



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανάπτυξη μεθόδων παραλαβής εκχυλισμάτων βιοδραστικών
συστατικών από το φυτό *Vitis vinifera* και προετοιμασία μελέτης
σκοπιμότητας για την ανάπτυξη νέου προϊόντος**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ερευνητής Β', Δρ Ζουμπουλάκης Παναγιώτης

ΝΑΤΑΛΙΑ ΣΩΤΗΡΙΟΥ

A.M.:00015

ΑΘΗΝΑ,2017



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF BIOLOGY, MEDICINAL CHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES
IN
BIOENTREPRENEURSHIP



MASTER THESIS

**Development of an extraction method for bioactive compounds
from the leaves of *Vitis vinifera* L. plant and feasibility study for
new product development**

SUPERVISOR: RESEARCHER B', ZOUMPOULAKIS PANAGIOTIS

NATALIA SOTERIOU
A.M.: 00015
ATHENS, 2017

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με την APIVITA S.A. .

Εγκρίθηκε την από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Ζουμπουλάκης Παναγιώτης	Ερευνητής Β΄	
Ζωγράφος Σπυρίδων	Ερευνητής Β΄	
Παπαδημητρίου Βασιλική	Ερευνήτρια Γ΄	

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατ' αρχάς θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέπων καθηγητή της Διπλωματικής μου εργασίας κ. Ζουμπουλάκη Παναγιώτη, Ερευνητή Β' του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και την πολύτιμη βοήθεια του καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, τον κ. Ζωγράφο Σπυρίδων Ερευνητή Β του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και την κ. Παπαδημητρίου Βασιλική Ερευνήτρια Γ' του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρία APIVITA S.A. για την ευκαιρία που μου έδωσαν και την φιλοξενία στα εργαστήρια της προκειμένου να πραγματοποιηθεί σημαντικό μέρος των πειραματικών διεργασιών της παρούσας εργασίας. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή Επιστημονικών Υποθέσεων της APIVITA, Δρ. Κ. Γαρδίκη και τα μέλη της επιστημονικής του ομάδας, Παντελή Νατσκούλη και Ελένη Σπανίδη για την καθοδήγηση, την βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές που μου πρόσφεραν.

Ακόμα νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτορα Δήμητρα Λαντζουράκη, που χωρίς την τεράστια βοήθεια που μου πρόσφερε, την υποστήριξη και την καλή συνεργασία που είχαμε δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Ευχαριστώ θερμά και την συνοδοιπόρο μου, Γεωργία Ασυμομύτη για την άριστη συνεργασία που είχαμε κατά την εκπόνηση των πειραματικών μας διεργασιών, για την υπομονή της, για την ηθική υποστήριξη και τις όμορφες στιγμές που μου πρόσφερε όλους τους μήνες που μας πέρασαν.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις μεγαλύτερες και τις πιο θερμές ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου που πιστεύουν σε εμένα και με την συνεχή ηθική και έμπρακτη υποστήριξη τους βοήθησαν στο να πραγματοποιήσω και να ολοκληρώσω με επιτυχία το Μεταπτυχιακό Βιοεπιχειρείν στη Αθήνα. Χωρίς την αγάπη και την υποστήριξη που μου πρόσφεραν τίποτα δεν θα ήταν εφικτό.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	8
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
1.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ	9
1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>VITIS</i>	9
1.3 ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ	10
1.4 ΙΣΤΟΡΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ	13
1.5 ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ	14
1.5.1 Φαινολικές Ενώσεις στο φυτό <i>Vitis vinifera</i>	14
1.5.2 Αντιοξειδωτική ικανότητα	16
1.5.3 Αντιοξειδωτική ικανότητα στο φυτό <i>Vitis vinifera</i>	17
1.6 ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ ΥΨΗΛΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ.....	18
1.6.1 Εκχύλιση με υπερήχους (UAE).....	19
1.6.2 Εκχύλιση υποβοηθούμενη υπό πίεση (PELE).....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
2.0 ΥΛΙΚΑ-ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	21
2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ (UAE).....	22
2.2 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	23
2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PELE).....	24
2.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΥΔΡΟ-ΓΛΥΚΕΡΙΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	25
2.5 ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΥΔΡΟ-ΓΛΥΚΕΡΙΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ	26
2.5.1 Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	26
2.5.2 Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διφαιτυλο-2-πικρυλο-υδράζυλο ελεύθερης ρίζας DPPH*	27
2.5.3 Προσδιορισμός του συνολικού περιεχομένου φλαβονοειδών με τη μέθοδο $AlCl_3$ (TFC)	29
2.5.4 Προσδιορισμός της αναγωγικής ικανότητας με τη βοήθεια της μεθόδου FRAP	30
2.6 ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ MICROPLATE READER	31

2.6.1 Υπολογισμός του ολικού φαινολικού φορτίου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	31
2.6.2 Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασιζόμενη στη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH*	32
2.6.3 Προσδιορισμός του συνολικού περιεχομένου φλαβονοειδών με τη μέθοδο AlCl ₃ (TFC)	33
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	34
3.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ.....	34
3.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ (TRC) ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (UAE) ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PELE)	35
3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ (TFC) ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (UAE) ΚΑΙ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PELE).....	37
3.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ-ΑΝΤΙΡΙΖΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (UAE) ΚΑΙ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PELE) ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ της ΜΕΘΟΔΟΥ DPPH'	39
3.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ – ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΣΧΥΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (UAE) ΚΑΙ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PELE) ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ της ΜΕΘΟΔΟΥ FRAP	42
3.6 ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ FOLIN–CIOCALTEU (TRC), DPPH* (TAC), FRAP ΚΑΙ AlCl ₃ (TFC)	44
3.7 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ PELE.....	45
4. ΜΕΛΕΤΗ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΝΕΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΦΥΛΛΩΝ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ	50
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	50
4.2 ΑΝΑΓΚΕΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗ-ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ.....	51
4.3 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΣ	52
4.4 ΑΝΑΛΥΣΗ SWOT	54
4.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΓΟΡΑΣ	55
4.5.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ-ΑΓΟΡΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	55
4.5.2 ΑΓΟΡΑ-ΣΤΟΧΟΣ	56
4.5.3 ΠΡΟΦΙΛ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗ- TARGET GROUP	57
4.5.4 ΚΑΝΑΛΙΑ ΔΙΑΝΟΜΗΣ-ΠΩΛΗΣΗΣ.....	57
4.6 ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	58
4.6.1 ΠΗΓΕΣ ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ.....	58
4.6.2 ΚΕΦΑΛΑΙΑΚΕΣ ΑΝΑΓΚΕΣ.....	58
4.6.3 ΚΟΣΤΟΣ ΚΑΙ ΜΙΚΤΟ ΠΕΡΙΘΩΡΙΟ ΚΕΡΔΟΥΣ	59

4.6.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΕΚΡΟΥ ΣΗΜΕΙΟΥ	59
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αμπέλι ή αλλιώς *Vitis vinifera* L., σήμερα αποτελεί μία από τις κυριότερες εμπορεύσιμες πρώτες ύλες ανά τον κόσμο κυρίως για τον καρπό, το σταφύλι. Τα φύλλα του φυτού τα τελευταία χρόνια έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον για την πλούσια περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις. Στη παρούσα εργασία, μελετήθηκαν τα φύλλα του φυτού *Vitis vinifera* L. και συγκεκριμένα της λευκής ποικιλίας Αθήρι με προέλευση το νησί Σαντορίνη. Πραγματοποιήθηκε εφαρμογή τεχνικών εκχύλισης υψηλής ενέργειας για την παραλαβή εκχυλισμάτων από τα φύλλα της αμπέλου. Για την εκχύλιση με υπερήχους (UAE) χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές αναλογίες διαλυτών H_2O και μεθανόλης. Για την εκχύλιση υποβοηθούμενη υπό πίεση (PELE) χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές αναλογίες διαλυτών H_2O και γλυκερόλης. Ακολούθως μετρήθηκε η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε ολικά φαινολικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, φλαβονοειδή με τη μέθοδο $AlCl_3$ και προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική και αντιριζική τους ικανότητα με τις μεθόδους FRAP και DPPH αντίστοιχα. Τα εκχυλίσματα από φύλλα της αμπέλου τα οποία έδειξαν να έχουν τα βέλτιστα αποτελέσματα σε περιεκτικότητα ολικών φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών και αντιοξειδωτικής-αντιριζικής ικανότητας είναι τα: H_2O (PELE), H_2O -MeOH 1:1 (UAE) και H_2O -MeOH 1:4 (UAE). Τα αποτελέσματα αυτά, μπορούν να αξιοποιηθούν από εταιρία καλλυντικών προϊόντων φυσικής προέλευσης με σκοπό τον σχεδιασμό ενός καινοτόμου προϊόντος το οποίο θα περιέχει εκχυλίσματα από φύλλα της ποικιλίας Αθήρι. Η ενσωμάτωση εκχυλισμάτων από φύλλα της αμπέλου σε νέα φυσικά προϊόντα ομορφιάς επιδιώκει να ενισχύσει την πρόληψη της πρόωρης γήρανσης συγχρόνως με την αντιηλιακή προστασία χάρις την μεγάλη περιεκτικότητά των εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδή συστατικά.

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- i. Παραλαβή εκχυλισμάτων από τα φύλλα του φυτού *Vitis vinifera* με εφαρμογή μη συμβατικών τεχνικών εκχύλισης υψηλής ενέργειας και χρήση διαφορετικών διαλυτών.
- ii. Σύγκριση εκχυλισμάτων ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση.
- iii. Μέτρηση των ολικών φαιολικών, φλαβονοειδών, αντιριζικής και αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων.
- iv. Έλεγχος σταθερότητας εκχυλισμάτων που έχουν προέλθει μέσω εκχύλισης υποβοηθούμενης υπό πίεση (PELE).
- v. Προκαταρκτική μελέτη σκοπιμότητας για τη χρήση των βέλτιστων εκχυλισμάτων σε νέα καινοτόμα καλλυντικά προϊόντα φυσικής προέλευσης.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ

Το αμπέλι αποτελεί ένα γένος από περίπου 60 είδη φυτών που ανήκουν στην οικογένεια Vitaceae. Το είδος *Vitis vinifera* L. ή διαφορετικά η «Άμπελος η οينوφόρος» πρωτοεμφανίστηκε πριν αρκετούς αιώνες π.Χ. όπως αποδεικνύεται από τα απολιθώματα που έχουν βρεθεί. Πριν την εποχή των παγετώνων, η καλλιέργεια του αμπελιού κατανεμόταν κυρίως στην Ισλανδία, στη βόρεια Ευρώπη και στη βορειοδυτική Ασία. Με το πέρασμα των χρόνων η καλλιέργεια του μεταφέρθηκε στις πιο θερμές ζώνες του πλανήτη, όπως η κεντρική και ανατολική Ασία, την Περσία, τη Μεσοποταμία, το Αιγαίο, τη Συρία, τη Αίγυπτο, την κεντρική και νότια Ευρώπη, αλλά και η ευρύτερη περιοχή του νότιου Καυκάσου (Terral et al. 2010). Η εξάπλωση της καλλιέργειας του αμπελιού στη γεωγραφική περιοχή μεταξύ της Μαύρης θάλασσας και του Ιράν υπολογίζεται κατά την 7^η με 4^η χιλιετία π.Χ.. Η καλλιέργεια των αμπελιών και η παραγωγή του οίνου στην αρχαία Ελλάδα άρχισε περίπου το 1600 με 1400 π.Χ.. Για τους αρχαίους Έλληνες το κρασί έπαιξε σημαντικό ρόλο, τόσο ως εμπόρευμα, όσο και ως διατροφικό αγαθό καθώς τους άρεσε να τιμούν τον Δίονυσο, θεό του κρασιού όπως τον αποκαλούσαν. Τον 15^ο αιώνα π.Χ. η καλλιέργεια του αμπελιού έχει εξαπλωθεί σε όλη την Ελλάδα (Τζίτζι και Κυπαρίσσου, 2015). Η εξέλιξη της εμπορικής δραστηριότητας της αμπελοκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε από την αρχαία Ελλάδα. Η τέχνη της ελληνικής οινοποιίας αφομοιώθηκε από τους ντόπιους Ιταλούς, οι οποίοι άρχισαν να κάνουν εμπόριο κρασιού σε όλη τη Μεσόγειο και στη βόρεια Αφρική. Η περαιτέρω εξάπλωση της τέχνης του αμπελιού προς την Ισπανία οφείλεται στους Φοίνικες οι οποίοι κατέχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην καθιέρωση της καλλιέργειας του αμπελιού κατά την τελευταία χιλιετία π.Χ. (Terral et al. 2010).

Οι φυλές στα βόρεια των Άλπεων αποθήκευαν τον οίνο σε ξύλινο βαρέλι και χρησιμοποιούσαν ευρέως την μέθοδο της παλαίωσης του οίνου. Πριν το γέμισμα και την αποθήκευση του κρασιού στα βαρέλια, τα κάπνιζαν με αρωματικά φυτά. Η διαδικασία αυτή υιοθετήθηκε από όλες τις γύρω περιοχές της Ευρώπης. Κατά τον 1^ο αιώνα, οι Ρωμαίοι ήταν αυτοί οι οποίοι ανακάλυψαν το φυσικό γυαλί και το έκλειναν με φελλό. Την τότε εποχή άνθισε πάρα πολύ η οινοποιία στην Ιταλία, στην Ισπανία αλλά και στην Γαλλία. Οι πόλεις Μπορντώ και Βουργουνδία της Γαλλίας παρήγαγαν εκλεκτούς οίνους με μακρόχρονη παλαίωση. Τελικά γύρω στο 1500 με 1800 μ.Χ., από την Ισπανία και την Πορτογαλία η αμπελοκαλλιέργεια και η οινοποιία εξαπλώθηκε στις τότε «νέες χώρες» όπως η Βόρεια και Νότια Αμερική, Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία και Αφρική (Τζίτζι και Κυπαρίσσου, 2015).

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *VITIS*

Η άμπελος καλλιεργείται σε περισσότερα από 10 εκατομμύρια εκτάρια ανά τον κόσμο. Η καλλιέργειά της μπορεί να επιτευχθεί σε μεγάλο εύρος κλίματος και είδους εδαφών ώστε να έχει αρκετά μεγάλη απόδοση σε καρπό (Alleweldt et al. 1988). Το αμπέλι έχει ιδιαίτερη μορφή θάμνου και έχει δυνατότητα αναρρίχησης όταν του προσφέρεται υποστηρικτικό μέσο. Κατά την ανάπτυξη του αμπελιού, δημιουργούνται πολλαπλές διακλαδώσεις, βραχίονες και βλαστάρια. Με την πάροδο του χρόνου οι βλαστοί γίνονται ξυλώδεις βραχίονες και

ονομάζονται κληματόβεργες. Οι κληματόβεργες χρησιμεύουν στον πολλαπλασιασμό των κλιμάτων με μόσχευμα ή με εμβολιασμό. Ο καρπός του αμπελιού είναι το σταφύλι και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε γλυκά, στην παραγωγή σταφίδας, κρασιού και άλλων αλκοολούχων ποτών. Τα φύλλα του χρησιμοποιούνται και στη μαγειρική.

Σύμφωνα με τον διεθνή κατάλογο του γένους *Vitis* (*Vitis Variety International Catalogue*), το αμπέλι συγκαταλέγεται στα αγγειόσπερμα φυτά. Ανήκει στην τάξη των Rhamnales (Ραμνωδών) και στην γνωστή οικογένεια των Vitaceae (Αμπελοειδών). Ακολούθως, το γένος *Vitis* περιλαμβάνει δύο υπογένη τα *Muscadinia* και *Euvitis*. Η παρούσα εργασία εστιάζει στο φυτικό είδος *Vitis vinifera* L. που ανήκει στα φυτά *Euvitis*. Σήμερα, το γένος *Vitis* περιλαμβάνει περισσότερα από 500 είδη αλλά μόνο τα 79 έχουν εγκριθεί επίσημα. Τα κυριότερα φυτικά είδη του αμπελιού αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1.2.1 Τα κυριότερα φυτικά είδη του γένους *Vitis Euvitis* και οι περιοχές που καλλιεργούνται.

Φυτικό είδος	Περιοχή-Ζώνη που εντοπίζεται
<i>Vitis aestivalis</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis berlandieri</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis californica</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis candidans</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis champinii</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis cinerea</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis cordifolia</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis doaniana</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis girdiana</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis labrusca</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis longii</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis monticola</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis riparia</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis rufotomentosa</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis rupestris</i>	Νότια Αμερική
<i>Vitis amurensis</i>	Ανατολική Ασία
<i>Vitis coignetiae</i>	Ανατολική Ασία
<i>Vitis thunbergii</i>	Ανατολική Ασία
<i>Vitis vinifera subsp. sylvestris</i>	Ευρώπη
<i>Vitis vinifera subsp. vinifera</i>	Ευρώπη

1.3 ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΣΤΑΦΥΛΙΩΝ

Όλες οι εμπορεύσιμες ποικιλίες του αμπελιού ανήκουν στην οικογένεια *Vitaceae* και στο γένος *Vitis*. Όπως προαναφέρθηκε, το γένος *Vitis* περιλαμβάνει δύο υπογένη *Muscadinia* και *Euvitis*. Πολλά από τα φυτά του γένους *Vitis* παρουσίαζαν δυσκολίες τόσο στην καλλιέργεια τους όσο και αντίσταση σε διάφορες ασθένειες που θα μπορούσαν να τα επηρεάσουν. Επομένως, υπήρχε ανάγκη καλλιέργειας του φυτού και σε περιοχές όπου οι καιρικές και οι εδαφολογικές συνθήκες είναι ιδιαίτερα δύσκολες αλλά και δημιουργίας φυτών που να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στους παθογόνους μικροοργανισμούς (Alleweldt et al. 1988). Με την τεχνική του υβριδισμού κατάφεραν με επιτυχία να διασταυρώσουν αμπέλια διαφορετικού είδους μεταξύ τους και να παραχθούν φυτά τα οποία έχουν γενετικά

χαρακτηριστικά από τους γονείς τους. Χάρης τα υβρίδια της αμπέλου, η καλλιέργεια της επεκτάθηκε σε περιοχές που πριν δεν ήταν ευνοϊκές, σε έντονη υγρασία, σε πολύ χαμηλές ή πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον, το αμπέλι πολλαπλασιάστηκε και διευρύνθηκε στο κόσμο χάρις τη μέθοδο του εμβολιασμού, όπου το ένριζο και το καρποφόρο τμήμα του φυτού ανήκουν σε διαφορετικά είδη αλλά στο ίδιο γένος. Η τεχνική αυτή είναι γνωστή και ως μπόλιασμα και χρησιμοποιείται στη γεωργία από πολύ παλιά (Τζίτζι και Κυπαρίσσου, 2015). Σήμερα, υπάρχουν περισσότερες από 10.000 ποικιλίες σε ολόκληρο τον κόσμο (Alleweldt et al. 1988), όπου οι πιο γνωστές από αυτές θα αναφερθούν στη συνέχεια. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε φυτικό υπόστρωμα *Vitis vinifera* λευκής ποικιλίας Αθήρι, όπου προήλθε από τη Σαντορίνη.

