαν 261.5 mg δείγματος ελαίου σε στήλη διαμέτρου 10 mm και ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε το εξάνιο. Συλλέχθηκαν 40 κλάσματα και συνενώθηκαν όπως φαίνεται στο Πίνακα που ακολουθεί

Αρ. κλάσματος	Διαλύτης	Ουσία
1	Hexane 100%	γ-himachalene/ α-himachalene/ β-himachalene
2		
3-38	Hexane 100%	trans-ανηθόλη
39	Hexane 100%	-
40	Hexane 100%	-



Εικ 3.6 TLC: Pimpran1H, Pimp338 Pimp2

Τα κλάσματα 3-38 συνενώθηκαν έδωσαν την trans-ανηθόλη (κωδ: Pimp338) και τα κλάσματα 1+2 έδωσαν ένα μίγμα που περιείχε το δευτερογενή μεταβολίτη γ-himachalene σε ποσοστό 75% και δυο ισομερή της κύριας ένωσης, που είναι η α-himachalene και η β-himachalene, με ποσοστό μικρότερο του 10% για καθεμία από αυτές τις δύο ενώσεις. (κωδ: Pimp2).

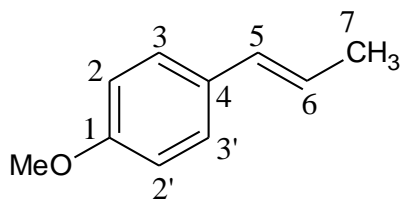
Η ταυτοποίηση των απομονωμένων ουσιών έγινε με φασματοσκοπία NMR και με GC-MS.

Πίνακας 3.6 Απομονωμένες δομές

Κλάσμα Pimp338	trans-ανηθόλη
Κλάσμα Pimp2	γ-himachalene (α-himachalene & β-himachalene)

3.3 Φασματοσκοπική μελέτη των απομονωμένων συστατικών

Κλάσμα Pimp338: trans-ανηθόλη



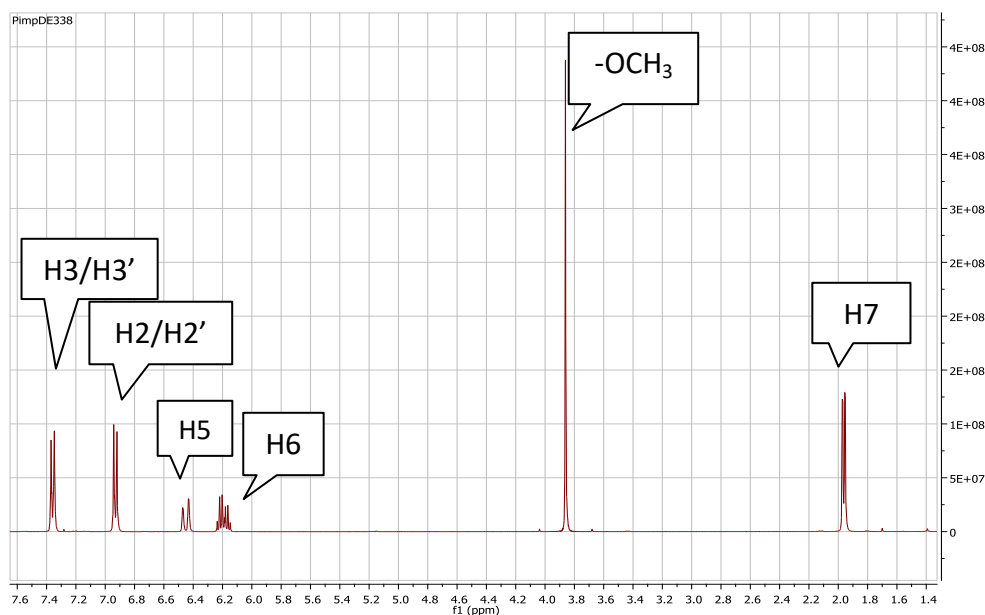
Σχήμα 3.3 trans-ανηθόλη

Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρείται μια απλή κορυφή στα 3.84ppm, η οποία αντιστοιχεί στη μεθόξυ ομάδα της θέσης 1 του φαινολικού δακτυλίου. Μια διπλή διπλής κορυφή στα 1.94ppm αντιστοιχεί στο τελικό μεθύλιο της αλυσίδας. Τα δυο ολεφινικά πρωτόνια εμφανίζονται ως διπλή-διπλής κορυφή στα 6.43ppm ($J=16\text{Hz}$, 2Hz) και ως πολλαπλή στα 6.17ppm. Ο αρωματικός δακτύλιος, έχει δύο διαφορετικά ζεύγη (μοτίβο A_2B_2) ορθο-αρωματικών πρωτονίων που εμφανίζονται ως διπλές κορυφές στα 6.91 και 7.34ppm.

Τα δεδομένα αυτά συγκρινόμενα και με την βιβλιογραφία (LeFevre, 2000; Zayga *et al.*, 2013) οδηγούν στη δομή της trans-ανηθόλης.

Πίνακας 3.7 Φασματοσκοπικά δεδομένα της trans-ανηθόλης

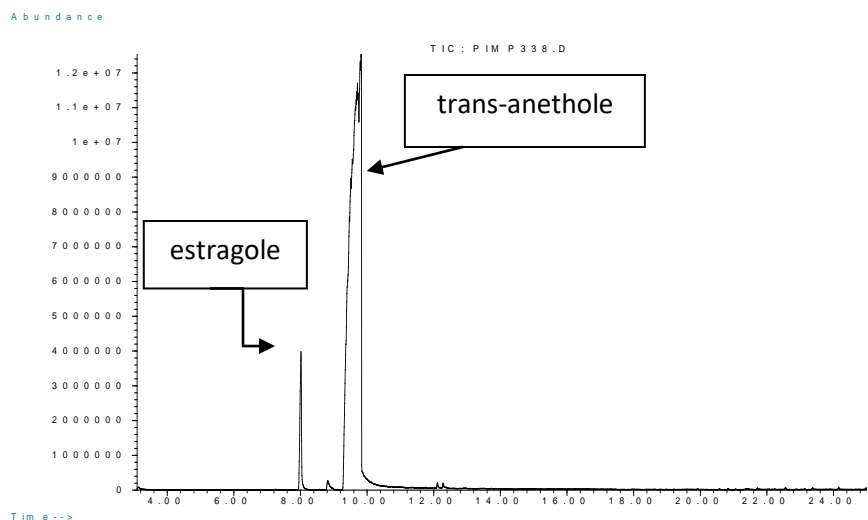
δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα	Πρωτόνιο
1.94	3H	dd ($J=1.6\text{Hz}$, 6.8Hz)	-CH ₃
3.84	3H	s	-OCH ₃
6.17	1H	m	H6
6.43	1H	dd ($J=16\text{Hz}$, 2Hz)	H5
6.91	2H	dd ($J=9.1\text{Hz}$, 2Hz)	H2/H2'
7.34	2H	dd ($J=9.1\text{Hz}$, 2Hz)	H3/H3'



Εικ. 3.7 Φάσμα πρωτονίου trans-ανηθόλης

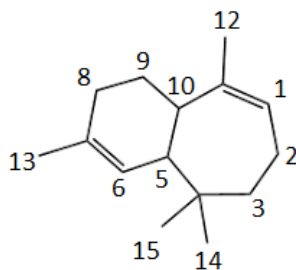
Τα φαινυλοπροπανοειδή, όπως η trans-ανηθόλη, συνθέτουν τη μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών που παράγονται από ανώτερα φυτά, κυρίως για προστασία από βιοτικές ή αβιοτικές καταπονήσεις όπως μικροβιακές προσβολές, τραυματισμούς, υπεριώδη ακτινοβολία, ρύπους και φυτοφάγα ζώα θηρευτές. Είναι μόρια που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση πολυάριθμων δομικών και λειτουργικά διαφορετικών φυτικών πολυφαινολών όπως φλαβονοειδή, κουμαρίνες κ.α (Korkina *et al.*, 2011). Αντίθετα, η cis-ανηθόλη είναι τοξική και δίδει στο προϊόν δυσάρεστο άρωμα και γεύση.

Με το φάσμα του GC-MS που ακολουθεί επιβεβαιώνεται η δομή τη χημικής ένωσης trans-ανηθόλης.



Εικ. 3.8 Χρωματογράφημα της απομονωμένης ένωσης trans-ανηθόλης.

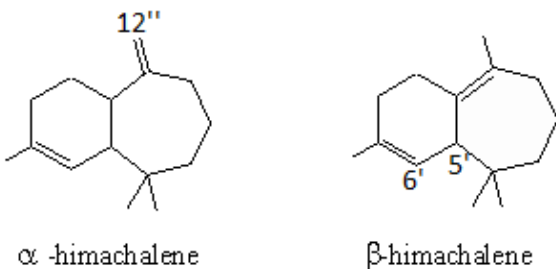
Κλάσμα Pimp2: γ -himachalene



Σχήμα 3.4 γ -himachalene

Στο φάσμα πρωτονίου παρατηρούνται δυο ολεφινικά πρωτόνια ως μια ευρεία διπλή κορυφή στα 5.55ppm και ως τριπλή στα 5.46ppm, δυο απλές κορυφές μεθυλίων στα 0.96 και 1.01ppm που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία καθώς και δύο μεθύλια που αποθωρακίζονται στα 1.67 και 1.69ppm λόγω του οτι βρίσκονται πάνω σε διπλό δεσμό. Επίσης στην περιοχή απο 1.5 έως 2.40ppm παρατηρούνται σήματα που αντιστοιχούν σε μεθυλένια και μεθίλια των δυο δακτυλίων.

Τα δεδομένα αυτά συγκρινόμενα και με τη διεθνή βιβλιογραφία (Burkhardt *et al.*, 1986; Hamilton *et al.*, 1996; Boger and Wolkenberg, 2000) οδηγούν στη δομή κυρίως της γ -himachalene σε μίγμα με μικρότερες ποσότητες των α -himachalene και β -himachalene.