Ελληνικές ποικιλίες:

1. Αγιωργίτικο: Καλλιεργείται κυρίως στο νομό Κορινθίας και αποτελεί την ποικιλία της ζώνης της Νεμέας. Από την ποικιλία φτιάχνονται ροζέ και ερυθρά κρασιά, ξηρά, ημίγλυκα και γλυκά.
2. Κοτσιφάλι: Ερυθρή κρητική ποικιλία που καλλιεργείται στην αμπελουργική ζώνη των Πεζών και των Αρχανών.
3. Λημιό: Ελληνική ποικιλία που πιστεύεται ότι προήλθε από τη «Λίμνη σταφυλή». Ο Ησίοδος και ο Αριστοτέλης αναφέρουν ότι η ποικιλία καλλιεργείτο στην αρχαία Ελλάδα. Σήμερα βρίσκεται στη βορειοανατολική Ελλάδα, τη Χαλκιδική, τη Λήμνο και τις Σποράδες.
4. Λιάτικο: Ερυθρή κρητική ποικιλία που προτιμάται στη παραγωγή γλυκών οίνων. Παράγονται ξηροί και γλυκοί οίνοι στη ζώνη Σητεία και Δαφνές.
5. Μαντηλαριά: Ερυθρή ποικιλία που ξεκίνησε από τα νησιά του Αιγαίου και σήμερα καλλιεργείται σχεδόν σε όλη την Ελλάδα.
6. Μαυροδάφνη: Ερυθρή ποικιλία που εντοπίζεται κυρίως στην Πελοπόννησο και στα νησιά του Ιονίου. Σε συνδυασμό με την Κορινθιακή σταφίδα φτιάχνεται το πολύ γνωστό κρασί Μαυροδάφνη.
7. Μοσχοφίλερο: Αποτελεί μια ημιαρωματική γκρι ποικιλία που εντοπίζεται στην Πελοπόννησο, αλλά και στα νησιά του Ιονίου. Παρόλο που το σταφύλι έχει ερυθρωπό χρώμα, το κρασί που παράγεται είναι λευκό.
8. Ξινόμαυρο: Διαφορετική ονομασία για τη ποικιλία είναι «Το Κόκκινο του Βορρά». Αποτελεί ερυθρή ποικιλία της Βόρειας Ελλάδας.
9. Ασύρτικο: Αποτελεί μια εκλεκτή λευκή ποικιλία, ίσως τη καλύτερη λευκή ελληνική ποικιλία. Αν και ξεκίνησε να καλλιεργείται από τις Κυκλάδες και κυρίως στη Σαντορίνη, σήμερα εντοπίζεται σε όλη την Ελλάδα. Στη Σαντορίνη το κρασί αποτελεί μια εντελώς μοναδική έκφραση αυτής της ποικιλίας που δεν συναντάς σε κανένα άλλο τόπο καλλιέργειάς της.
10. Αθήρι: Αποτελεί μια λευκή αιγαιοπελαγίτικη ποικιλία, που εντοπίζεται στα νησιά των Κυκλάδων και τα Δωδεκάνησα αλλά και σε άλλους νομούς της Ελλάδας.
11. Βηλάνα: Λευκή κρητική ποικιλία που εντοπίζεται στην αμπελουργική ζώνη των Πεζών και της Σητείας.
12. Μαλαγουζιά: Λευκή ποικιλία που προήλθε από την Αιτωλοακαρνανία. Σήμερα καλλιεργείται στη Χαλκιδική, Θεσσαλονίκη, Αιτωλοακαρνανία, Φθιώτιδα, Αττική και Πελοπόννησο.
13. Μονεμβασιά: Αποτελεί λευκή ποικιλία που καλλιεργείται κυρίως στις Κυκλάδες, την Εύβοια και την Πελοπόννησο. Η ποικιλία είναι γνωστή από τον 13^ο αιώνα μ.Χ. και το

όνομα της οφείλεται στο κάστρο της Μονεμβασιάς στη Πελοπόννησο ή στο κάστρο Μαλεβιζίου στην Κρήτη. Στη εποχή του Μεσαίωνα ήταν από τις κυριότερες ποικιλίες, όπου το κρασί της αποτελούσε κύριο εξαγωγικό προϊόν από την Κωνσταντινούπολη μέχρι την Ιταλία και την Γαλλία.

14. Μοσχάτο λευκό και Μοσχάτο Αλεξάνδρειας: Λευκές αρωματικές ποικιλίες που καλλιεργούνται τόσο στην Ελλάδα αλλά και σε ολόκληρο τον κόσμο.
15. Ντεμπίνα: Πρόκειται για μια λευκή ποικιλία που καλλιεργείται στην Ήπειρο.
16. Ροδίτης: Αποτελεί μια λευκή ποικιλία και γκρι ποικιλία από τις πιο παλιές στην Ελλάδα. Συνδυάζεται με το Σαββατιανό και φτιάχνει τη γνωστή ρετσίνα.
17. Ρομπόλα: Λευκή ποικιλία που αρχικά καλλιεργείτο στα Ιόνια νησιά. Σήμερα εντοπίζεται στην Πελοπόννησο και στην Στερεά Ελλάδα.
18. Σαββατιανό: Αποτελεί μια λευκή ποικιλία που καλλιεργείται στην Αττική, στην Εύβοια, τη Βοιωτία αλλά και στην Πελοπόννησο, την Μακεδονία και την Κρήτη. Μαζί με τον ροδίτη φτιάχνεται η γνωστή ρετσίνα, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω.

Διεθνείς ποικιλίες:

1. Cabernet Franc: Πρόκειται για μια ερυθρή ποικιλία της Νότιας Γαλλίας, που αναμυγνίζεται με το Cabernet Sauvignon και το Merlot για τη παρασκευή άλλων οίνων στην περιοχή Bordeaux. Σήμερα εντοπίζεται σε πολλά μέρη του κόσμου ενώ στην Ελλάδα εντοπίζεται στη Μακεδονία, την Ήπειρο, την Πελοπόννησο, την Αττική, τη Βοιωτία και αλλού.
2. Cabernet Sauvignon: Ερυθρή ποικιλία της Νότιας Γαλλίας που σήμερα καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο. Στην Ελλάδα καλλιεργείται εύκολα παντού και χρησιμοποιείται για την παραγωγή άλλων οίνων.
3. Carignan: Αποτελεί ερυθρή ποικιλία ισπανικής προέλευσης που καλλιεργείται σε μεγάλη έκταση στη νοτιοανατολική Γαλλία. Στην Ελλάδα εντοπίζεται στην Κρήτη, στη Στερεά Ελλάδα, στη Ήπειρο και τη Θράκη.
4. Gewurztraminer: Ερυθρωπή ποικιλία της Αλσατίας που χρησιμοποιείται για την παραγωγή γλυκών λευκών κρασιών. Εντοπίζεται στη Γερμανία, στην Αυστρία, στην Ελβετία, στη Βόρεια Γαλλία καθώς επίσης και στη Βόρεια Ιταλία.
5. Merlot: Η ποικιλία προέρχεται από τη Γαλλία. Σήμερα εντοπίζεται σε ολόκληρο τον κόσμο αλλά και στην Ελλάδα. Στην Ελλάδα καλλιεργείται σχεδόν παντού με μεγάλη ευκολία.
6. Syrah: Αποτελεί γαλλική ερυθρή ποικιλία με προέλευση το Ροδανό ποταμό και επεκτάθηκε σε ολόκληρο τον πλανήτη. Στην Ελλάδα καλλιεργείται στη Θεσσαλία, στην στερεά, στη Μακεδονία, στη Θράκη, στα Δωδεκάνησα, στην Κρήτη και στην Πελοπόννησο. Στην Αυστραλία, στον Καναδά και τη Νότια Αφρική εντοπίζεται με το όνομα Shiraz.
7. Pinot Noir: Ερυθρή ποικιλία που καλλιεργείται σε όλο τον κόσμο, χαρακτηρίζει όμως κυρίως την περιοχή της Βουργουνδίας στη Γαλλία. Στη Βουργουνδία, η ποικιλία υπάρχει πάνω από 2000 χρόνια. Στην Ελλάδα καλλιεργείται στην Πελοπόννησο και στη Μακεδονία.
8. Sangiovese: Ιταλική ερυθρή ποικιλία, η κυριότερη της Τοσκάνης, από την οποία παράγεται το γνωστό Chianti. Στην Ελλάδα εντοπίζεται στη Μακεδονία, τη Θεσσαλία, την Πελοπόννησο, την Αττική και την Κρήτη.
9. Chardonnay: Ακόμα μία λευκή ποικιλία από την Βουργουνδία της Γαλλίας και αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες στο κόσμο. Εμφανίζει γενετική συγγένεια

με την ποικιλία Pinot Noir. Ανάλογα με τον τόπο που καλλιεργείται μπορεί να δώσει διαφορετικά είδη κρασιών. Στην Ελλάδα εντοπίζεται παντού με πολύ καλά αποτελέσματα.

Ο τρόπος αμπελοκαλλιέργειας στη Σαντορίνη είναι μοναδικός στο κόσμο όσο μοναδικό είναι και το νησί από κάθε άποψη. Τα αμπέλια κλαδεύονται σε σχήμα καλαθιού στο οποίο ο καρπός να βρίσκεται στην εσωτερική μεριά και τα φύλλα να βρίσκονται εξωτερικά. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η προστασία των καρπών από την έντονη ακτινοβολία του ήλιου και από τους δυνατούς ανέμους. Σύμφωνα με την διανθή βιβλιογραφία, όσο περισσότερο εκτίθενται τα φύλλα στην ηλιακή ακτινοβολία τόσο αυξάνει η περιεκτικότητα τους σε δευτερογενής μεταβολίτες όπως είναι οι φαινολικές ενώσεις ως ένας αμυντικός μηχανισμός της φυσιολογίας του φυτού για να παρέχει προστασία στα διάφορα κυτταρικά μακρομόρια που βρίσκονται στα φυτικά κύτταρα (Teixeira et al. 2014). Επιπλέον, τα αμπέλια στη Σαντορίνη δεν αρδεύονται καθώς απορροφούν νερό παρά μόνο μέσω των ελάχιστων βροχοπτώσεων κατά τους χειμερινούς και ανοιξιάτικους μήνες και μέσω της θαλασσινής υγρασίας που επικρατεί κατά την νύχτα και συγκρατείται στο έδαφος. Το γεγονός αυτό εντείνει την μοναδικότητα που έχουν οι αμπελοκαλλιέργειες στο κυκλαδίτικο νησί. Οι ιδιαίτερες καιρικές συνθήκες που επικρατούν στο νησί και η ιδιαιτερότητα του ηφαιστιογενούς εδάφους εμποδίζουν την εμφάνιση μυκητολογικών ασθενειών καθώς και την ανάπτυξη βλαβερών εντόμων που εντοπίζονται σχεδόν σε όλες τις υπόλοιπες περιοχές του κόσμου. Επομένως οι συνθήκες αυτές της Σαντορίνης παράγουν αμπέλια υψηλής ποιότητας με πολύ καλές συνθήκες υγιεινής.

1.4 ΙΣΤΟΡΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ

Ο Ιπποκράτης αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές υπάρξεις στην ιστορία της Ιατρικής, καθώς αναδείχθηκε ως «πατέρας» της σύγχρονης Δυτικής ιατρικής. Γεννήθηκε το 460 π.Χ. και έζησε στη Κω, όμως απεβίωσε στη Λάρισα το 377 π.Χ.. Ο Ιπποκράτης ήταν ο αρχαίος Έλληνας ιατρός που κατάφερε να θεμελιώσει την ορθολογική ιατρική, απαλλάσσοντας την από προκαταλήψεις και μεταφυσικά στοιχεία της τότε εποχής. Πίστευε, ότι αν ο ανθρώπινος οργανισμός παρουσιάσει οποιαδήποτε έλλειψη σε φαγητό και άσκηση, τότε θα υποκύψει σε αρρώστιες (Norrie, 2003).

Ο Ιπποκράτης χρησιμοποιούσε εκτενώς το κρασί πάνω σε πληγές, ως αντιπυρετικό μέσο, ως υπακτικό μέσο, ως διουρητικό μέσο αλλά και ως θρεπτικό ποτό. Είχε διαχωρίσει τα διάφορα είδη κρασιών, περιγράφοντας την ορθή χρήση τους, τις επιδράσεις τους στον οργανισμό και πότε πρέπει να αποφεύγεται. Στις ανοικτές πληγές ή σε τραύματα, εφαρμόζε απευθείας πανί εμποτισμένο σε κρασί ώστε να τα καθαρίσει από το αίμα και για να αποφύγει τις πιθανές επιμολύνσεις. Πίστευε ότι τόσο οι πολυφαινόλες όσο και η αλκοόλη δρουν ως αντισηπτικές ουσίες. Είχε κατατάξει τα νέα λευκά και όξινα κρασιά ως διουρητικά, ενώ τα κρασιά πλούσια σε τανίνες παρεμποδιστές της διούρησης. Ακόμα, θεωρούσε ότι δίνοντας στα μικρά παιδιά ζεστό κρασί αραιωμένο σε νερό, θα βοηθούσε στην αποφυγή εμφάνισης σπασμών αλλά και στο να μεγαλώσουν σωστά με δυνατό οργανισμό (Norrie, 2003).

Πιο συγκεκριμένα, ο Ιπποκράτης θεωρούσε ότι τα διάφορα μέρη του αμπελιού έχουν ευεργετικές ιδιότητες για διαφορετικές παθήσεις. Για παράδειγμα, το άνθος της αμπέλου βοηθούσε τη θεραπεία της διάρροιας, τον καθαρισμό τραυμάτων και διάφορα γυναικολογικά

προβλήματα. Σύμφωνα με τον Ιπποκράτη, η άγουρη ρώγα του σταφυλιού δρούσε ως αιμοστατικό, μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικά σκευάσματα γυναικολογικών παθήσεων. Η σταφίδα ή αλλιώς ο καρπός της αμπέλου δρούσε ως καθαρικό της μήτρας, δυναμωτικό του οργανισμού και ως αντιφλεγμονώδες. Τα στέμφυλα, δηλαδή ο φλοιός των σταφυλιών χρησιμοποιήθηκε εκτενώς από τον Ιπποκράτη ως αντιπυρετικό μέσο (Norrie, 2003).

1.5 ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

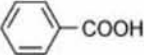
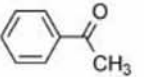
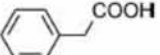
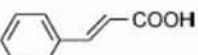
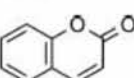
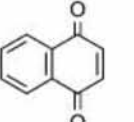
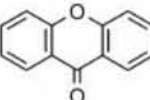
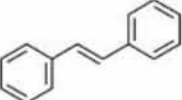
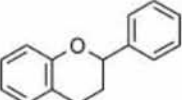
Το αμπέλι ή αλλιώς *Vitis vinifera*, σήμερα αποτελεί μία από τις κυριότερες εμπορεύσιμες πρώτες ύλες ανά τον κόσμο κυρίως για τον καρπό, το σταφύλι. Κάθε χρόνο παράγονται περισσότεροι από 60 εκατομμύρια τόνοι παγκοσμίως, που προορίζονται τόσο για άμεση κατανάλωση του φρούτου και του χυμού, όσο και για την παραγωγή οίνου (Teixeira et al. 2014). Η παραγωγή οίνου όμως συνεπάγεται με τεράστιες ποσότητες υποπροϊόντων κυρίως οργανικά απόβλητα, λύματα, βλαβερά αέρια και ανόργανα υπολείμματα. Έτσι, η αυξανόμενη ζήτηση σε βιομηχανικές παραγωγές φιλικές προς το περιβάλλον σε συνδυασμό με την ελαχιστοποίηση του κόστους επεξεργασίας των υποπροϊόντων κατά την παραγωγή κρασιού, οδήγησε στην ανάπτυξη καινοτόμων διαδικασιών με σκοπό την ανακύκλωση και ανάκτηση των θρεπτικών και βιοδραστικών ουσιών προς χρησιμοποίησή τους στους τομείς των τροφίμων, των φαρμάκων και της κοσμετολογίας (Teixeira et al. 2014).

Εν συνεχεία, το σταφύλι, το κρασί και τα στέμφυλα μελετήθηκαν εκτενώς προκειμένου να εντοπιστούν δυνητικές χρήσεις τους σε άλλους τομείς. Εκτός από αυτά, τις τελευταίες δεκαετίες παρουσιάστηκε ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον για τα φύλλα του *Vitis vinifera*, τα οποία περιλαμβάνονται στα αναξιόπιστα υποπροϊόντα της βιομηχανικής παραγωγής οίνου (Fernandes et al. 2013). Από την εποχή της αρχαιότητας τα φύλλα της αμπέλου χρησιμοποιούνταν στην ιατρική χάρης την βιολογική τους δραστηριότητα ως ηπατοπροστατευτικά, σπασμολυτικά αλλά και χάρης την αντιβακτηριδιακή, αντιική, αντιμυκητιακή, αντιφλεγμονώδη, αντισηπτική, αγγειοδιασταλτική τους δράση καθώς και για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Δεν είναι καθόλου τυχαίο το γεγονός ότι τα φύλλα του *Vitis vinifera* εμφανίζουν τόσο μεγάλη βιοδραστικότητα καθώς έχουν πλούσιο βιολογικό περιεχόμενο. Οι περισσότερες από τις θεραπευτικές ιδιότητες του φυτού οφείλονται στις φαινολικές ενώσεις, οι οποίες απασχολούν πολλές επιστημονικές μελέτες λόγω της μεγάλης αντιοξειδωτικής ικανότητας που παρουσιάζουν και το καθιστούν ως μια πολύ υποσχόμενη πηγή βιοδραστικών ενώσεων (Xia et al. 2013).

1.5.1 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΦΥΤΟ *VITIS VINIFERA*

Η υγεία και η διατροφή συνδέονται άμεσα εδώ και πάρα πολλά χρόνια, γεγονός που ώθησε την έρευνα να στραφεί προς τα βιοδραστικά φυτοχημικά συστατικά που περιέχονται στις φυτικές κυρίως τροφές και προσδίδουν σημαντικά οφέλη στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι βιοδραστικές φυτοχημικές ενώσεις είναι δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι παράγονται από τα φυτά κάτω από συνθήκες stress όπως για παράδειγμα έκθεση σε UV ακτινοβολία και λέγονται φαινολικές ενώσεις (Teixeira et al. 2014). Οι φαινολικές ενώσεις έχουν τουλάχιστον

ένα αρωματικό δακτύλιο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια συνδεδεμένα και μπορεί να είναι πολύ απλά μόρια χαμηλού μοριακού βάρους έως μεγάλα με περίπλοκη χημική δομή μόρια (Crozier et al. 2009). Κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τον αριθμό και τη διάταξη των ατόμων άνθρακα που υπάρχουν στο μόριο τους και συνήθως εντοπίζονται δεσμευμένα σε άλλα σάκχαρα ή οργανικά οξέα. Οι πολυφαινόλες που έχουν εντοπιστεί στα φύλλα του φυτού *Vitis vinifera* σε σημαντική περιεκτικότητα ανήκουν στις εξής κατηγορίες: φαινολικά οξέα, στιλβένια και φλαβονοειδή (Katalinic et al. 2013, Dresch et al. 2014, Monagas et al. 2006).