Σχήμα 3.5 Δομές των α -himachalene και β -himachalene

Όπως παρατηρείται στο παρακάτω φάσμα του ^1H NMR, η ένωση α -himachalene εμφανίζει ένα εξωκυκλικό μεθυλένιο στον άνθρακα 12'', το οποίο εντοπίζεται ως πολλαπλές κορυφές στα 4.78/4.85ppm. Από την άλλη πλευρά, η ένωση β -himachalene, λόγω της διαφορετικής στερεοχημείας των διπλών δεσμών, εμφανίζει το ολεφινικό H6' στα 5.30ppm ως μια ευρεία απλή κορυφή καθώς και το H5' στα 2.87ppm ως μια ευρεία απλή κορυφή.

Πίνακας 3.8 Φασματοσκοπικά δεδομένα που προέκυψαν απο συνεκτίμηση ^1H και COSY της ουσίας γ -himachalene.

δ (ppm)	Ολοκλήρωση	Πολλαπλότητα / J	Πρωτόνιο
0.96	3H	s	-CH ₃ (H15)
1.01	3 ^H	s	-CH ₃ (H14)
1.56*	1H	m	H2
1.67	3H	s	-CH ₃ (H13)
1.69	3H	s	-CH ₃ (H12)
1.87-1.95	4 ^H	m	H2,H8,H9
2.15	1 ^H	brs	H5
2.38	1 ^H	brs	H10
5.46	1H	t ($J=6.0/12.0$ Hz)	H1
5.55	1H	bd ($J=3.0$ Hz)	H6

*τα σήματα αυτά προκύπτουν απο το φάσμα COSY

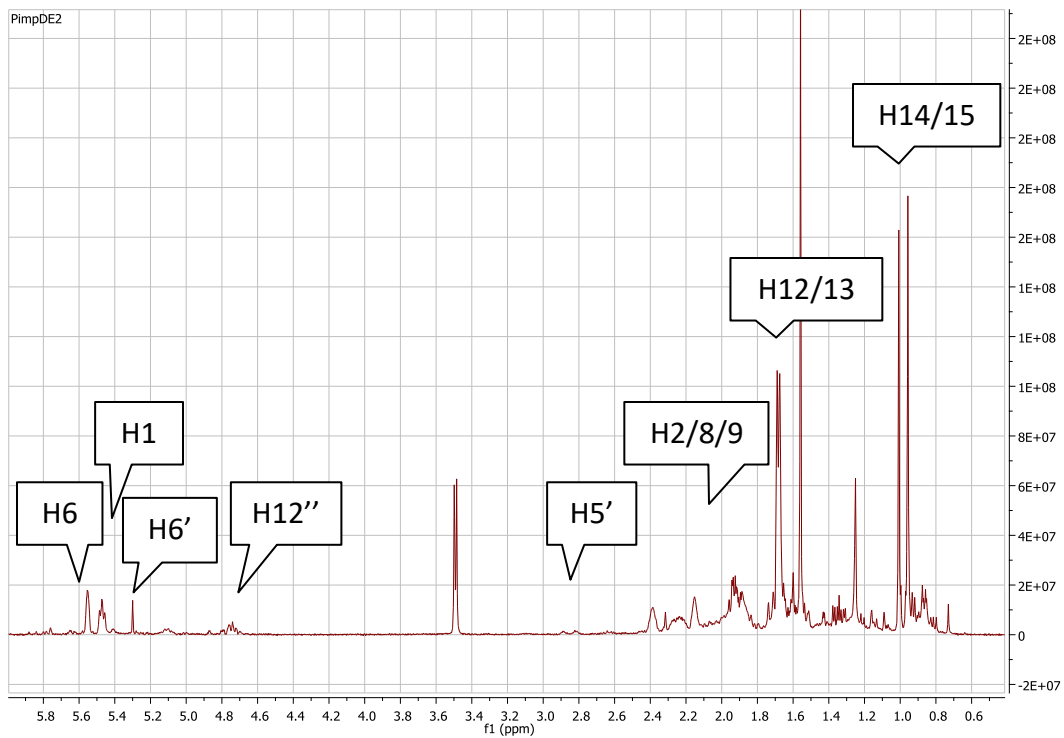
Οι συνολικοί συσχετισμοί συντονισμού μεταξύ των πρωτονίων καθορίστηκαν από το φάσμα COSY και παρατίθενται στον Πίνακα 3.9. Παρατηρούμε ότι το ολεφινικό πρωτόνιο H6, το οποίο βρίσκεται δίπλα στη σύζευξη του δακτυλίου με το πρωτόνιο H5, οι αντιστοιχίσεις των H5-H10, H10-H9, αλλά και οι συνδέσεις των απομακρυσμένων πρωτονίων H6-H13 και H1-H12

απέδειξαν την ύπαρξη ενός συστήματος δικυκλικού δακτυλίου αποτελούμενου από δυο δακτυλίου με έξι και επτά άτομα άνθρακα.

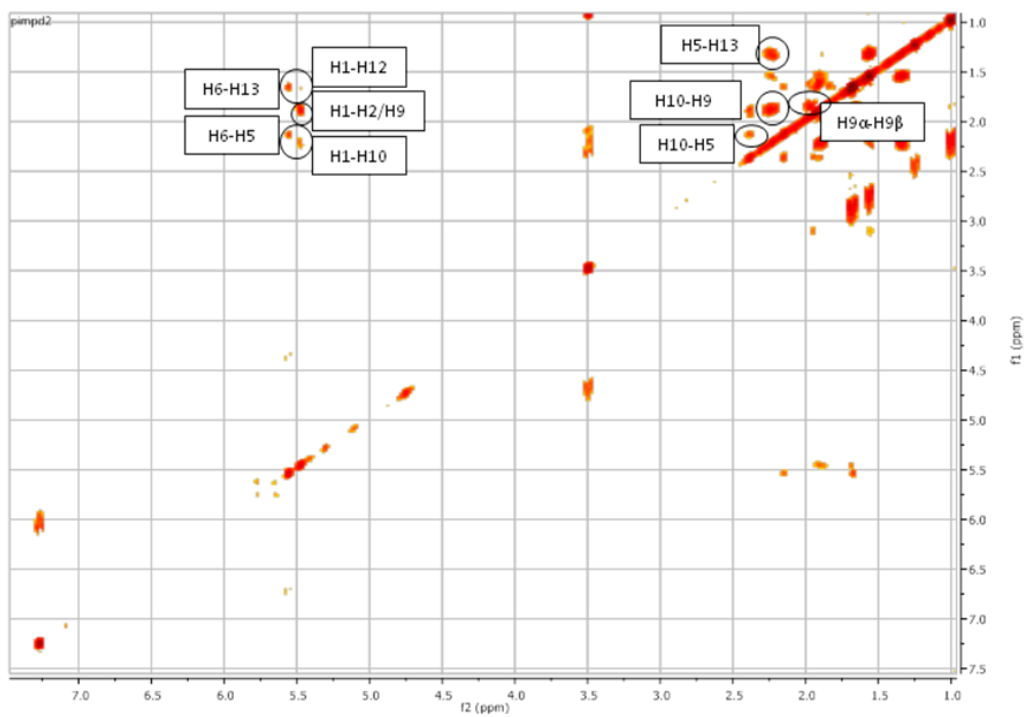
Πίνακας 3.9 Φασματοσκοπικά δεδομένα απο COSY της γ -himachalene.

ppm	15	14	13	12	10	9	8	6	5	3	2
H1(5.46)				✓							✓
H2(1.90)										✓	
H5(2.15)			✓		✓			✓			
H6(5.55)			✓								
H8(1.90)											
H9(1.87-1.95)					✓	✓					
H10(2.38)					✓	✓					
H12(1.69)											
H13(1.67)											
H14(1.01)											
H15(0.96)											

Παρακάτω ακολουθούν τα δύο φάσματα ^1H NMR και COSY για την γ -himachalene .

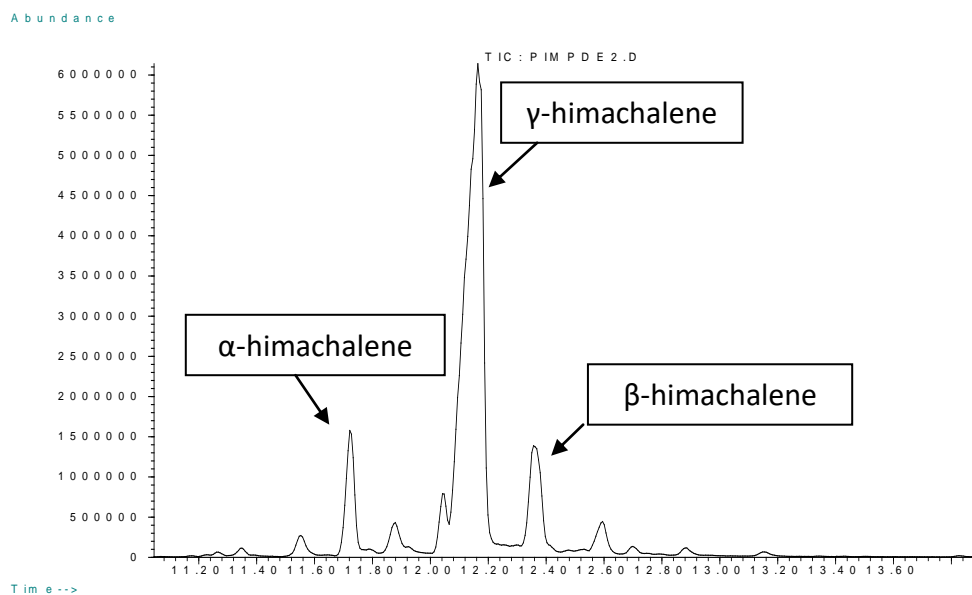


Εικ. 3.9 Φάσμα ^1H NMR γ -himachalene



Εικ. 3.10 Φάσμα COSY γ -himachalene

Επιβεβαιώνεται με το φάσμα του GC-MS ότι η ένωση, η οποία βρίσκεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 75% στο κλάσμα, είναι η γ -himachalene. Ωστόσο, διαπιστώνεται από το φάσμα η ύπαρξη των δυο ισομερών των κύριας ένωσης, που είναι η α -himachalene και η β -himachalene, με ποσοστό μικρότερο του 10% για καθεμία από αυτές τις δύο ενώσεις.