Αριθμός ατόμων C	Κατηγορία	Βασική δομή
C ₆ -C ₁	Φαινολικά οξέα	
C ₆ -C ₂	Ακετοφαινόλες	
C ₆ -C ₂	Φαινυλοξικά οξέα	
C ₆ -C ₃	Υδροξυκιναμμωμικά οξέα	
C ₆ -C ₃	Κουμαρίνες	
C ₆ -C ₄	Ναφθοκινόνες	
C ₆ -C ₁ -C ₆	Ξανθόνες	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Στιλβένια	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Φλαβονοειδή	

Εικόνα 1. Κατηγοριοποίηση φαινολικών ενώσεων σύμφωνα με την δομή του ανθρακικού σκελετού (Crozier et al. 2009)

Τα φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία οργανικών ενώσεων που μπορεί να υπάρχουν είτε ως μονομερή είτε πολυμερίζονται αντιδρώντας με άλλα φλαβονοειδή, με σάκχαρα, με μη φλαβονοειδή ή με συνδυασμούς αυτών των ενώσεων. Είναι φαινολικές ενώσεις που συγκροτούνται από 15 άτομα άνθρακα και έχουν δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνδέονται μέσω ενός δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο. Αποτελούν την μεγαλύτερη τάξη των φαινολικών ενώσεων και περιλαμβάνουν φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, προανθοκυανιδίνες και ανθοκυανίνες (Crozier et al. 2009,

Teixeira et al. 2014). Συνήθως εντοπίζονται υδροξύλια στις θέσεις 4', 5' και 7' των αρωματικών δακτυλίων, Πολλές φορές τα φλαβονοειδή συνδέονται με διάφορα σάκχαρα δημιουργώντας γλυκοσίδια. Τόσο τα φαινολικά υδροξύλια όσο και τα σάκχαρα που συνδέονται στους αρωματικούς δακτυλίους αυξάνουν την υδροφιλικότητα των φλαβονοειδών (Crozier et al. 2009). Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή αποτελούν τα πολυφαινολικά οξέα, τα οποία είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος. Τα φαινολικά οξέα ανήκουν στις μη-φλαβονοειδούς ενώσεις. Αυτές οι ενώσεις συχνά παρουσιάζονται σε συζευγμένη μορφή ως γλυκοζυλιωμένα παράγωγα (Teixeira et al. 2014). Το γαλλικό οξύ ανήκει σε αυτή τη τάξη και περιγράφεται ως το πιο άφθονο παράγωγο υδροξυβενζοϊκού οξέως στο σταφύλι. Τα στυλβένια ανήκουν επίσης στις μη-φλαβονοειδούς ενώσεις με δομή που συγκροτείται από 14 άτομα άνθρακα. Παράγονται όταν το φυτό βρίσκεται σε κατάσταση stress, δηλαδή όταν υποστεί τραυματισμό, προσβληθεί από παθογόνο μικροοργανισμό ή ακόμα κάτω από UV ακτινοβολία. Η ρεσβερατρόλη αποτελεί το πιο σημαντικό και χαρακτηριστικό φαινολικό συστατικό της τάξης αυτής και μπορεί να εντοπιστεί σε *trans*- ή *cis*- ισομορφή (Crozier et al. 2009).

1.5.2 ANΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Αντιοξειδωτική ικανότητα ορίζεται ως η ικανότητα κάποιων ενώσεων όταν βρεθούν σε πολύ μικρή συγκέντρωση να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν στον οργανισμό. Τα αντιοξειδωτικά είναι διάφορες ενώσεις ή συστήματα τα οποία καθυστερούν την οξειδωση εμποδίζοντας τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών ή διακόπτοντας την αλυσιδωτή αντίδραση που προκαλούν οι ήδη υπάρχουσες ελεύθερες ρίζες. Μερικοί από τους μηχανισμούς με τους οποίους επιτυγχάνεται η διαδικασία αυτή είναι οι εξής (Brewer 2011):

- Εξουδετέρωση ριζών που επάγουν την οξειδωση
- Δέσμευση μεταλλικών ιόντων έτσι ώστε να μην δημιουργηθούν άλλες ελεύθερες ρίζες και να παρεμποδίσουν την οξειδωση των λιπιδίων
- Εξουδετέρωση των $\cdot\text{O}_2^-$, προλαμβάνοντας τον σχηματισμό υπεροξειδίων

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species - ROS) παράγονται από τον φυσιολογικό μεταβολισμό του οργανισμού ή από άλλους εξωγενείς παράγοντες. Σε γενικές γραμμές, δραστικές αυτές μορφές του οξυγόνου παράγονται κατά τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας, τα προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, τη λιπιδική οξειδωση, την ακτινοβολία, τη φλεγμονή και το κάπνισμα. Πιο συγκεκριμένα, οι ελεύθερες ρίζες προκύπτουν από την διάσπαση ομοιοπολικού δεσμού σε ένα μόριο, την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου ή την απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από μια άλλη ρίζα. Έχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο συνήθως σε άτομο οξυγόνου ή και αζώτου (Devasagayam et al. 2004). Συνεπώς, είναι ιδιαίτερα ηλεκτρονιόφιλες και αντιδρούν άμεσα με κυτταρικά συστατικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης (Brewer 2011).

Φυσιολογικά στον οργανισμό υπάρχει μία ισορροπία μεταξύ παραγωγής ROS και μηχανισμών αποτοξίνωσης. Η αύξηση των οξειδώσεων οδηγεί τα κύτταρα σε μία κατάσταση που λέγεται οξειδωτικό στρες, όρος ο οποίος περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας, ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των ROS και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενός οργανισμού (Sies 1986; Halliwell & Gutteridge 1990). Για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός μας, όπως όλα τα φυτά και τα ζώα, έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος αντιοξειδωτικές ουσίες. Οι μηχανισμοί οι οποίοι βοηθούν τον οργανισμό να εξουδετερώσει τις ελεύθερες ρίζες περιλαμβάνουν διάφορα ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της δισμουτάσης (SOD), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) αλλά και αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) (Devasagayam et al. 2004). Άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι τα καροτενοειδή, φλαβονοειδή, άλλες πολυφαινόλες και η γλουταθειόνη. Ωστόσο, κατά τη φάση του οξειδωτικού στρες οι αμυντικοί μηχανισμοί αποτοξίνωσης του οργανισμού κορεννούνται με αποτέλεσμα να παράγεται μεγάλη ποσότητα υπεροξειδίου και άλλων ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι ικανές να προκαλέσουν βλάβη σε σημαντικά κυτταρικά μακρομόρια με συνεχείς αντιδράσεις οξείδωσης, να επηρεάσουν αρνητικά τις διεργασίες που επιτελούνται στο κύτταρο και να προκαλέσουν ακόμη και κυτταρικό θάνατο. Το γεγονός αυτό αποτελεί πιθανή αιτία διαφόρων ασθενειών στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, καρδιαγγειακά νοσήματα, διαβήτη, επιπλοκές στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και τη γήρανση (Devasagayam et al. 2004).

1.5.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΦΥΤΟ *VITIS VINIFERA*

Η κυριότερη βιολογική δράση που σχετίζεται με τις φαινολικές ενώσεις είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα. Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, η αντιοξειδωτική ικανότητα συνδέεται άμεσα με την υγεία καθώς εμφανίζει θεραπευτικές ιδιότητες αλλά και προλαμβάνει την εμφάνιση ασθενειών. Ο καρπός, τα στέμφυλα αλλά και τα φύλλα του φυτού *Vitis vinifera* εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα φαινολικών ενώσεων, κατά συνέπεια έντονη αντιοξειδωτική ικανότητα (Teixeira et al. 2014). Η λειτουργική ομάδα στην οποία οφείλεται η βιοδραστικότητα των φαινολικών ενώσεων είναι το υδροξύλιο που βρίσκεται στον αρωματικό δακτύλιο. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των υδροξυλίων και η θέση τους πάνω στο δακτύλιο καθορίζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών (Cheynier 2012).

Το ενδιαφέρον των επιστημόνων για τις θετικές συνέπειες των φλαβονοειδών σχετικά με την προστασία του οργανισμού έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων ξεκίνησε από την παρατήρηση που ονομάστηκε «γαλλικό παράδοξο». Η έρευνα των Renaud και Lorggeril (Renaud and Lorggeril 1992) αφορά την συσχέτιση της κατανάλωσης κρασιού από τους Γάλλους με την υγεία του οργανισμού τους. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι παρόλο που η διατροφή τους είναι πλούσια σε λιπαρές ύλες (κορεσμένα λίπη, τυριά, βούτυρο, αλλαντικά, χοιρινό κρέας κτλ.), η συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων είναι αρκετά μικρότερη από αυτήν άλλων λαών με παρόμοια διατροφή. Η διαφορά αυτή αποδίδεται στο γεγονός ότι οι Γάλλοι καταναλώνουν μαζί με την τροφή τους μεγάλες ποσότητες φλαβονοειδών λόγω της αυξημένης κατανάλωσης κρασιού. Η αντιοξειδωτική δράση των βιοφαινολών, που περιέχονται στο κρασί φαίνεται να συμβάλλουν στην προστασία της καρδιάς. Οι φαινολικές ενώσεις μέσω της εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών στον

οργανισμό, προλαμβάνουν την οξειδωση της LDL λιποπρωτεΐνης, την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων αλλά και τις βλάβες στα ερυθροκύτταρα. Ακόμη, δρουν ως αντιμεταλλαξιγόνα, αντιμικροβιακά, αντιφλεγμονώδη στον οργανισμό και συμβάλλουν στην αντιγήρανση (Teixeira et al. 2014).

Σύμφωνα με ερευνητικές μελέτες προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των ολικών φαινολικών ενώσεων στα διάφορα μέρη του *Vitis vinifera* αναμφίβολα δείχνουν πολύ υψηλά επίπεδα (Xia et al. 2013). Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό αυτό όπως για παράδειγμα DPPH, ORAC, ABTS, TBARS και FRAP μέθοδος, όπου η κάθε μία εξυπηρετεί διαφορετικό σκοπό για τη κατανόηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του φυτού (Teixeira et al. 2014; Xia et al. 2013; Fernandes et al. 2013; Monagas et al. 2006; Katalinic et al. 2013). Μια μελέτη προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των ολικών φαινολικών ενώσεων σε φύλλα του *Vitis vinifera* τούρκικων ποικιλιών έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο αυτών μετρήσεων (Orhan et al. 2009), αντίθετα σε άλλη αντίστοιχη μελέτη σε φύλλα του *Vitis vinifera* πορτογαλικών ποικιλιών δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ ολικών φαινολικών ενώσεων και της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Fernandes et al. 2013). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι πιθανόν να επηρεάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα άλλα χημικά μόρια που εντοπίζονται στα φύλλα όπως για παράδειγμα οργανικά οξέα, λιπίδια, ένζυμα, βιταμίνες, καροτενοειδή, τερπένια και σάκχαρα. Επιπλέον, μελέτες που έγιναν πάνω σε στέμφυλα έδειξαν ότι διμερή μόρια φαινολών εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις απλές φαινολικές ενώσεις, και σταθεροποιούνται στη διμερή μορφή με ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου (Xia et al. 2013). Έτσι, η δραστηριότητα ενός δείγματος πιθανόν να οφείλεται σε συνεργιστική δράση ομάδας βιοδραστικών συστατικών παρά ενός μόνο συστατικού.

1.6 ΕΚΧΥΛΙΣΕΙΣ ΥΨΗΛΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ

Η εκχύλιση αποτελεί το πρώτο και σημαντικότερο βήμα κάθε ερευνητικής μελέτης κάποιου φυτού με θεραπευτικές ιδιότητες καθώς παίζει καθοριστικό ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα των εργαστηριακών διεργασιών. Το τελικό αποτέλεσμα καθορίζεται από την επιλογή των συνθηκών δηλαδή του διαλύτη, της θερμοκρασίας, της πίεσης και του χρόνου καθώς επίσης και το μέρος του φυτού που πρόκειται να εκχυλιστεί. Η τεράστια τεχνολογική και ερευνητική πρόοδος ώθησε μεγάλες εταιρείες φαρμακευτικών σκευασμάτων, συμπληρωμάτων και καλλυντικών να στραφούν στις βιοδραστικές ενώσεις από φυσικές πηγές. Οι βιοδραστικές ενώσεις, εντοπίζονται σε διάφορα μέρη του φυτού όπως τα φύλλα, τα στέμφυλα, τα άνθη, οι καρποί και μπορούν να ληφθούν με τη βοήθεια μεγάλης ποικιλίας τεχνικών εκχύλισης. Οι τεχνικές εκχυλίσεων διαχωρίζονται στις συμβατικές και στις μη-συμβατικές μεθόδους (Azmir et al. 2013). Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στις μη-συμβατικές μεθόδους εκχυλίσεων και συγκεκριμένα στις:

- Εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων ή Ultrasound-assisted extraction (UAE)
- Εκχύλιση υποβοηθούμενη υπό πίεση ή Pressurized enhanced liquid extraction (PELE)

Οι μη συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης είναι φιλικές προς το περιβάλλον λόγω της μειωμένης ποσότητας σε κατανάλωση συνθετικών και οργανικών χημικών, μειωμένου συνολικού χρόνου εκχύλισης και της καλύτερης απόδοσης και ποιότητας του τελικού εκχυλίσματος.

Όλες οι τεχνικές εκχύλισης αυτής της κατηγορίας χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκχύλιση και παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων. Ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των μη-συμβατικών μεθόδων εκχύλισης είναι τα εξής (Azmir et al. 2013):

- i. Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από σύνθετα φυτικά υποστρώματα
- ii. Αυξημένη επιλεκτικότητα
- iii. Μεγάλη ευαισθησία
- iv. Μετατροπή των βιοδραστικών ενώσεων σε πιο ανιχνεύσιμες μορφές για να διαχωρίζονται ευκολότερα
- v. Επαναληψιμότητα της μεθόδου ανεξαρτήτως της ποικιλομορφίας του δείγματος

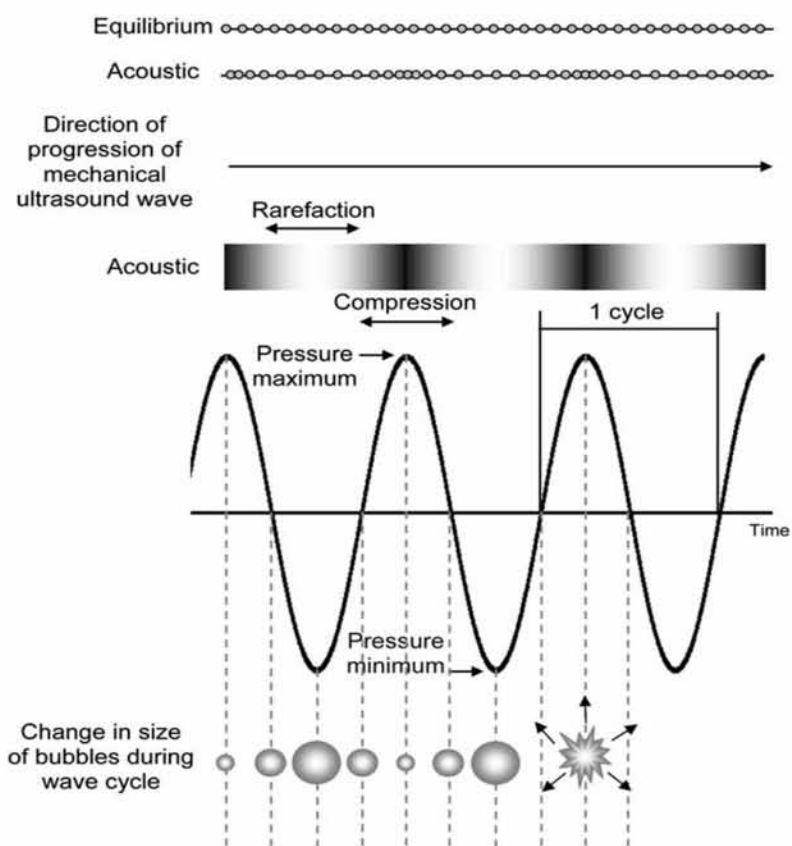
1.6.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ (UAE)

Η μέθοδος εκχύλισης με υπερήχους είναι χρήσιμη για την ανάκτηση μεγάλων ποσοτήτων φαινολικών ενώσεων, αλλά και πρωτεϊνών και λιπιδίων που περιέχονται μέσα στα κύτταρα. Στην εκχύλιση με υπερήχους το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη στη διάταξη των υπερήχων. Οι υπερήχοι είναι ακουστικά κύματα 20 kHz-100 MHz που ξεπερνούν το όριο της ανθρώπινης ακοής. Με τη βοήθεια των υπερήχων προκαλούνται περιοδικά συμπίεσεις και εκτονώσεις που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μικρών φυσαλίδων κενού. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σπηλαιώση και προκαλείται κατά τη επιβολή διαφόρων συχνοτήτων των κυμάτων. Οι μικρές φυσαλίδες, στη συνέχεια καταστρέφονται απελευθερώνοντας ενέργεια σε μορφή θερμότητας και πίεσης (Azmir et al. 2013). Στις περιπτώσεις που εξετάζεται στερεό φυτικό δείγμα, η τεχνική εκχύλισης με υπερήχους διευκολύνει την απελευθέρωση των μορίων που περιέχονται στα φυτικά κύτταρα διαρρηγνύοντας το κυτταρικό τοίχωμα. Πιθανόν, οι υπερήχοι να υποβοηθούν και να επιταχύνουν την πρόσβαση του διαλύτη μέσα στα φυτικά κύτταρα έτσι ώστε να παρασύρει τις βιοδραστικές ενώσεις (Mason et al. 1996). Η απόδοση της μεθόδου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία που αναπτύσσεται στο διάλυμα, η πίεση, η συχνότητα και η διάρκεια των υπερήχων που ασκούνται στο φυτικό δείγμα.

Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η τεχνική εκχύλισης με υπερήχους έναντι άλλων τεχνικών είναι τα εξής (Teixeira et al. 2014; Azmir et al. 2013):

- ✓ Μείωση του χρόνου εκχύλισης
- ✓ Κατανάλωση μικρότερης ποσότητας διαλύτη
- ✓ Επιτυγχάνεται πιο αποδοτική ανάμειξη φυτικού δείγματος στο διαλύτη λόγω της μεγαλύτερης επιφάνειας επαφής που αναπτύσσεται
- ✓ Γρηγορότερη μεταφορά ενέργειας
- ✓ Διατήρηση σχετικά χαμηλής θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της εκχύλισης
- ✓ Εκλεκτικότητα
- ✓ Απλή μέθοδος εκχύλισης

Η τεχνική εκχύλισης με υπερήχους φαίνεται να είναι αρκετά αποτελεσματική στην παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων από φυτικά υποστρώματα. Ακόμα, ανάλογα με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση υπάρχει δυνατότητα παραλαβής διαφορετικών βιοδραστικών ενώσεων με μεγαλύτερη απόδοση. Για παράδειγμα σε υδατικά εκχυλίσματα παραλαμβάνονται πιο αποδοτικά οι ανθοκυανίνες, οι ταννίνες και τα τερπενοειδή, ενώ σε μεθανολικά εκχυλίσματα παραλαμβάνονται, εκτός από τις πιο πάνω, πολυφαινόλες και φλαβόνες (Cowan 1999).



Εικόνα 2. Το φαινόμενο της σπηλαιώσης (Soria & Villamiel 2010)

1.6.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PELE)

Η τεχνική εκχύλισης υποβοηθούμενη υπό πίεση περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Richter το 1996 (Richter et al. 1996). Χρησιμοποιήθηκε ευρέως για την απομάκρυνση διαφόρων περιβαλλοντικών ρύπων από ιζήματα και λυματολάσπες. Σήμερα, η χρήση της έχει επεκταθεί σε άλλους τομείς όπως στις βιολογικές επιστήμες, στις φαρμακευτικές βιομηχανίες και στο τομέα των τροφίμων για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων (Carabias-Martínez et al. 2005). Η μεγάλη επέκταση της μεθόδου στις βιομηχανίες των φαρμάκων και των τροφίμων οφείλεται στην αυτοματοποίηση της καθώς και στην υψηλή απόδοση της.

Η μέθοδος βασίζεται στην εφαρμογή υψηλής πίεσης, τόσης ώστε να μην προσεγγίζει το κρίσιμο σημείο των διαλυτών της (Azmir et al. 2013). Κατά την εφαρμογή της, συνδυάζεται η υψηλή πίεση με υψηλή θερμοκρασία έτσι ώστε ο διαλύτης να διεισδύσει γρήγορα και αποτελεσματικά στο στερεό υπόστρωμα. Οι υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται προκαλούν μείωση του ιξώδους του εκάστοτε διαλύτη αυξάνοντας έτσι την διαλυτότητα του, διευκολύνοντας την επαφή του με το δείγμα. Επομένως, αυξάνεται κατά πολύ η απόδοση της εκχύλισης. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου εκχύλισης υποβοηθούμενης υπό πίεση είναι τα εξής (Carabias-Martínez et al. 2005):

- ✓ Μειωμένη συνολική διάρκεια χρόνου εκχύλισης

- ✓ Εξοικονόμηση διαλύτη λόγω των χαμηλών απαιτούμενων ποσοτήτων
- ✓ Αυτοματοποιημένη μέθοδος
- ✓ Μεγάλη απόδοση

Η μέθοδος πραγματοποιείται σε κύκλους δυναμικής και στατικής φάσης με σκοπό την βελτίωση της αποδοτικότητας της εκχύλισης. Επιπλέον, η χρήση μείγματος διαλυτών χαμηλής και υψηλής πολικότητας παρέχει υψηλότερη απόδοση λόγω της εκχύλισης βιοδραστικών ενώσεων με διαφορετική πολικότητα. Επομένως, υπάρχει περιθώριο τροποποίησης της μεθόδου εκχύλισης ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη επιλεκτικότητα και απόδοση ανάλογα με τις βιοδραστικές ενώσεις-στόχους που ενδιαφέρουν τον κάθε ερευνητή (Carabias-Martínez et al. 2005).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.0 ΥΛΙΚΑ-ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ:

- I. Συσκευή εκχύλισης με υπερήχους Vibra-Cell VCX 750 20 kHz 750 W (Sonics and Materials Inc., Newtown, USA)
- II. Συσκευή λυοφιλίωσης
- III. Συσκευή εκχύλισης TIMATIC (TecnoLab, Italy)
- IV. Φασματοφωτόμετρο UV-VIS διπλής δέσμης τύπου UV-1800 (Shimadzu Europa)
- V. Συσκευή Infinite® 200 PRO NanoQuant Multimode Microplate Reader (Tecan Trading AG)
- VI. Ζυγός ακριβείας (KERN 770)
- VII. Αναδευτήρας (Vortex, VELD Scientifica)
- VIII. Συσκευή μέτρησης pH SevenCompact™, pH/Ion S220 (Mettler Toledo Inc., Switzerland)
- IX. Συσκευή μέτρησης δείκτη διάθλασης (Refractometer) RX-5000^a (ATAGO CO Ltd, Japan)
- X. Συσκευή μέτρησης πυκνότητας DMA 38 (ANTON PAAR GmbH, Austria)
- XI. Συσκευή λυοφιλίωσης LABCONCO (Thermo Electron Corporation, Thermo Fischer, USA)

ΥΛΙΚΑ:

- I. Φυτικό υπόστρωμα: Αποξηραμένα φύλλα *Vitis vinifera* (Σαντορίνη)
- II. Φίλτρα διήθησης: Ashless hardened fine crystalline, circles 70 mm (1-2 μm, 3-5 μm, 8-12 μm, pores size) (K&R, Germany)
- III. Φίλτρα διήθησης MCE, 0.45 μm pores size (SARTORIUS, Germany)
- IV. Μεθανόλη – MeOH (HPLC grade, Fisher Chemical, Loughborough, UK)
- V. Σακούλα φιλτραρίσματος μεγέθους πόρων 50 microns (TecnoLab, Italy)
- VI. Γλυκερίνη (Organic Glycerin, Laboratoires Prod'Hyg)
- VII. Κιτρικό οξύ (Citric acid, Jungbunzlauer, Austria)
- VIII. Συντηρητικό Microcare SB (μείγμα βενζοϊκού νατρίου και σορβικού καλίου, Thor Personal Care SAS)

- IX. Folin Ciocalteu's Phenol reagent (Merck) (FCPr)
- X. Διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃ 20% w/v)
- XI. Γαλλικό οξύ (98% καθαρότητα, 3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ), (Alfa Aesar)
- XII. Αιθανόλη (Fisher Chemical, Loughborough, UK)
- XIII. DPPH[·] -1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- XIV. Trolox - C₁₈H₁₂N₅O₆, ισοδύναμο Βιταμίνης E (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- XV. Aluminium chloride, 99%, extra pure, anhydrous, granules (ACROS Organics™)
- XVI. Quercetrin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ (UAE)

Η εκχύλιση με υπέρηχους πραγματοποιήθηκε σε αλεσμένα και αποξηραμένα φύλλα δείγματος *Vitis vinifera*. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν απιονισμένο νερό και μεθανόλη σε πέντε διαφορετικές αναλογίες, 100% H₂O, 80% H₂O-20% MeOH, 50% H₂O-50% MeOH, 20% H₂O-80% MeOH και 100% MeOH. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε μέσω της συσκευής άμεσων υπέρηχων Vibra-Cell VCX 750 (20 kHz, 750 W), η οποία είναι εξοπλισμένη με μετατροπέα και κεφαλή Ti-6Al-4V διαμέτρου 13mm, κατασκευασμένη από κράμα τιτανίου (Sonics and Materials Inc., Newtown, USA). Η αναλογία στερεού αλεσμένου δείγματος προς τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:10.

Οι παράμετροι της εκχύλισης επιλέχθηκαν με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, έτσι ώστε να έχουμε μέγιστη απόδοση σε φαινολικά και φλαβονοειδή συστατικά (Da Porto et al. 2013, Carrera et al. 2012, Casazza et al. 2010, Ghafoor et al. 2009, Novak et al. 2008). Για την λειτουργία της συσκευής εκχύλισης χρειάζεται να ρυθμιστούν οι εξής παράμετροι: ένταση παλμού (amplitude), διάρκεια παλμού (pulser) και ο χρόνος εκχύλισης. Η ρύθμιση της διάρκειας παλμού είναι απαραίτητη για τους υπέρηχους ασυνεχούς λειτουργίας. Η διάρκεια του παλμού αναφέρεται ως "on" time ενώ το μεσοδιάστημα μεταξύ των παλμών ως "off" time. Η επιλογή ασυνεχούς λειτουργίας ενδείκνυται για θερμοευαίσθητα δείγματα, καθώς έτσι αποφεύγεται η αύξηση θερμότητας. Η θερμοκρασία κυμάνθηκε στους 25-35°C. Στο παρακάτω πίνακα 2.1.a αναγράφονται οι παράμετροι που επιλέχθηκαν.

Πίνακας 2.1.1 Παράμετροι εκχύλισης με υπέρηχους

Παράμετροι εκχύλισης με υπέρηχους	
Ένταση παλμού (amplitude)	80%
Διάρκεια παλμού (pulser)	On time:10 seconds Off time:5 seconds
Χρόνος εκχύλισης (timer)	15 minutes

Σε γυάλινη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν πρώτα 3 g αλεσμένου δείγματος. Ακολούθως τοποθετείται θερμομότρο σε ειδική εισδοχή που διαθέτει η γυάλινη φιάλη και έπειτα προσθέτουμε τον διαλύτη 100% H₂O τελικού όγκου 30ml. Αφού τοποθετηθεί η γυάλινη φιάλη σε πάγο, προσεκτικά εφαρμόζουμε τη κεφαλή της συσκευής εκχύλισης μέσα στη

φιάλη έτσι ώστε να βρίσκεται μέσα στον διαλύτη αλλά να μην ακουμπάει τον πάτο. Ο πάγος χρησιμοποιείται λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας που υφίσταται στο δείγμα εσωτερικά της φιάλης κατά την διάρκεια της εκχύλισης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση της θερμοκρασίας στα επιθυμητά πλαίσια των 25-35°C. Τέλος, ρυθμίζεται η ένταση παλμού σε 80%, η διάρκεια παλμού σε 10 δευτερόλεπτα, το μεσοδιάστημα παλμών σε 5 δευτερόλεπτα και ο χρόνος της εκχύλισης σε 15 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης, ακολουθεί διήθηση του εκχυλίσματος υπό κενό μέσω φίλτρου Whatman. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται και για τις υπόλοιπες τέσσερις αναλογίες διαλυτών εις διπλούν. Τα εκχυλίσματα συλλέγονται σε falcon των 50ml και αποθηκεύονται στους 4°C στο σκοτάδι.

2.2 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η λυοφιλίωση αποτελεί μια μέθοδο ξήρανσης σε ήπιες συνθήκες χωρίς να αλλοιώνει την θρεπτική αξία του δείγματος (τρόφιμο, φαρμακευτικό σκεύασμα κλπ.). Η μέθοδος βασίζεται στο φαινόμενο της εξάχνωσης. Το δείγμα αρχικά καταψύχεται και στη συνέχεια σε χαμηλή πίεση υφίσταται εξάχνωση, δηλαδή μεταβαίνει απευθείας από τη στερεή στην αέρια φάση. Βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η διατήρηση των δειγμάτων για μεγάλο χρονικό διάστημα λόγω απομάκρυνσης της υγρασίας έως 98% και ο περιορισμός της μικροβιακής τους αλλοίωσης. Τα λυοφιλωμένα δείγματα μπορούν εύκολα να αποκτήσουν την αρχική τους μορφή με προσθήκη του αρχικού διαλύτη (Ratti 2001).

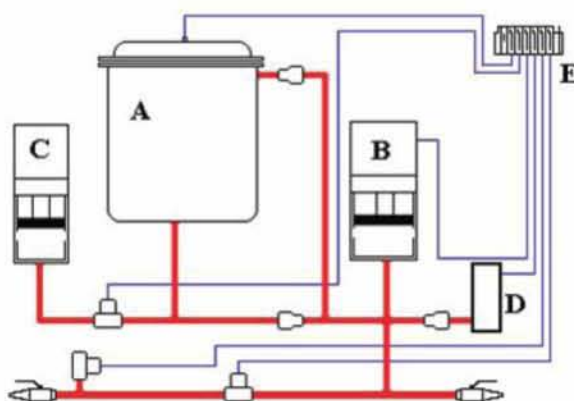
Η διαδικασία λυοφιλίωσης εφαρμόστηκε μόνο στα εκχυλίσματα που προήλθαν από εκχύλιση με υπερήχους. Δεν έγινε ο αντίστοιχος προσδιορισμός για τα γλυκερινικά εκχυλίσματα που προήλθαν μέσω εκχύλισης υπό πίεση καθώς δεν ήταν δυνατή η απομάκρυνση της γλυκερόλης είτε με λυοφιλίωση είτε με εξάτμιση. Συγκεκριμένα, από το κάθε εκχύλισμα που έχει ληφθεί με υπερήχους λαμβάνονται 500 μl και προσθέτονται σε ένα erpendorf χωρητικότητας 1ml. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται ακόμη τρεις φορές έτσι ώστε τελικά να αντιστοιχούν τέσσερα erpendorfs ανά εκχύλισμα. Έπειτα όλα τα δείγματα των 500 μl που έχουν ληφθεί τοποθετούνται στη συσκευή λυοφιλίωσης LABCONCO Freeze Dryer (Thermo Electron Corporation, Thermo Fischer, USA) για ένα ολόκληρο βράδυ. Πριν την διαδικασία που μόλις αναφέρθηκε, πάντα γίνεται ζύγιση του απόβαρου κάθε άδειου erpendorf που αναγράφεται ως Αρχικό_{βάρος}. Με την ολοκλήρωση της λυοφιλίωσης λαμβάνεται και πάλι το βάρος των erpendorf ως Τελικό_{βάρος} και εφαρμόζεται η εξής εξίσωση:

$$\text{Τελικό βάρος} - \text{Αρχικό βάρος} = X \text{ mg στερεού δείγματος}$$

Η πιο πάνω εξίσωση μας διευκολύνει στο να γνωρίζουμε με ακρίβεια τη μάζα των βιοδραστικών ενώσεων που υπάρχουν σε κάθε erpendorf, κάτι που θα φανεί εξαιρετικά χρήσιμο σε επόμενα πειράματα.

2.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PELE)

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη υπό πίεση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συσκευής εκχύλισης Timatic mini (TecnoLab, Italy) η οποία βρίσκεται στις εγκαταστάσεις του εργοστασίου της εταιρίας APIVITA. Η συσκευή Timatic λειτουργεί με ένα σύστημα πίεσης και αποσυμπίεσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η συσκευή αποτελείται από ένα δοχείο εκχύλισης (A), δύο έμβολα συμπίεσης (B,C), μία αντλία (D), και πνευματικές βαλβίδες (E) στα διάφορα σημεία της διάταξης. Η οργανολογία της συσκευής απεικονίζεται και στο πιο κάτω διάγραμμα (εικόνα 1).



Εικόνα 3. Διάγραμμα συσκευής εκχύλισης υπό πίεση (Timatic)

Αρχικά, προετοιμάζεται ο διαλύτης της εκχύλισης ο οποίος αποτελεί μείγμα νερού και γλυκερίνης στις πέντε εξής αναλογίες:

1. 100% H₂O
2. 80% H₂O – 20% Γλυκερίνη
3. 60% H₂O – 40% Γλυκερίνη
4. 50% H₂O – 50% Γλυκερίνη
5. 40% H₂O – 60% Γλυκερίνη

Εκτός από το νερό και τη γλυκερίνη, γίνεται προσθήκη 4,8 g κιτρικού οξέος για τη ρύθμιση του pH του διαλύματος και 12g μείγματος βενζοϊκού νατρίου και σορβικού καλίου (Microcare SB) που λειτουργεί ως συντηρητικό. Η γλυκερίνη πάντα προστίθεται τελευταία και ακολουθεί καλή ανάδευση μέχρι να ομογενοποιηθεί τελείως το μείγμα του διαλύτη. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα φύλλα (φυτικό υπόστρωμα) σε σακούλα φιλτραρίσματος μεγέθους πόρων 50 microns, σε ποσοστό 30g/1200g διαλύτη. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα φύλλα τοποθετήθηκαν με προσοχή στη σακούλα ώστε να έχουμε ελάχιστο έως καθόλου θρυμματισμό. Ακολουθώντας, τοποθετείται πρώτα η σακούλα με το φυτικό υπόστρωμα μέσα στο δοχείο εκχύλισης και έπειτα ο διαλύτης της εκχύλισης. Τέλος, ενεργοποιείται ειδικό πρόγραμμα εκχύλισης 8 κύκλων που διαρκεί 88 λεπτά κατά το οποίο 5 δευτερόλεπτα υφίσταται πίεση και 6 δευτερόλεπτα αποσυμπίεση. Η δυναμική της συσκευής ως προς την πίεση είναι 4 bar η ελάχιστη, και 9 bar η μέγιστη. Η διπλή επίδραση της πίεσης/αποσυμπίεσης βοηθάει τον διαλύτη να εισχωρήσει στο φυτικό υπόστρωμα και να παρασύρει τα βιοδραστικά του συστατικά. Τα εκχυλίσματα που πάρθηκαν διηθήθηκαν με

φίλτρα Whatman και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) στο σκοτάδι σε γυάλινα βάζα.

2.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΥΔΡΟ-ΓΛΥΚΕΡΙΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Ο έλεγχος σταθερότητας των εκχυλισμάτων αφορά μια διαδικασία διάρκειας τεσσάρων εβδομάδων. Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι να ληφθούν σαφή συμπεράσματα όσον αφορά τη σταθερότητα των εκχυλισμάτων κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, πρόκειται να ελέγξουμε τα πέντε υδρο-γλυκερινικά εκχυλίσματα που πάραλήφθησαν μέσω της συσκευής TIMATIC. Λαμβάνεται μικρή ποσότητα από κάθε εκχύλισμα και διαχωρίζεται σε τέσσερα καθαρά γυάλινα βάζακια χωρητικότητας 30ml όπως φαίνεται στη πιο κάτω εικόνα.



Εικόνα 4. Στην εικόνα φαίνεται ο διαχωρισμός ενός από τα πέντε εκχυλίσματα σε τέσσερα διαφορετικά γυάλινα βάζακια, τα οποία αντιστοιχούν στις τέσσερις διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης (5-7 °C, 25 °C, υπό σκοτάδι 38 °C και UV ακτινοβολία).

Ο διαχωρισμός έγινε σε τέσσερα βάζακια για το λόγο ότι τα εκχυλίσματα έπρεπε να αποθηκευτούν σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες. Οι συνθήκες αποθήκευσης ήταν οι εξής:

1. 5-7 °C
2. 25 °C στο σκοτάδι
3. 38 °C
4. UV ακτινοβολία

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών για όλα τα εκχυλίσματα σε πέντε διαφορετικούς χρόνους ($t=0, 1^{\text{η}}$ εβδομάδα, $2^{\text{η}}$ εβδομάδα, $3^{\text{η}}$ εβδομάδα και $4^{\text{η}}$ εβδομάδα). Ο έλεγχος αφορά τα εξής φυσικοχημικά χαρακτηριστικά:

- I. Πυκνότητα
- II. Βαθμός διάθλασης
- III. pH
- IV. Χρώμα-όψη
- V. Οσμή

2.5 ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΥΔΡΟ-ΓΛΥΚΕΡΙΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Στη συνέχεια, πρέπει να εξεταστεί το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, η αντιοξειδωτική ικανότητα και το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων από τα φύλλα του φυτού *Vitis vinifera*. Οι προσδιορισμοί των εκχυλισμάτων που προήλθαν από εκχύλιση υποβοηθούμενη υπό πίεση πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση φασματοφωτομέτρου UV-VIS διπλής δέσμης τύπου UV-1800 (Shimadzu Europa) στις εγκαταστάσεις της εταιρίας APIVITA.