Εικ. 3.11 Φασματογράφημα γ -himachalene, α -himachalene και β -himachalene

Συμπεράσματα

Μελετήθηκαν με τη τεχνική GC-MS τα αιθέρια έλαια τριων ελληνικών δειγμάτων γλυκανίσου από τις περιοχές Λισβόρι (Λέσβου), Βόλου (Θεσσαλίας) και Λιβαδειάς (Βοιωτίας) και ενός δείγματος της ελληνικής αγοράς Τούρκικης προέλευσης.

Αρχικά, το δείγμα γλυκανίσου από το Λισβόρι Λέσβου αποστάχθηκε σε τρεις διαφορετικούς χρόνους (1h, 2h και 3h). Επιλέχθηκε για τη συνέχεια των πειραμάτων η 1 ώρα αποστάξεως στην οποία η απόδοση του ελαίου ήταν η μεγαλύτερη (80ml/kg). Τα παραπάνω έλαια αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν όσον αφορά τα ποσοστά των δευτερογενών τους μεταβολιτών με αυτά της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας. Η ένωση που έχει το μεγαλύτερο ποσοστό, **trans-ανηθόλη**, εμφανίζει διακυμάνσεις μεταξύ των δειγμάτων. Η επόμενη σημαντική ένωση **εστραγόλη**, όπως ορίζεται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία πρέπει να βρίσκεται μεταξύ από 0.5%-5%. λόγω της τοξικότητας. Τα περισσότερα δείγματα ήταν μέσα στα όρια τιμών ασφάλειας με εξαίρεση αυτό από το Βόλο, που εμφάνισε υψηλότερα ποσοστά. Όσον αφορά την ένωση **pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate** τα δείγματα της Λιβαδειάς και της Τουρκίας παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά (4-7%) που δεν ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (0.3-2%), ενώ το δείγμα του Λισβορίου έχει ποσοστό εντός των προδιαγραφών της ΕΡ (2.09%). Το προϊόν οξείδωσης της trans-ανηθόλης, **p-anisaldehyde** απουσίαζε εντοπίζεται στα δείγματα Βόλου και Τουρκίας. Μια επιπλέον σημαντική ένωση είναι η **γ-himachalene** που ανιχνεύθηκε σε όλα τα μελετηθέντα δείγματα, εκτός αυτού το Βόλου, σε ποσοστό από 2.44%-4.64% με μεγαλύτερο ποσοστό στο αιθέριο έλαιο Λιβαδειάς.

Μετά τη παρέλευση ενός έτους, έγινε συγκριτική μελέτη της απόδοσης του αιθερίου ελαίου Λισβορίου. Συγκεκριμένα, έγινε υδραπόσταξη στα δείγματα της μιας ώρας και των δύο ωρών. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των αιθερίων ελαίων παρέμειναν σχετικά αμετάβλητα ενώ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της απόδοσης αυτών. Στην 1 ώρα απόσταξης η απόδοση του αιθερίου ελαίου ήταν 55 ml/kg, μειούμενη κατά 25 ml/kg από την προηγούμενη χρονιά. Ενώ, η απόδοσή του στις 2 ώρες απόσταξης ήταν 34 ml/kg, μειούμενη κατά 26 ml/kg. Οι μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται αυτή η μείωση βιβλιογραφικά δεν είναι ακόμη σαφείς.

Παράλληλα, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν φασματοσκοπικά από το έλαιο Λισβορίου, οι ουσίες trans-ανηθόλη (κωδ: Pimp338) και η γ -himachalene σε μίγμα με α - και β -himachalene. (κωδ: Pimp2). Η πλούσια χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου του Λισβορίου και η πολύ μεγάλη απόδοση ελαίου, συμβάλλουν τελικά σε ένα εξαιρετικής ποιότητας αιθέριο έλαιο.

Βιβλιογραφία

Ελληνική

- Αναστασάκη Ε. **2014**. “Απομόνωση, χαρακτηρισμός συστατικών αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών της Μεσογειακής χλωρίδας. Μελέτη και αξιολόγηση της βιολογικής δραστηριότητας”, Αθήνα.
- Γαρδέλη, Χ. **2009**. “Μελέτη της Χημικής σύστασης αιθερίων ελαίων ορισμένων αρωματικών φυτών της Ελληνικής χλωρίδας” Διδακτορική Διατριβή, ΓΠΑ Αθήνα.
- Δαφερέρα, Δ., **2003**. “Παραλαβή και ανάλυση GC MS και βιολογική δράση των αιθερίων ελαίων από αρωματικά φαρμακευτικά φυτά” Αθήνα.
- Ζαρλαχά, Α. **2016**. “Απομόνωση μελέτη και βιολογική δραστηριότητα συστατικών φυσικών προϊόντων” Παν/μιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
- Πολυσίου, Μ. **2015**. “Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά”, Εκδόσεις Τριπτόλεμος, Αθήνα.
- Προεστός, Χ. **2005** “Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών σε αρωματικά φαρμακευτικά φυτά” Αθήνα.
- Ταραντίλης, Π. **2015**. “Αξιοποίηση Φαρμακευτικών και Αρωματικών Φυτών - Βοτάνων – Αιθερίων Ελαίων”, Εκδόσεις Τριπτόλεμος, ΓΠΑ Αθήνα.

Ξενόγλωσση

- Askari, F., and F. Sefidkon. **2005**. “Volatile Components of *Pimpinella tragioides* Vill. from Iran.” *Iran J Pharmacy Res* 2: 117–120.
- Awad, N. M., A. S. Turky, and A. A. Mazhar. **2005**. “Effects of Bio- and Chemical Nitrogenous Fertilizers on Yield of Anise (*Pimpinella anisum* L.) and Biological Activities of Soil Irrigated with Agricultural Drainage Water.” *Egypt J Soil Sci* 45: 265–278.
- Barnes, J., L. A. Anderson, and J. D. Phillipson. **2002**. *Herbal Medicines: A Guide for Healthcare Professionals*. London, Chicago: Pharmaceutical Press.
- Besharati-Seidani, A., A. Jabbari, and Y. Yamini. **2005**. “Headspace Solvent Microextraction: A Very Rapid Method for Identification of Volatile Components of Iranian *Pimpinella anisum* Seed.” *Analytica Chimica Acta* 530 (1): 155–161.

- Boger, D. L., and S. E. Wolkenberg. **2000**. "Total Synthesis of α - and β -Himachalene by an Intermolecular Diels-Alder Approach." *Synthesis*, no. 10: 9120–9124.
- Boskabady, M. H., and M. Ramazani-Assari. **2001**. "Relaxant Effect of *Pimpinella anisum* on Isolated Guinea Pig Tracheal Chains and Its Possible Mechanism(s)." *J Ethnopharm* 74 (1): 83–88.
- Bown, D. **2001**. *Encyclopedia of Herbs and Their Uses*. The Herb Society of America. London: Darling, Kindersley.
- Bruneton, J. **1999**. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Second. Paris, New York: Intercept Ltd.
- Burkhardt, G., J. Reichling, R. Martin, and H. Becker. 1986. "Terpene Hydrocarbons in *Pimpinella Anisum* L." *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition* 8 (3): 190–193.
- Caspi, R., C. A. Fulcher, A. Kothari, M. Krummenacker, M. Latendresse, S. Paley, P. Subhraveti, et al. **2012**. "Pathway: Epoxypseudoisoeugenol-2-Methylbutanoate Biosynthesis." *MetaCyc*.
- Dallmeier, K., and E. A. Carlini. **1981**. "Anaesthetic, Hypothermic, Myorelaxant and Anticonvulsant Effects of Synthetic Eugenol Derivatives and Natural Analogues." *Pharmacol* 22: 113–127.
- Derawi, K.H. A. **2016**. "Variation in Essential Oil Content and Composition (*Pimpinella anisum* L.)" *J Biol Agric and Healthcare* 6 (2): 43–57.
- Díaz-Maroto M. C., E. Alanon, Pardo, N. Castillo Muñoz, I. J. Díaz-Maroto and M. S. Pérez-Coello. **2009**. "Effect of storage conditions on volatile composition of dried rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves." *Flavour. J Fragr* 24: 245–250.
- ESCOP. **2003**. *ESCOP Monographs*. Second. Stuttgart, New York: Thieme.
- European Medicines Agency. Assessment report on *Pimpinella anisum* L., fructus and *Pimpinella anisum* L., aetheroleum EMEA/HMPC/321181/2012.
- European Pharmacopoeia. **2005**. *Aniseed – Anisi Fructus*. Council of Europe. Fifth. Vol. 1. Strasbourg.
- Fitsiou, E., G. Mitropoulou, K. Spyridopoulou, A. Tiptiri-Kourpeti, M. Vamvakias, H. Bardouki, M. I. Panayiotidis, et al. **2016**. "Phytochemical Profile and Evaluation of the Biological Activities of Essential Oils Derived from the Greek Aromatic Plant Species *Ocimum*