2.5.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEAU

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu χρησιμοποιείται για την μέτρηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου κυρίως φυτικών εκχυλισμάτων. Βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αποτελεί ένα κίτρινο διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά και φωσφο-βολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται με ταυτόχρονη αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu προς μείγμα κυανών οξειδίων του βολφραμίου και του μολυβδαινίου. Το παραγόμενο κυανό (μπλε) χρώμα παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 750nm (Prior et al. 2005; Singleton et al. 1998).

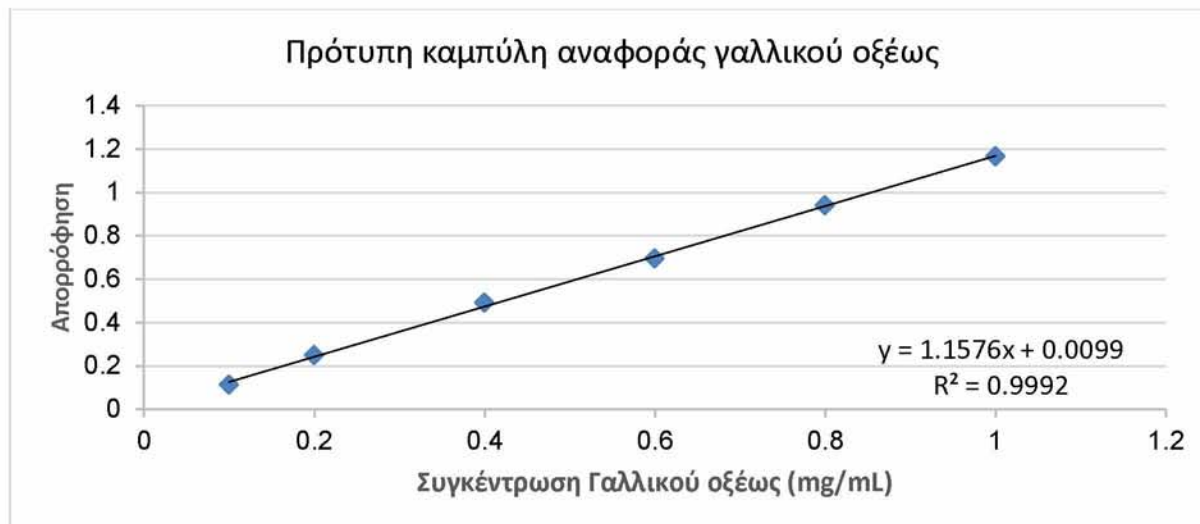
Στη παρούσα εργασία η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για το προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου ήταν η εξής:

1. Σε ένα erpendorf των 2ml προσθέτονται 1580μl αποσταγμένου H₂O, 20μl εκχυλίσματος κατάλληλα αραιωμένο και 100μl αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (πυκνό)
2. Αναδεύουμε καλά
3. Αναμονή 1 λεπτού
4. Προσθέτουμε 300μl κορεσμένου διαλύματος Na₂CO₃ 20% w/v
5. Αναδεύουμε καλά
6. Τα δείγματα αποθηκεύονται υπό σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 120 λεπτά
7. Ακολουθεί φωτομέτρηση του προϊόντος της αντίδρασης στα 750nm

Μαζί με τα δείγματα προετοιμάζονται ταυτόχρονα και δύο τυφλά δείγματα, όπου στη θέση του φυτικού εκχυλίσματος προστίθενται 20μl μεθανόλης. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τριπλή επανάληψη.

Προκειμένου να υπολογισθεί η συγκέντρωση των πολυφαινολών στα φυτικά εκχυλίσματα, χρησιμοποιούμε καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος. Η συγκέντρωση των πολυφαινολών εκφράζεται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς δημιουργείται με τη φωτομέτρηση γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος. Συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν 0.08g γαλλικού οξέος και στη συνέχεια διαλύθηκαν σε 50ml EtOH, δημιουργώντας αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 1.6 mg/mL. Χρησιμοποιώντας το αρχικό διάλυμα και με διαδοχικές αραιώσεις

δημιουργούνται διαλύματα συγκεντρώσεων 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 και 0.1 mg/mL. Ακολουθεί φωτομέτρηση όλων των παραγόμενων αραιωμένων διαλυμάτων συν του αρχικού διαλύματος γαλλικού οξέος (GA) στα 750nm. Από τη πρότυπη καμπύλη προκύπτει η συνάρτηση (1) $y=1,1576x-0,0099$ με $R^2=0.9992$. Με τη βοήθεια της συνάρτησης αυτής ανάγονται οι απορροφήσεις προς συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος, δηλαδή η τιμή που εκφράζει το φαινολικό περιεχόμενο.



Σχήμα 2.5.1 (α): Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος. Η συγκέντρωση του ολικού φαινολικού εκφράζεται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος.

2.5.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΗΣ 1,1-ΔΙΦΑΙΝΥΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΟ-ΥΔΡΑΖΥΛΟ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH*

Η μέθοδος στηρίζεται στην απορρόφηση της ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Το διάλυμα της ρίζας DPPH έχει χρώμα βαθύ μωβ και μετράται με φωτομέτρηση στα 515nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση, η ρίζα DPPH ανάγεται με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ενός e^-) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζίνη, η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση της οπτικής απορρόφησης (Bondet et al. 1997; Brand-Williams et al. 1995; Prior et al. 2005). Η μέθοδος DPPH* χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων.

Στη παρούσα εργασία η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι η εξής:

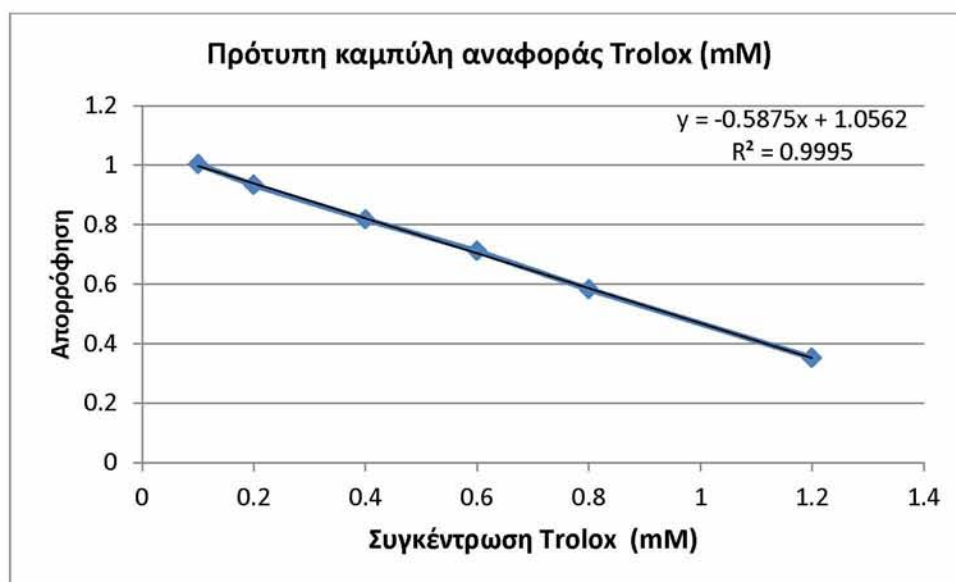
1. Σε ένα erpendorf των 2ml τοποθετούνται 50μl φυτικού εκχυλίσματος κατάλληλα αραιωμένο και 1950μl διαλύματος DPPH* (100μM σε MeOH)
2. Ανάδευση σε Vortex
3. Ακολουθεί επώαση του δείγματος για 30 λεπτά υπό σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
4. Τέλος, γίνεται φωτομέτρηση του προϊόντος της αντίδρασης στα 515nm

Ταυτόχρονα παρασκευάζεται και το τυφλό δείγμα όπου στη θέση του φυτικού εκχυλίσματος τοποθετείται MeOH. Ο μηδενισμός του φωτομέτρου γίνεται με χρήση δείγματος που περιέχει μόνο MeOH. Το τυφλό δείγμα φωτομετρήθηκε κανονικά μαζί με τα υπόλοιπα δείγματα. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τριπλή επανάληψη.

Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{Αναστολή} = \frac{(Abs_{\text{τυφλού}} - Abs_{\text{δείγματος}})}{Abs_{\text{τυφλού}} * 100}$$

Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς Trolox mM το οποίο είναι ισοδύναμο βιταμίνης E με ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας θα εκφράζεται ως ισοδύναμο Trolox mM. Συγκεκριμένα, 0.04g Trolox διαλύθηκαν σε 100ml MeOH σχηματίζοντας το αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 1.6mM. Χρησιμοποιώντας το αρχικό διάλυμα και με διαδοχικές αραιώσεις δημιουργούνται διαλύματα συγκεντρώσεων 1.2, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 και 0.1mM. Ακολουθεί φωτομέτρηση όλων των παραγόμενων αραιωμένων διαλυμάτων συν του αρχικού διαλύματος γαλλικού οξέος στα 515nm. Η πρότυπη καμπύλη έχει μορφή απορρόφησης προς συγκέντρωση Trolox (mg/ml) και κατασκευάζεται κάθε φορά που παρασκευάζεται διάλυμα DPPH 100 μM. Από τη πρότυπη καμπύλη προκύπτει η συνάρτηση (2) $y=0,5875x-1,0562$ και $R^2=0.9995$. Με τη βοήθεια της συνάρτησης αυτής ανάγονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων προς συγκεντρώσεις Trolox (mg/ml).



Σχήμα 2.5.2 (α): Πρότυπη καμπύλη Trolox ισοδύναμο βιταμίνης E. Η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκφράζεται ως ισοδύναμο Trolox.

2.5.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ $AlCl_3$ (TFC)

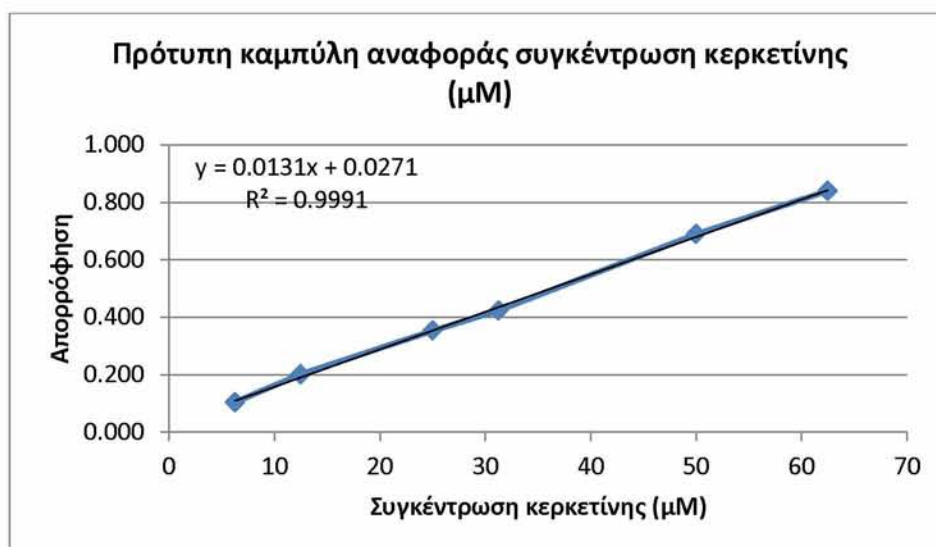
Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα σχηματισμού συμπλόκων των φλαβονοειδών με διάφορα μεταλλικά ιόντα που συμμετέχουν στις αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών. Επομένως, όταν τα φλαβονοειδή βρεθούν στο ίδιο περιβάλλον με $AlCl_3$ σχηματίζουν σύμπλοκο Al-φλαβονοειδές το οποίο δημιουργεί έντονο κίτρινο χρώμα και ανιχνεύεται στα 425nm (Berichte & Pharmazeutischen 1989, Malešev & Kuntić 2007, Ρεκαλ & Pырzynska 2014).

Στη παρούσα εργασία η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για το προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων ήταν η εξής:

1. Σε ένα erpendorf των 2ml τοποθετούνται 1ml φυτικού εκχυλίσματος κατάλληλα αραιωμένο, 0.5 ml $AlCl_3$ (2% w/v) και 0.5 ml αποσταγμένου H_2O .
2. Ακολουθεί καλή ανάδευση
3. Τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά σε σκοτάδι υπό θερμοκρασία δωματίου
4. Τέλος, το προϊόν της αντίδρασης φωτομετράται στα 425nm.

Σε αυτή τη μέθοδο, κάθε φυτικό δείγμα έχει το δικό του τυφλό δείγμα στο οποίο τοποθετείται 0.5ml αποσταγμένου H_2O αντί του αντιδραστήριου. Ο μηδενισμός του φωτόμετρου γίνεται με χρήση δείγματος που περιέχει μόνο $MeOH$. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τριπλή επανάληψη.

Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς κερκετίνης μM η οποία ανήκει στην υποκατηγορία των φλαβονολών. Τα αποτελέσματα του ολικού περιεχομένου των φλαβονοειδών θα παρουσιαστούν ως ισοδύναμα κερκετίνης. Συγκεκριμένα, 0.0169135g άνυδρης κερκετίνης διαλύθηκαν σε 100ml $MeOH$ σχηματίζοντας το αρχικό-μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης 500 μM . Χρησιμοποιώντας το αρχικό διάλυμα και με διαδοχικές αραιώσεις δημιουργούνται διαλύματα συγκεντρώσεων 62.5, 50, 25, 12.5 και 6.25 μM . Από τη πρότυπη καμπύλη προκύπτει η συνάρτηση (3) $y=0,0131x-0,0271$ και $R^2=0,9991$. Με τη βοήθεια της συνάρτησης αυτής ανάγονται οι απορροφήσεις προς συγκεντρώσεις κερκετίνης μM .



Σχήμα 2.5.3 (α): Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης κερκετίνης. Η συγκέντρωση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών εκφράζεται ως ισοδύναμο κερκετίνης.

2.5.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ FRAP

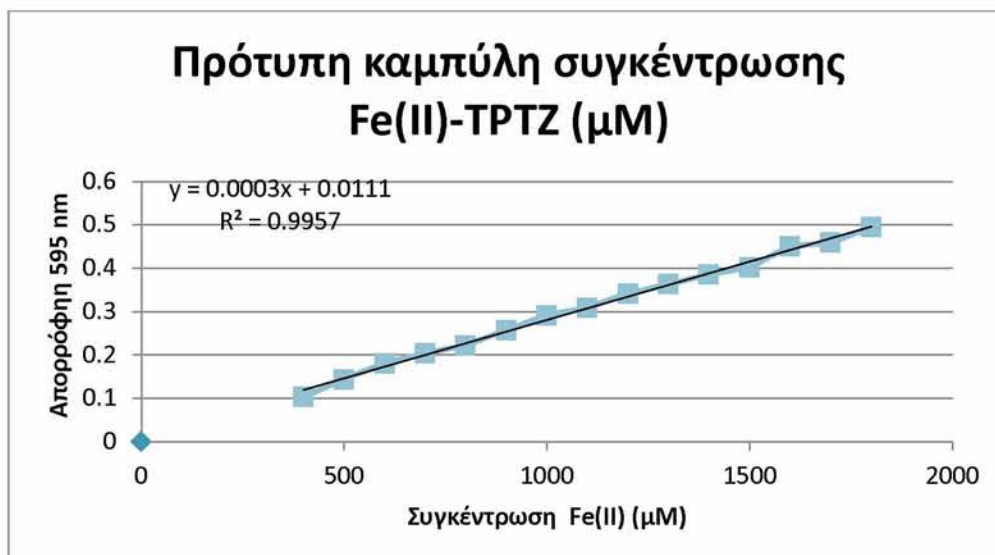
Η μέθοδος προσδιορισμού FRAP βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών να ανάγουν το Fe(III) στο σύμπλοκο σιδηρο-2,4,6, τριπυριδυλ-s-τριαζίνης (Fe(III) – TPTZ) σε Fe(II) στο αντίστοιχο σιδηρο-σύμπλοκο (Fe(II) – TPTZ) σε όξινο περιβάλλον (Benzie & Strain 1996). Μας παρουσιάζει την αναγωγική- αντιοξειδωτική ισχύ που έχουν οι πολυφαινολικές ενώσεις. Το σύμπλοκο του Fe(III) – TPTZ αρχικά είναι άχρωμο, το οποίο παρουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων και χαμηλού pH ανάγεται σε Fe(II) – TPTZ το οποίο έχει έντονο μπλε-μωβ και φωτομετράται στα 593-595 nm.

Στη παρούσα εργασία η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για το προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής και αναγωγικής ισχύς των αντιοξειδωτικών ενώσεων ήταν η εξής:

1. Σε κυψελίδα προστίθεται 7μl δείγματος
2. Τοποθετούνται 2000μl αποσταγμένου H₂O
3. Έπειτα προσθέτονται 900μl διαλύματος FRAP
4. Ακολουθεί προσθήκη 500μl ρυθμιστικού διαλύματος
5. Καλή ανάδευση δειγμάτων
6. Όλα τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 90 λεπτά όπου θα έχουμε τη μέγιστη απορρόφηση
7. Τέλος, φωτομετράται το προϊόν της αντίδρασης στα 595 nm

Παράλληλα προετοιμάζεται και το τυφλό δείγμα το οποίο θα περιέχει όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια και αντί του δείγματος προστίθεται ίση ποσότητα διαλύτη. Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονται την ίδια μέρα πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τριπλή επανάληψη. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα δείγματα που προήλθαν από εκχύλιση με υπερήχους.

Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης του σύμπλοκου Fe(II)-TPTZ μM. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής-αναγωγικής ισχύς θα εκφράζεται ως το παραγόμενο σύμπλοκο Fe(II)-TPTZ μM. Δημιουργούνται διαλύματα συγκεντρώσεων 400, 500, 600, 700 έως και 1800 μM. Έπειτα, ακολουθείται η ίδια πειραματική πορεία όπως έχει ήδη αναφερθεί. Πραγματοποιείται επώαση όλων των δειγμάτων για 90 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 37 °C και μετά γίνεται η φωτομέτρηση όλων των παραγόμενων αραιωμένων διαλυμάτων στα 595nm. Η πρότυπη καμπύλη έχει μορφή απορρόφησης προς συγκέντρωση Fe(II) (μg/ml). Από τη πρότυπη καμπύλη προκύπτει η συνάρτηση (4) $y=0,0003x-0,0111$ και $R^2=0.9957$.



Σχήμα 2.5.4 (α): Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης Fe(III) – TPTZ (μM).

2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ MICROPLATE READER

Στη συνέχεια, πρέπει να εξετασθεί το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, η αντιοξειδωτική ικανότητα και το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών στα εκχυλίσματα που προήλθαν από εκχύλιση με υπερήχους. Οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της συσκευής Infinite® 200 PRO NanoQuant Multimode Microplate Reader (Tecan Trading).

2.6.1 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEAU

Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε αραιωμένο διάλυμα Folin-Ciocalteu 10v/v το οποίο παρασκευάστηκε λίγο πριν την διεξαγωγή των πειραμάτων. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα Na₂CO₃ 7.5% w/v.

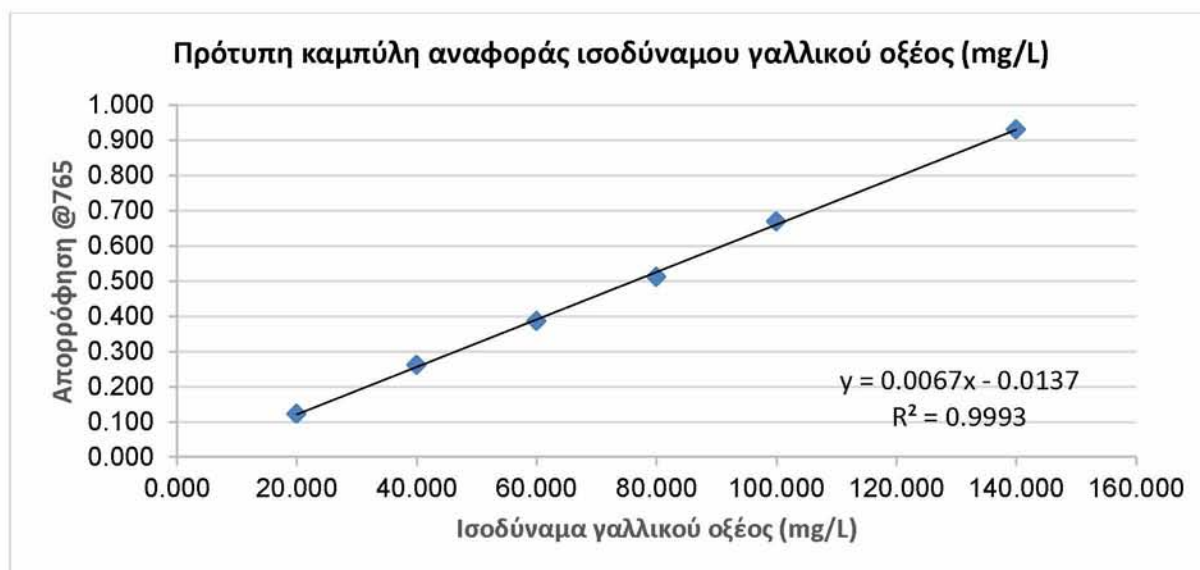
Στη παρούσα εργασία η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για το προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου ήταν η εξής:

1. Σε 96 well-plate τοποθετούμε 25μl δείγματος κατάλληλα αραιωμένου, 125μl διαλύματος Folin-Ciocalteu 10v/v και 100μl υδατικού διαλύματος Na₂CO₃.
2. Αφού καλύψουμε το well-plate με parafilm, ακολουθεί επώαση 30 λεπτών σε σκοτάδι υπό θερμοκρασία περιβάλλοντος
3. Τέλος, μετράται η απορρόφηση στα 765nm χρησιμοποιώντας την συσκευή Infinite M200 pro TECAN

Ταυτόχρονα παρασκευάζεται και το τυφλό δείγμα στο οποίο τοποθετείται μεθανόλη αντί του δείγματος.

Η συγκέντρωση των πολυφαινολών εκφράζεται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο όπως αναφέρεται στην ενότητα (2.5.1). Η συνάρτηση που προκύπτει είναι η (5) $y=0,0067x-0,0137$ και

$R^2=0.9993$. Με τη βοήθεια της συνάρτησης αυτής ανάγονται οι απορροφήσεις προς συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος, δηλαδή η τιμή που εκφράζει το φαινολικό περιεχόμενο.



Σχήμα 2.6.1 (α): Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος. Η συγκέντρωση του ολικού φαινολικού εκφράζεται ως ισοδύναμο γαλλικού οξέος.

2.6.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH*

Στη παρούσα εργασία η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι η εξής:

1. Σε 96 well-plate τοποθετούμε 10μl δείγματος κατάλληλα αραιωμένου και 190μl διαλύματος DPPH
2. Αφού καλύψουμε το well-plate με parafilm, ακολουθεί επώαση 30 λεπτών σε σκοτάδι υπό θερμοκρασία περιβάλλοντος
3. Τέλος, μετράται η απορρόφηση στα 517nm χρησιμοποιώντας την συσκευή Infinite M200 pro TECAN

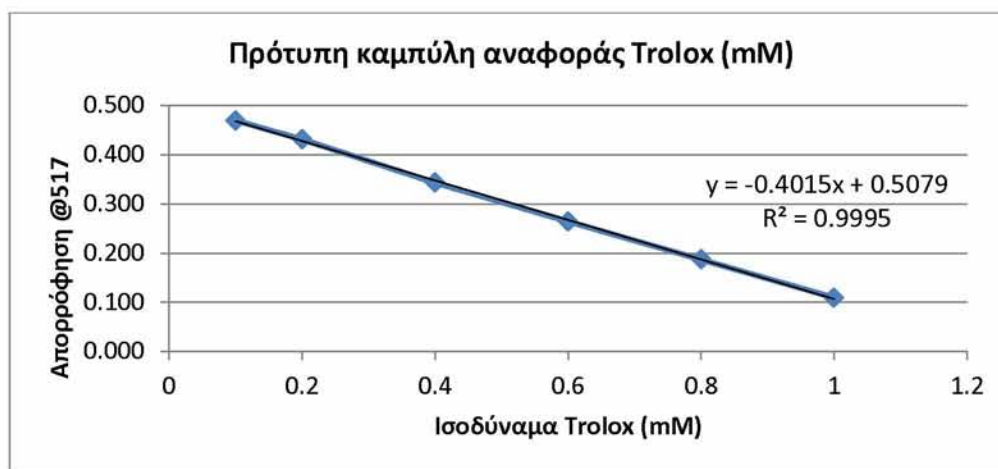
Ταυτόχρονα παρασκευάζεται και το τυφλό δείγμα στο οποίο τοποθετείται μεθανόλη αντί του δείγματος.

Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ Αναστολή} = \frac{(Abs_{\text{τυφλού}} - Abs_{\text{δείγματος}})}{Abs_{\text{τυφλού}} * 100}$$

Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς Trolox mM το οποίο είναι ισοδύναμο βιταμίνης E με ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Η πρότυπη καμπύλη

Trolox παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο όπως αναφέρεται στην ενότητα (2.5.2). Η συνάρτηση που προκύπτει είναι η (6) $y = -0,4015x + 0,5079$ και $R^2 = 0,9995$. Με τη βοήθεια της συνάρτησης αυτής ανάγονται οι απορροφήσεις προς συγκεντρώσεις Trolox (mg/ml).



Σχήμα 2.6.2 (α): Πρότυπη καμπύλη Trolox (mM) ισοδύναμο βιταμίνης E. Η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκφράζεται ως ισοδύναμο Trolox.

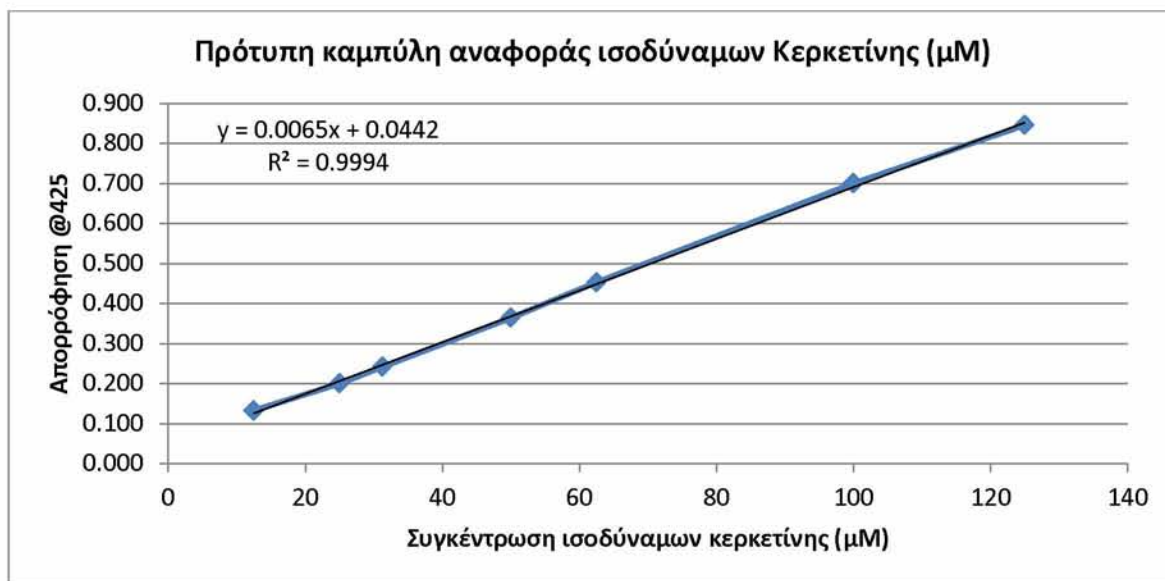
2.6.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ $AlCl_3$ (TFC)

Στη παρούσα εργασία η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για το προσδιορισμό του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών ενώσεων ήταν η εξής:

1. Σε 96 well-plate τοποθετούμε 100μl δείγματος κατάλληλα αραιωμένου και 100μl διαλύματος $AlCl_3$ (2% w/v)
2. Αφού καλύψουμε το well-plate με parafilm, ακολουθεί επώαση 10 λεπτών σε σκοτάδι υπό θερμοκρασία περιβάλλοντος
3. Τέλος, το προϊόν της αντίδρασης φωτομετράται στα 425nm χρησιμοποιώντας την συσκευή Infinite M200 pro TECAN

Σε αυτή τη μέθοδο, κάθε φυτικό δείγμα έχει το δικό του τυφλό δείγμα στο οποίο τοποθετείται 100μl αποσταγμένου H_2O αντί του αντιδραστήριου. Ο μηδενισμός του φωτομέτρου γίνεται με χρήση δείγματος που περιέχει μόνο MeOH. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε τριπλή επανάληψη.

Παράλληλα κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς κερκετίνης μM η οποία ανήκει στην υποκατηγορία των φλαβονολών. Τα αποτελέσματα του ολικού περιεχομένου των φλαβονοειδών θα παρουσιαστούν ως ισοδύναμο κερκετίνης. Η πρότυπη καμπύλη κερκετίνης παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο όπως αναφέρεται στην ενότητα (2.5.3). Από τη πρότυπη καμπύλη προκύπτει η συνάρτηση (7) $y = 0,0065x - 0,0442$ και $R^2 = 0,9994$. Με τη βοήθεια της συνάρτησης αυτής ανάγονται οι απορροφήσεις προς συγκεντρώσεις κερκετίνης (μM).



Σχήμα 2.6.3 (α): Πρότυπη καμπύλη κερκετίνης. Η συγκέντρωση του ολικού περιεχομένου φλαβονοειδών εκφράζεται ως ισοδύναμο κερκετίνης

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε ανά μονάδα όγκου του εκάστοτε εκχυλίσματος καθώς το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας είναι τα διαφορετικά εκχυλίσματα. Για όλες τις μετρήσεις, υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD) σε κάθε δείγμα. Οι τιμές επεξεργάστηκαν στατιστικά (δοκιμή t) με το υπολογιστικό πρόγραμμα στατιστικής SPSS v.10.0.

Η περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες των εκχυλισμάτων των φύλλων της αμπέλου προσδιορίστηκε μέσω της τεχνικής φασματοφωτομετρίας Folin– Ciocalteu ενώ η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή προσδιορίστηκε με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο $AlCl_3$. Η αντιοξειδωτική-αναγωγική ισχύς προσδιορίστηκε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο DPPH και FRAP. Η εξαγωγή των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς για κάθε ξεχωριστό πείραμα. Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R) κάθε καμπύλης που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων θεωρήθηκε ικανοποιητική ($R > 0,95$).

Τέλος παρατίθενται τα αποτελέσματα από τα τεστ σταθερότητας των εκχυλισμάτων με προέλευση την τεχνική εκχύλισης PELE, τα οποία πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις της εταιρίας APIVITA.

3.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ

Με τη βοήθεια της τεχνικής εκχύλισης με υπερήχους έχουν παρασκευασθεί πέντε διαφορετικά εκχυλίσματα. Για την εκτίμηση της απόδοσης της τεχνικής εκχύλισης ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στη παράγραφο 2.2.

Πίνακας 3.1.1: Η απόδοση τεχνικής εκχύλισης με υπερήχους εκφράζεται ως % g εκχυλισθέντος ανά 100 g ξηρού δείγματος (% w/w απόδοση ±SD).

Εκχύλισμα UAE	% w/w απόδοση της εκχύλισης (g εκχυλισθέντος / 100 g δείγματος)
H ₂ O	13,56±0,51 ^a
H ₂ O-MeOH 4:1 (v/v)	15,8±1,3 ^b
H ₂ O-MeOH 1:1 (v/v)	18,55±0,61 ^c
H ₂ O-MeOH 1:4 (v/v)	18,66±0,84 ^c
MeOH	14,4±1,3 ^{a,b}

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p < 0,05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1.1, τα εκχυλίσματα με την μεγαλύτερη αποδοτικότητα είναι τα H₂O-MeOH 1:4 (v/v) και H₂O-MeOH 1:1 (v/v) (18,66±0,84 και 18,55±0,61 αντίστοιχα). Τα εκχυλίσματα MeOH και H₂O εμφανίζουν ασθενέστερη απόδοση συγκριτικά με τα δύο προηγούμενα αποτελέσματα (14,4±1,3 και 13,56±0,51 αντίστοιχα). Με βάση τα αποτελέσματα, παρατηρείται ότι οι συνδυασμοί διαλυτών νερού και μεθανόλης σε αναλογία 1:1 (v/v) και 1:4 (v/v) είναι οι πιο αποτελεσματικοί για την παραλαβή συστατικών από εκχυλίσματα φύλλων σταφυλιού κάτω από τις συνθήκες διεξαγωγής της εκχύλισης οι οποίες περιγράφονται στη παράγραφο 2.1.. Η γενικά χαμηλή παρατηρούμενη απόδοση της εκχύλισης πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη διαφόρων μακρομορίων όπως η χλωροφύλλη στα εκχυλίσματα.

3.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ (TPC) ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (UAE) ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PELE)

Για την εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου στα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος Folin-Ciocalteu. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν επεξεργάστηκαν με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς Γαλλικού οξέως (GAE). Επομένως, τα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ενώσεων στα φυτικά εκχυλίσματα τα οποία παρατίθενται πιο κάτω, είναι εκφρασμένα ως ισοδύναμα Γαλλικού οξέως (GAE).

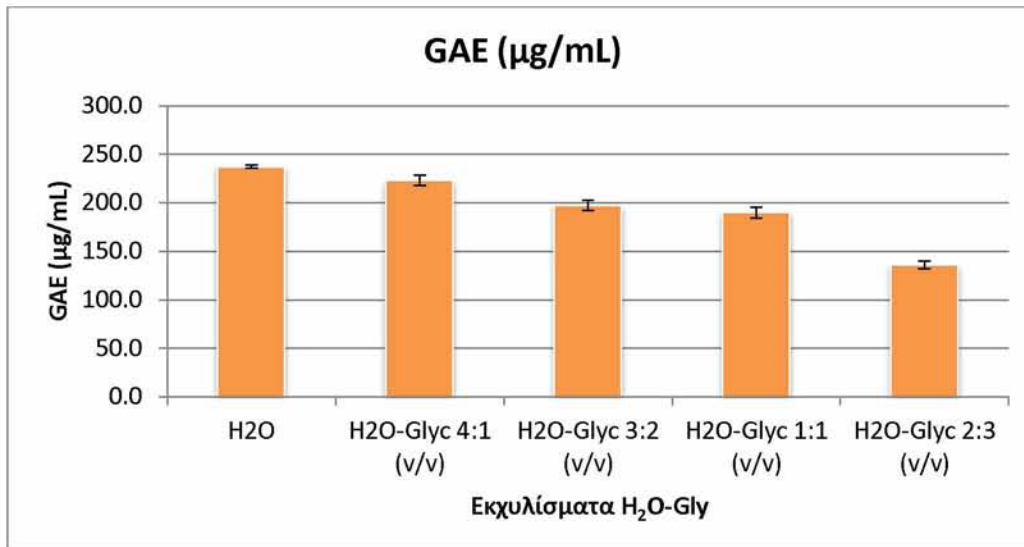
Πίνακας 3.2.1: Συγκέντρωση των ολικών φαινολικών ενώσεων εκφρασμένη σε μg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) ανά mL εκχυλίσματος PELE και UAE φύλλων αμπέλου της λευκής ποικιλίας Αθήρι (Μέσος όρος±SD).