- basilicum, Mentha spicata, Pimpinella anisum and Fortunella margarita.*" *Molecules* 21 (8): 1–15.
- Franke R., H. Schilcher. **2005**. Chamomile, industrial profile. Taylor and Francis, New York 278.
- Gautam, N., A. K. Mantha, and S. Mittal. **2014**. "Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents: A Mechanistic View." *BioMed Res* 24.
- Gerard, J. **1597**. "*The Herbal or General History of Plants.*" London.
- Grieve, M. **1992**. *A Modern Herbal: The Medicinal, Culinary, Cosmetic, and Economic Properties, Cultivation, and Folklore of Herbs, Grasses, Fungi, Shrubs, and Trees with All Their Modern Scientific Uses*. Dorset Press.
- Hamilton, J. G. C., G. W. Dawson, and J. A. Pickett. **1996**. "3-Methyl- α -Himachalene: Proposed Structure for Novel Homosesquiterpene Sex Pheromone of *Lutzomyia Longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jacobina, Brazil." *J Chem Ecol* 22 (12): 2331–2340.
- Hammurabi. **1996**. *The Code of Hammuraby*. Library of Alexandria.
- Heywood, V. H. **1971**. *The Biology and Chemistry of the Apiaceae*. London: Linnean Society of London.
- HMPC Public statement on the use of herbal medicinal products containing estragole (EMA/HMPC/137212/2005).
- Jiménez-Carmona, M. M., J. L. Ubera, M. D. Luque de Castro. **1999**. "Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil" *J Chromatogr A* 855 (2): 625-632.
- Kang, P., K. Y. Kim, S. H. Lee, S. S. Min, and G. H. Seol. **2013**. "Anti-Inflammatory Effects of Anethole in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice." *Life Sci* 93 (24): 955–961.
- Korkina, L., V. Kostyuk, C. De Luca, and S. Pastore. **2011**. "Plant Phenylpropanoids as Emerging Anti-Inflammatory Agents." *Mini-Rev Medic Chem* 11 (10): 823–835.
- Kubeczka, K. H. **1997**. *In Proceedings of the 28th International Symposium on Essential Oils*. Edited by K. H. C. Baser and N. Kirimer. Eskisehir, Turkey: Anadolu University Press.
- LeFevre, J. W. **2000**. "Isolating Trans-Anethole from Anise Seeds and Elucidating Its Structure: A Project Utilizing One- and Two-Dimensional NMR Spectrometry." *J Chem Educ* 77 (3): 361.

- Mahmoodi Sourestani M., M. Malekzadeh, and A. Tava. **2014**. "Influence of drying, storage and distillation times on essential oil yield and composition of anise hyssop [*Agastache foeniculum* (Pursh.) Kuntze]". *J Essent Oil Res* 26 (3): 177–184.
- Moralizadeh, M. **2013**. "Comparison of Hydro-distillation, Microwave Hydro-distillation and Solvent free microwave Methods in analysis of the essential oils." Kerman.
- Ntalli N. G, F. Ferrari, I. Giannakou, and U. Menkissoglu-Spiroudi. **2010**. "Phytochemistry and nematocidal activity of the EOs from 8 greek lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components." *J Agric Food Chem* 58:7856–7863.
- Nurul A. M. **2004**. "Process design of hydro-distillation in ginger oil production." Kuala Lumpur.
- Omidbaigi, R. **2000**. *Production and Processing of Medicinal Plants*. Third. Tehran: Astan Quds Publication.
- Omidbaigi, R., A. Hadjiakhoondi, and M. Saharkhiz. **2003**. "Changes in Content and Chemical Composition of (*Pimpinella anisum*) Oil at Various Harvest Time." *J Ess Oil Bear Plants* 6: 46–50.
- Orav, A., A. Raal, and E. Arak. **2008**. "Essential Oil Composition of *Pimpinella anisum* L. Fruits from Various European Countries." *Nat Prod Res* 22 (3): 227–232.
- Ozkan G., H. Baydar, S. Erbas **2010**. "The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish ore-gano (*Origanum onites* L.)" *J Sci Food Agric* 90 (2): 205-209.
- Papageorgiou V., A. Mallouchos, M. Komaitis. **2008**. "Investigation of the Antioxidant Behaviour of Air- and Freeze Dried Aromatic Plant Materials in Relation to their Phenolic Content and Vegetative cycle" *J Agric Food Chem* 56 (14): 5743-5752.
- Park, I. K., K. S. Choi, D. H. Kim, I. H. Choi, L. S. Kim, and W. C. Bak. **2006**. "Fumigant Activity of Plant Essential Oils and Components from Horseradish (*Armoracia rusticana*), Anise (*Pimpinella anisum*) and Garlic (*Allium sativum*) Oils against *Lycoriella ingénue* (Diptera: Sciaridae)." *Pest Manag Sci* 62 (8): 723–728.
- Peredo – Luna, H.A. **2009**. "Aceites esenciales: metodos de extraction." Mexico.