Τεχνική εκχύλισης	Δείγμα	GAE (μg/mL)
PELE	H ₂ O	237,4±1,9 ^a
	H ₂ O-Glyc 4:1 (v/v)	222,9±5,3 ^b
	H ₂ O-Glyc 3:2 (v/v)	197,5±5,0 ^c

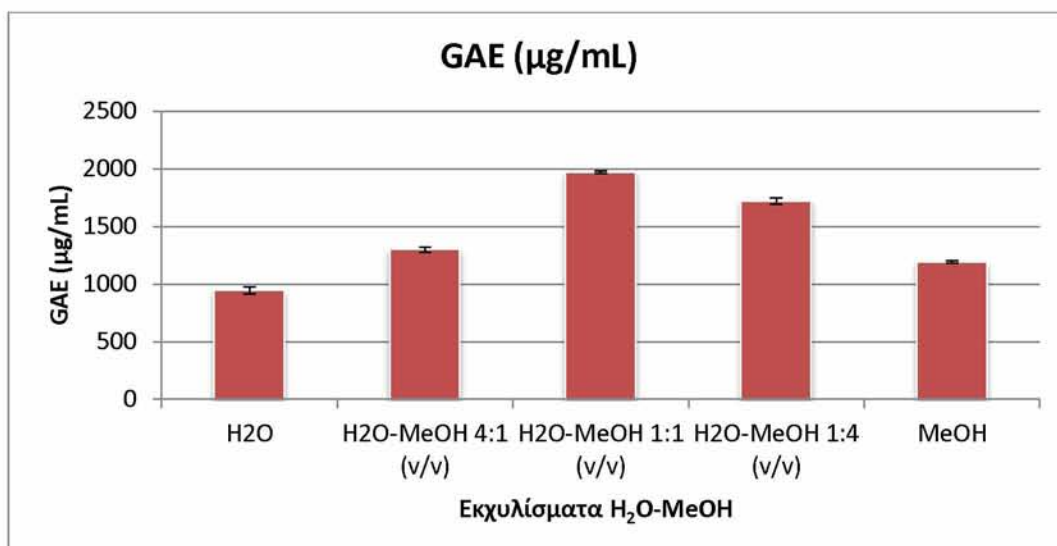
	H ₂ O-Glyc 1:1 (v/v)	190,0±5,6 ^c
	H ₂ O-Glyc 2:3 (v/v)	136,0±4,0 ^d
UAE	H ₂ O	945±31 ^e
	H ₂ O-MeOH 4:1 (v/v)	1300±21 ^f
	H ₂ O-MeOH 1:1 (v/v)	1972±10 ^g
	H ₂ O-MeOH 1:4 (v/v)	1721±27 ^h
	MeOH	1192±12 ⁱ

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p < 0,05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

Όπως φαίνεται στον πίνακα, τα εκχυλίσματα που προήλθαν από την τεχνική εκχύλισης UAE (H₂O, H₂O-MeOH 4:1 (v/v), H₂O-MeOH 1:1 (v/v), H₂O-MeOH 1:4 (v/v) και MeOH) εμφανίζουν σημαντικά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες συγκριτικά με τα εκχυλίσματα που προήλθαν από την τεχνική εκχύλισης PELE (H₂O, H₂O-Glyc 4:1 (v/v), H₂O-Glyc 3:2 (v/v), H₂O-Glyc 1:1 (v/v) και H₂O-Glyc 2:3 (v/v)). Τα εκχυλίσματα φύλλων αμπέλου της λευκής ποικιλίας Αθήρι που ξεχωρίζουν λόγω τις αυξημένης περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις είναι τα H₂O-MeOH 1:1 (v/v), H₂O-MeOH 1:4 (v/v) με τιμές 1972±10 και 1721±27 μg GAE/mL εκχυλίσματος. Τα εκχυλίσματα αυτά έχουν προέλθει από εκχύλιση με υπέρηχους. Το εκχύλισμα H₂O που προήλθε από υπέρηχους έχει την χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά μόρια συγκριτικά με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα που προήλθαν με την ίδια τεχνική εκχύλισης. Σημαντική παρατήρηση είναι ότι η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις του εκχυλίσματος H₂O που προήλθε από υπέρηχους (945±31 μg GAE/mL εκχυλίσματος) είναι σχεδόν τέσσερις φορές μεγαλύτερη από την περιεκτικότητα του εκχυλίσματος H₂O που προήλθε με τεχνική εκχύλισης υποβοηθούμενη υπό πίεση (237,4±1,9 μg GAE/mL εκχυλίσματος). Το εκχύλισμα H₂O που προήλθε μέσω πίεσης είναι το πλουσιότερο σε φαινολικές ενώσεις σε σύγκριση τα υπόλοιπα υδρο-γλυκερινικά εκχυλίσματα που προήλθαν μέσω της ίδιας τεχνικής εκχύλισης. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω της πολικότητας που εμφανίζει το νερό ως διαλύτης αφού έχει την δυνατότητα να τραβάει πολικές ενώσεις όπως τα φαινολικά μόρια. Επιπλέον, παρατηρείται ότι όσο αυξάνει η ποσότητα της γλυκερίνης και μειώνεται η ποσότητα του νερού στον συνολικό όγκο διαλύτη τόσο μειώνεται η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις .



Σχήμα 3.2.1: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών που εκχυλίστηκαν με την τεχνική PELE από τα φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι, εκφρασμένης σε µg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος ανά mL εκχυλίσματος.



Σχήμα 3.2.2: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών που εκχυλίστηκαν με την τεχνική UAE από τα φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι, εκφρασμένης σε µg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος ανά mL εκχυλίσματος.

3.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ (TFC) ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (UAE) ΚΑΙ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PELE)

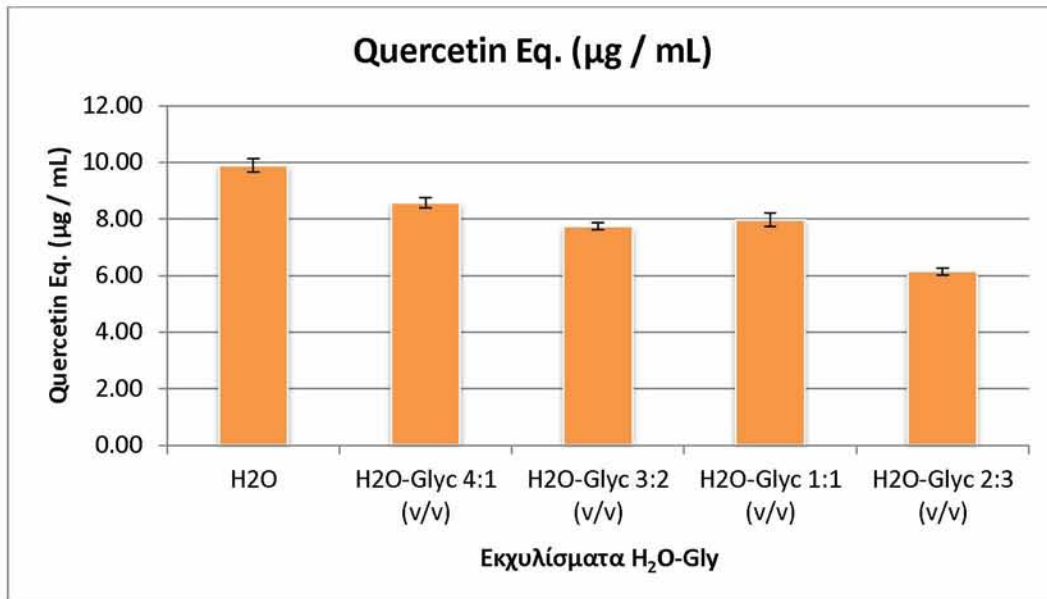
Για την εκτίμηση του περιεχομένου των φλαβονοειδών ενώσεων στα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος του χλωριούχου αργιλίου (AlCl₃). Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν επεξεργάστηκαν με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς της κερκετίνης. Επομένως, τα αποτελέσματα των φλαβονοειδών στα φυτικά εκχυλίσματα που παρατίθενται πιο κάτω είναι εκφρασμένα ως ισοδύναμα κερκετίνης (QE).

Πίνακας 3.3.1: Συγκέντρωση φλαβονοειδών ενώσεων εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων της κερκετίνης (Quercetin Equivalents, QE) ανά mL εκχυλίσματος από φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι, παραγόμενο μέσω PELE και UAE (Μέσος όρος±SD).

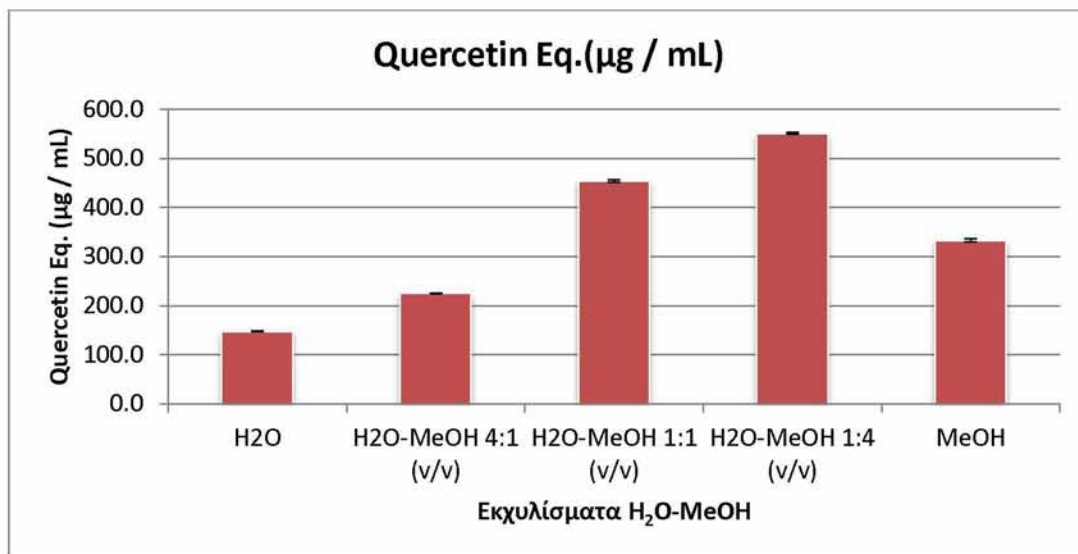
Τεχνική εκχύλισης	Δείγμα	QE (µg/mL)
PELE	H ₂ O	9,89±0.23 ^a
	H ₂ O-Glyc 4:1 (v/v)	8,58±0.18 ^b
	H ₂ O-Glyc 3:2 (v/v)	7,74±0,12 ^c
	H ₂ O-Glyc 1:1 (v/v)	7,97±0,23 ^c
	H ₂ O-Glyc 2:3 (v/v)	6,15±0,13 ^d
UAE	H ₂ O	147,7±1,0 ^e
	H ₂ O-MeOH 4:1 (v/v)	225,0±1,0 ^f
	H ₂ O-MeOH 1:1 (v/v)	453,8±3,0 ^g
	H ₂ O-MeOH 1:4 (v/v)	551,3±2,4 ^h
	MeOH	333,0±3,6 ⁱ

Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p < 0,05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

Σύμφωνα με τον πίνακα 3.3.1, τα εκχυλίσματα που έχουν παραχθεί μέσω της τεχνικής PELE και UAE ακολουθούν το μοτίβο των αποτελεσμάτων περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις. Συγκεκριμένα τα εκχυλίσματα που προήλθαν μέσω UAE είναι πλουσιότερα σε φλαβονοειδή συστατικά σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα που προήλθαν μέσω PELE. Παρατηρείται ότι το εκχύλισμα H₂O-MeOH 1:4 (v/v) έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονοειδών 551,3±2,4 µg QE/mL εκχυλίσματος και το αμέσως επόμενο εκχύλισμα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι το H₂O-MeOH 1:1 (v/v) με 453,8±3,0. Στη περίπτωση προσδιορισμού ολικών φαινολικών, παρατηρήθηκε το αντίθετο, δηλαδή το εκχύλισμα H₂O-MeOH 1:1 (v/v) είχε μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων, 1972±10 µg QE /mL εκχυλίσματος, από το εκχύλισμα H₂O-MeOH 1:4 (v/v) με συγκέντρωση 1721±27 µg QE /mL εκχυλίσματος. Επιπλέον, το εκχύλισμα H₂O που προήλθε μέσω UAE έχει την χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή 147,7±1,0 µg QE /mL εκχυλίσματος. Ωστόσο, αυτό το εκχύλισμα εμφανίζει σχεδόν δεκαπενταπλάσια συγκέντρωση συγκριτικά με το εκχύλισμα H₂O που προήλθε μέσω PELE και έχει την μεγαλύτερη συγκέντρωση (9,89±0.23 µg QE /mL εκχυλίσματος) από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα που προήλθαν μέσω της ίδιας τεχνικής εκχύλισης. Σχετικά με τα εκχυλίσματα που προήλθαν μέσω PELE, ισχύει και πάλι η μείωση της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών όσο αυξάνει η ποσότητα της γλυκερίνης στο μείγμα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε εκχύλισμα. Παρατηρείται ακόμα ότι το εκχύλισμα H₂O-Glyc 1:1 (v/v) εμφανίζει σχετικά ίδια περιεκτικότητα φλαβονοειδών (7,97±0,23 µg QE /mL εκχυλίσματος) με το εκχύλισμα H₂O-Glyc 3:2 (v/v) (7,74±0,12 µg QE /mL εκχυλίσματος), κάτι που έχει παρατηρηθεί και στα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ενώσεων (H₂O-Glyc 3:2 (v/v) και H₂O-Glyc 1:1 (v/v), 197,5±5,0 και 190,0±5,6 αντίστοιχα).



Σχήμα 3.3.1: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών συστατικών που εκχυλίστηκαν με την τεχνική PELE από τα φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι, εκφρασμένης σε µg ισοδύναμων κερκετίνης ανά mL εκχυλίσματος.



Σχήμα 3.3.2: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών συστατικών που εκχυλίστηκαν με την τεχνική UAE από τα φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι, εκφρασμένης σε µg ισοδύναμων κερκετίνης ανά mL εκχυλίσματος.

3.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ-ΑΝΤΙΡΙΖΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (UAE) ΚΑΙ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PLE) ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ DPPH'

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος DPPH'. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν επεξεργάστηκαν με

την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς της ένωσης Trolox (βιταμίνη E). Επομένως, τα αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας στα φυτικά εκχυλίσματα που παρατίθενται πιο κάτω είναι εκφρασμένα ως ισοδύναμα Trolox (TE).

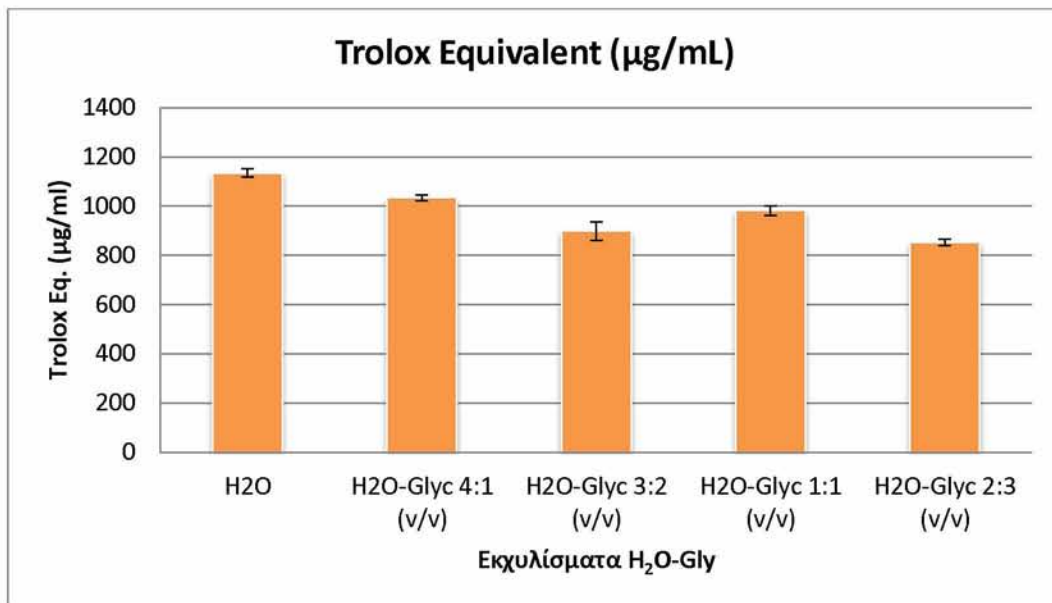
Πίνακας 3.4.1: Αντιοξειδωτική-αντιριζική ικανότητα εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων Trolox (Trolox Equivalents, TE) ανά mL εκχυλίσματος PELE και UAE από φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι (Μέσος όρος±SD)

Τεχνική εκχύλισης	Δείγμα	Trolox Equiv. (µg/mL)
PELE	H ₂ O	1134±17 ^a
	H ₂ O-Glyc 4:1 (v/v)	1034±11 ^b
	H ₂ O-Glyc 3:2 (v/v)	899±38 ^c
	H ₂ O-Glyc 1:1 (v/v)	982±20 ^d
	H ₂ O-Glyc 2:3 (v/v)	852±13 ^c
UAE	H ₂ O	3128±33 ^e
	H ₂ O-MeOH 4:1 (v/v)	3947±49 ^f
	H ₂ O-MeOH 1:1 (v/v)	6025±23 ^g
	H ₂ O-MeOH 1:4 (v/v)	6054±51 ^g
	MeOH	4978±60 ^h

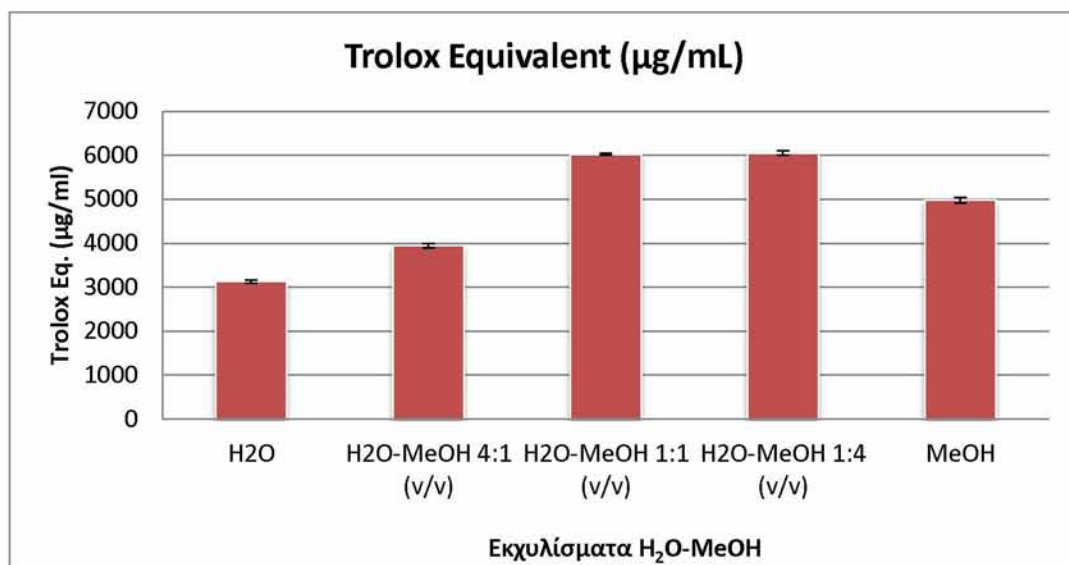
Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p < 0,05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

Όπως φαίνεται στο πίνακα 3.4.1, όλα τα εκχυλίσματα από φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας είναι πλούσια σε ισοδύναμα αντιοξειδωτικών ενώσεων και συνεπάγεται η ύπαρξη ισχυρής αντιοξειδωτικής-αντιριζικής ισχύς. Όσο πιο μεγάλη είναι η συγκέντρωση των ισοδύναμων του Trolox, τόσο αυξάνεται η ικανότητα εξουδετέρωσης των δραστικών ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια αυξάνεται και η αντιοξειδωτική-αντιριζική ισχύς των εκάστοτε εκχυλισμάτων. Όσον αφορά τα εκχυλίσματα που προήλθαν από την τεχνική εκχύλισης με υπερήχους, η συγκέντρωση των ισοδύναμων ενώσεων του Trolox είναι δραματικά αυξημένη. Τα εκχυλίσματα H₂O-MeOH 1:1 (v/v) και H₂O-MeOH 1:4 (v/v) έχουν την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ισοδύναμα αντιοξειδωτικών ενώσεων και μπορούν να θεωρηθούν ισοδύναμα σε αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ τους τα εκχυλίσματα (6025±23 και 6054±51 µg TE /mL εκχυλίσματος αντίστοιχα). Τα εκχυλίσματα που προήλθαν από UAE φαίνεται να έχουν πολύ μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα εκχυλίσματα που προήλθαν από PLE. Η ταξινόμηση κατά φθίνουσα σειρά για τις τιμές της συγκέντρωσης ισοδύναμου Trolox των εκχυλισμάτων που προήλθαν από UAE είναι η εξής: H₂O-MeOH 1:4 (v/v) > H₂O-MeOH 1:1 (v/v) > MeOH > H₂O-MeOH 4:1 (v/v) > H₂O. Αυτά τα αποτελέσματα εμφανίζουν μια θετική συσχέτιση με τα αποτελέσματα συγκέντρωσης των φλαβονοειδών αλλά και με των ολικών φαινολικών ενώσεων, δηλαδή όσο αυξάνει η συγκέντρωση των φλαβονοειδών αυξάνει και η αντιοξειδωτική ικανότητα των αντίστοιχων εκχυλισμάτων. Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και στα εκχυλίσματα που προήλθαν από PELE. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα

της αντιοξειδωτικής ισχύς εμφανίζουν θετική συσχέτιση με τις συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών και των ολικών φαινολικών ενώσεων στα αντίστοιχα εκχυλίσματα. Στην ευρύτερη επιστημονική κοινότητα επικρατεί η τοποθέτηση ότι όσο περισσότερα φαινολικά μόρια υπάρχουν σε ένα δείγμα τόσο αυξάνει και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Xia et al. 2013), αν και σε ορισμένες περιπτώσεις δεν ισχύει πάντα καθώς πιστεύεται ότι η αντιοξειδωτική δράση οφείλεται σε αντιδράσεις με άλλα χημικά μόρια που υπάρχουν στα εκχυλίσματα (Fernandes et al. 2013).