- Picon, P. D., R. V. Picon, A. F. Costa, G. B. Sander, K. M. Amaral, and A. L. Aboy. **2010**. "Randomized Clinical Trial of a Phytotherapeutic Compound Containing *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Sambucus nigra*, and *Cassia augustifolia* for Chronic Constipation." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10: 17.
- Rajeshwari, U., I Shobha, and B. Andallu. **2011**. "Comparison of Aniseeds and Coriander Seeds for Antidiabetic, Hypolipidemic and Antioxidant Activities." *Spatula DD* 1 (1): 9–16.
- Reineccius G. **1994**. *Source Book of Flavours*. Second. New York: Chapman and Hall.
- Ross, I. A. **2001**. *Medicinal Plants of the World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses*. Second. Springer Science & Business Media.
- Santos, P. M., A. C. Figueiredo, M. M. Oliveira, J. G. Barroso, L. G. Pedro, S. G. Deans, A. K. M. Younus, and J. J. C. Scheffer. **1998**. "Essential Oils from Hairy Root Cultures and from Fruits and Roots of *Pimpinella anisum*." *Phytochem* 48: 455–460.
- Schweiggert U., R. Carle and A. Schieber. **2007**. "Conventional and alternative processes for spice production, a review". *Trends Food Sci Technol* 18: 260–268.
- Selley, M. L., J. A. McGuinness, M. R. Bartlett, and N. G. Ardlie. **1992**. "Effect of Anethole Dithiolthione on Human Platelet Aggregation." *Arzneimittel-Forsch– J* 42 (3): 318–321.
- Staub, J. **2008**. *75 Exceptional Herbs*. Gibbs Smith.
- Sweet, D. V. **1997**. *Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS)*. DHHS (NIOSH). Cincinnati, Ohio.
- Tabanca, N., E. Bedir, D. Ferreira, D. Slade, D. E. Wedge, M. R. Jacob, S. I. Khan, E. Bedir, K. H. Baser, and I. A. Khan. **2005**. "Bioactive Constituents from Turkish *Pimpinella* Species." *Chem Biodiver* 2: 221–232.
- Tabanca, N., B. Demirci, T. Ozek, N. Kirimer, K. H. C. Baser, E. Bedir, I. A. Khan, and D. E. Wedge. **2006**. "Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Essential Oils from *Pimpinella* Species Gathered from Central and Northern Turkey." *J Chromat A* 1117 (2): 194–205.
- Tisserand. R., **2014**. "Essential Oil Profiles." In *Essential Oil Safety*, edited by Phytotherapy Research, Second. London: Elsevier.

- Tognolini, M., V. Ballabeni, S. Bertoni, R. Bruni, M. Impicciatore, and E. Barocelli. **2007**. "Protective Effect of *Foeniculum vulgare* Essential Oil and Anethole in an Experimental Model of Thrombosis." *Pharmacol Res* 56 (3): 254–260.
- Tuncturk, M., and B. Yildirim. **2006**. "Effect of Seed Rates on Yield and Yield Components of Anise (*Pimpinella anisum* L.)." *Indian J Agric Sci* 76: 679–81.
- Turner, W. **1548**. *The Names of the Herbs*. Royal College of Physicians of London: London English Dialect Society.
- Turner, W. **1551**. *A New Herbal*. Cologne.
- Singh, D., and S. K. Agarwal. **1988**. "Himachalol and β -Himachalene: Insecticidal Principles of Himalayan Cedarwood Oil." *J Chem Ecol* 14 (4): 1145–1151.
- Ullah, H., A. Mahmood, M. Ijaz, B. Tadesse, and B Honermeier. **2013**. "Evaluation of Anise (*Pimpinella anisum* L.) Accessions with Regard to Morphological Characteristics , Fruit Yield, Oil Contents and Composition." *J Medic Plants Res* 7 (29): 2177–2186.
- Velasco-Negueruela, A., M. J. Perez-Alonso, P. L. P. de Paz, J. Pala-Paul, and J. Sanz. **2005**. "Analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of the Essential Oils from the Aerial Parts of *Pimpinella Anagodendron* Bolle and *Pimpinella Rupicola* Svent., Two Endemic Species to the Canary Islands, Spain." *J Chromat A* 1095: 180.
- Velasco-Negueruela, A., M. J. Pérez-Alonso, P. L. P. de Paz, C. G. Vallejo, J. Palá-Pául, and A. Iñigo. **2002**. "Chemical Composition of the Essential Oils from the Roots, Fruits, Leaves and Stems of *Pimpinella cumbrae* Link Growing in the Canary Islands (Spain)." *Flav Fragr J* 17: 468–471.
- Zayya, A. I., A.J. Singh, and H. Cumming. **2013**. "Carbon Extraction of Essential Oils from Spices Using Steam Distillation." New Zealand.
- Zheljazkov, V. D., A. Callahan, and C. L. Cantrell. **2008**. "Yield and Oil Composition of 38 Basil (*Ocimum basilicum* L.) Accessions Grown in Mississippi." *J Agric Food Chem* 56: 241–245.

Διαδικτυακές πηγές

<https://blog.gardeningknowhow.com/tbt/learn-anise-herb-history/>. Dyer, M. H. **2017**. “Learn about Anise Herb History.” ημερομηνία πρόσβασης 31.05.2018

<http://www.ourherbgarden.com/herb-history/anise.html> “History of Anise.” **2008**. *Our Herb Garden*. ημερομηνία πρόσβασης 31.05.2018