Σχήμα 3.4.1: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής-αντιριζικής ισχύς των εκχυλισμάτων που προήλθαν από την τεχνική PELE από τα φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι, εκφρασμένης σε µg ισοδύναμων Trolox ανά mL εκχυλίσματος.



Σχήμα 3.4.2: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής-αντιριζικής ισχύς των εκχυλισμάτων που προήλθαν από την τεχνική UAE από τα φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι, εκφρασμένης σε µg ισοδύναμων Trolox ανά mL εκχυλίσματος.

3.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ – ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΣΧΥΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (UAE) ΚΑΙ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PLE) ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ FRAP

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής-αναγωγικής ικανότητας στα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος FRAP. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν επεξεργάστηκαν με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς συγκεντρώσεων Fe (II) $\mu\text{g} / \text{mL}$ εκχυλίσματος.

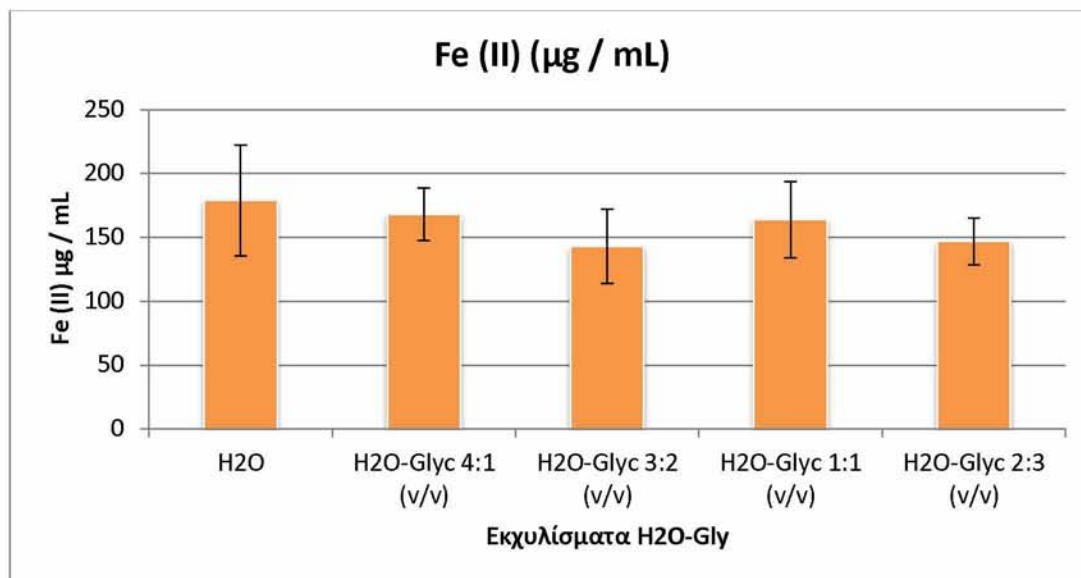
Πίνακας 3.5.1: Αντιοξειδωτική-αναγωγική ικανότητα εκφρασμένη σε $\mu\text{g Fe (II)}$ ανά mL εκχυλίσματος PELE και UAE φύλλων αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι (Μέσος όρος \pm SD).

Τεχνική εκχύλισης	Δείγμα	Fe (II) ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
PELE	H ₂ O	179 \pm 43 ^a
	H ₂ O-Glyc 4:1 (v/v)	168 \pm 20 ^a
	H ₂ O-Glyc 3:2 (v/v)	143 \pm 29 ^a
	H ₂ O-Glyc 1:1 (v/v)	164 \pm 30 ^a
	H ₂ O-Glyc 2:3 (v/v)	147 \pm 18 ^a
UAE	H ₂ O	559 \pm 41 ^b
	H ₂ O-MeOH 4:1 (v/v)	723 \pm 11 ^c
	H ₂ O-MeOH 1:1 (v/v)	798 \pm 10 ^d
	H ₂ O-MeOH 1:4 (v/v)	735 \pm 33 ^c
	MeOH	576 \pm 23 ^b

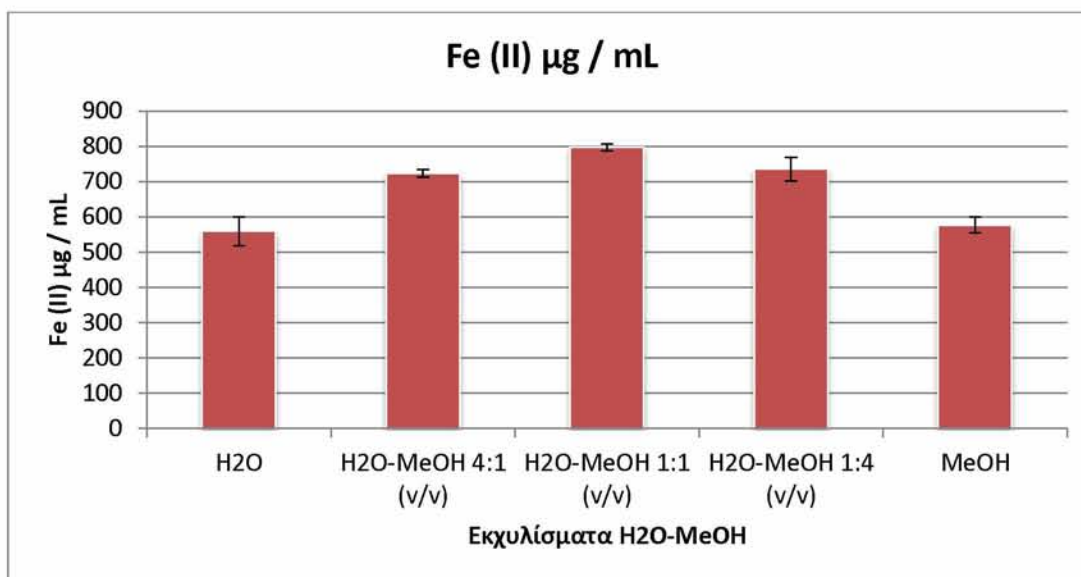
Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p < 0,05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%.

Η μέθοδος FRAP αντικατοπτρίζει την αντιοξειδωτική-αναγωγική δραστηριότητα που εμφανίζουν τα διάφορα εκχυλίσματα και συνδυαστικά μπορεί να συμπληρώσει τα αποτελέσματα της μεθόδου DPPH'. Σύμφωνα με τον πίνακα 3.5.1, τα εκχυλίσματα όπου εμφανίζουν την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική-αναγωγική δραστηριότητα, έχουν παραχθεί μέσω UAE, είναι τα H₂O-MeOH 1:1 (v/v), H₂O-MeOH 1:4 (v/v), H₂O-MeOH 4:1 (v/v) τα οποία δεν έχουν σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων H₂O-MeOH 1:1 (v/v) και H₂O-MeOH 1:4 (v/v) συμφωνούν με όλα τα παραπάνω αποτελέσματα της αντιοξειδωτικής ικανότητας, της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών και των ολικών φαινολικών. Έτσι μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η εμφανής αντιοξειδωτική-αναγωγική ισχύς των συγκεκριμένων φυτικών εκχυλισμάτων από φύλλα σταφυλιού λευκής ποικιλίας οφείλεται στις οι αυξημένες συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών αλλά και των φλαβονοειδών και επομένως υπάρχει μία θετική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων. Επίσης, μπορεί να ισχυριστεί και το αντίθετο, δηλαδή η χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων MeOH και H₂O οφείλεται στην χαμηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών. Όσον αφορά τα εκχυλίσματα με προέλευση την εκχύλιση υποβοηθούμενη υπό πίεση, παρατηρείται ότι το εκχύλισμα H₂O έχει την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική-αναγωγική ικανότητα και συμφωνεί με τα αποτελέσματα των

συγκεντρώσεων των ολικών φαινολικών, των φλαβονοειδών και της αντιοξειδωτικής-αντιριζικής ικανότητας. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα εκχυλίσματα μεταξύ τους δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντική μεταβλητότητα.



Σχήμα 3.5.1: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής-αναγωγικής ισχύς των εκχυλισμάτων που προήλθαν από την τεχνική PELE από τα φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι, εκφρασμένης σε Fe (II) µg ανά mL εκχυλίσματος.



Σχήμα 3.5.2: Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής-αναγωγικής ισχύς των εκχυλισμάτων που προήλθαν από την τεχνική UAE από τα φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι, εκφρασμένης σε Fe (II) µg ανά mL εκχυλίσματος.

Γνωρίζοντας, ότι η τεχνική εκχύλισης με υπέρηχους διευκολύνει την απελευθέρωση των μορίων που περιέχονται στα φυτικά κύτταρα διαρρηγνύοντας το κυτταρικό τοίχωμα (Mason et al. 1996), δικαιολογείται η μεγάλη αποδοτικότητα της μεθόδου. Ο πιο αποτελεσματικός συνδυασμός διαλυτών ήταν ο H₂O-MeOH 1:1 (v/v) και H₂O-MeOH 1:4 (v/v). Η δεύτερη

περίπτωση συμφωνεί και με τη διεθνή βιβλιογραφία όπου αναφέρεται ότι η αναλογία διαλυτών κοντά στο 30% H₂O- 70% MeOH δίνει την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε βιοδραστικές ενώσεις (Azmir et al. 2013). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η αναλογία διαλυτών H₂O-MeOH 1:1 (v/v) φαίνεται να επιδρά θετικά εξίσου στη παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων από εκχυλίσματα φύλλων αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι .

3.6 ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ FOLIN-CIOCALTEU (TPC), DPPH* (TAC), FRAP ΚΑΙ AlCl₃(TFC)

Για να εκτιμηθεί ο βαθμός συσχέτισης μεταξύ των τεσσάρων διαφορετικών φασματοφωτομετρικών προσδιορισμών και των εξεταζόμενων μεγεθών των δειγμάτων υπολογίστηκαν οι συντελεστές συσχέτισης αυτών κατά Pearson.

Πίνακας 3.6.1: Βαθμός συσχέτισης αποτελεσμάτων των δειγμάτων UAE.

Pearson's Correlations	F-C	TFC	DPPH	FRAP
F-C	1,000	0,856	0,895	0,916
TFC	0,856	1,000	0,973	0,640
DPPH	0,895	0,973	1,000	0,667
FRAP	0,905	0,640	0,667	1,000

Σύμφωνα με τον πίνακα 3.6.1 υπάρχει μεγάλη και θετική συσχέτιση αποτελεσμάτων μεταξύ της μεθόδου Folin-Ciocalteu (TPC) και των μεθόδων DPPH* (TAC), FRAP και AlCl₃(TFC), υποδεικνύοντας ότι η μεγάλη αντιοξειδωτική-αναγωγική ικανότητα και η μεγάλη περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή οφείλεται στη μεγάλη περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις. Είναι εμφανές ότι οι μέθοδοι AlCl₃(TFC) και DPPH* (TAC) παρουσιάζουν την μεγαλύτερη και θετική συσχέτιση, κάτι που δηλώνει ότι η τόσο μεγάλη αντιοξειδωτική-αντιριζική ικανότητα των εκχυλισμάτων αποδίδεται στην δραστικότητα των φλαβονοειδών ενώσεων που έχουν εκχυλιστεί. Αντίθετα, η αντιοξειδωτική-αναγωγική ισχύς που φαίνεται να έχουν τα εκχυλίσματα σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου FRAP παρουσιάζουν χαμηλή συσχέτιση με τα αποτελέσματα των μεθόδων AlCl₃(TFC) και DPPH* (TAC). Η χαμηλή συσχέτιση πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η αναγωγική ισχύς των εκχυλισμάτων οφείλεται σε άλλες φαινολικές ενώσεις εκτός των φλαβονοειδών όπως για παράδειγμα στυλβένια και φαινολικά οξέα (Katalinic et al. 2013, Dresch et al. 2014, Monagas et al. 2006).

Πίνακας 3.6.2: Βαθμός συσχέτισης αποτελεσμάτων των δειγμάτων PELE.

Pearson's Correlations	F-C	TFC	DPPH	FRAP
F-C	1,000	0,966	0,886	0,746
TFC	0,966	1,000	0,959	0,848
DPPH	0,886	0,959	1,000	0,961
FRAP	0,746	0,848	0,961	1,000

Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.6.2, ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων και των φλαβονοειδών ενώσεων παρουσιάζουν πολύ μεγάλη και θετική συσχέτιση, που

υποδηλώνει ότι όσο αυξάνει η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις τόσο αυξάνεται και η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή. Παρατηρούμε ότι ο προσδιορισμός της αντιριζικής ικανότητας (DPPH) παρουσιάζει μεγαλύτερη συσχέτιση με την περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή συστατικά, κάτι που υποδηλώνει ξανά ότι πιθανόν μεγαλύτερο μέρος της αντιοξειδωτική ισχύς των εκχυλισμάτων PELE αποδίδεται στα φλαβονοειδή συστατικά που υπάρχουν περισσότερο από άλλα φαινολικά συστατικά. Αντίστοιχα, παρατηρείται ότι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη μέθοδο FRAP εμφανίζει μεγαλύτερη συσχέτιση με τα αποτελέσματα της περιεκτικότητας των φλαβονοειδών ενώσεων. Στη περίπτωση των εκχυλισμάτων PELE, φαίνεται να υπάρχει πολύ μεγάλη συσχέτιση των αποτελεσμάτων της αντιοξειδωτικής ισχύς με τις μεθόδους DPPH και FRAP κάτι που δεν παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα UAE.

3.7 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ PELE

Στην παράγραφο 2.4 περιγράφηκε η διαδικασία ελέγχου της σταθερότητας των εκχυλισμάτων που προήλθαν από την τεχνική εκχύλισης PELE στις εγκαταστάσεις της εταιρίας APIVITA. Μετρήθηκε το pH και ο δείκτης διάθλασης (RI) και εκτιμήθηκαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά: όψη-χρώμα και η οσμή των πέντε εκχυλισμάτων. Τα αποτελέσματα των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών καταγράφηκαν με τη βοήθεια κλίμακας 1-9, όπου το 9 καθορίζει την μηδενική μεταβολή του εκχυλίσματος με το πέρασμα των εβδομάδων ενώ το 1 καθορίζει πολύ μεγάλη μεταβλητότητα – αλλοίωση των αρχικών χαρακτηριστικών των εκχυλισμάτων με το πέρασμα των εβδομάδων.

➤ Εκχύλισμα H₂O/PELE

Πίνακας 3.7.1: Έλεγχος σταθερότητας εκχυλισμάτων H₂O που προήλθαν μέσω της τεχνικής εκχύλισης PELE. Οι μετρήσεις αφορούν το pH και το δείκτη διάθλασης (RI) και εκτιμήθηκε η όψη-χρώμα και η οσμή των εκχυλισμάτων. Ο χρόνος λήψης των μετρήσεων ήταν: 1^η, 2^η, 3^η και 8^η εβδομάδα από την μέρα παραγωγής του κάθε εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών καταγράφηκαν με κλίμακα 1-9 (9= μηδενική μεταβολή του εκχυλίσματος, 1= πολύ μεγάλη μεταβλητότητα – αλλοίωση των αρχικών χαρακτηριστικών των εκχυλισμάτων).

Εβδομάδα	Παράμετροι	pH	RI (Brix %)	Χρώμα	Οσμή
1η Εβδομάδα	5-7°C	3,9	1,38	9	9
	25°C	3,91	1,4	9	9
	38°C	3,91	1,38	9	9
	UV	3,9	1,38	9	9
2η Εβδομάδα	5-7°C	3,91	1,37	9	9
	25°C	3,93	1,36	9	9
	38°C	3,92	1,36	9	9
	UV	3,93	1,36	9	9
3η Εβδομάδα	5-7°C	3,89	1,24	7	7
	25°C	3,9	1,23	7	7
	38°C	3,9	1,22	9	7

	UV	3,89	1,23	6	7
8η Εβδομάδα	5-7°C	3,9	1,37	7	6
	25°C	3,91	1,37	7 (αρχή ιζήματος)	6
	38°C	3,91	1,36	9 (αρχή ιζήματος)	5
	UV	3,91	1,36	6	6

Σε μηδενικό χρόνο, δηλαδή μετά την παραγωγή του εκχυλίσματος μετρήθηκε τόσο το pH όσο και ο δείκτης διάθλασης και οι τιμές ήταν 3,88 και 1,43% αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.7.1, το εκχύλισμα H₂O/PELE έχει pH γύρω στο 3,9 κατά την διάρκεια των 8 εβδομάδων του ελέγχου. Το pH ρυθμίζεται κατά την παραγωγή των εκχυλισμάτων περίπου στο 4 με προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας κιτρικού οξέως. Οι τιμές του δείκτη διάθλασης φαίνεται να παρουσιάζουν μια πολύ μικρή διακύμανση την 3^η εβδομάδα του ελέγχου, ενώ την 8^η εβδομάδα επανέρχονται στην τιμή 1,36-1,37%. Όσον αφορά το χρώμα του εκχυλίσματος, στους 38°C το χρώμα παρέμεινε αναλλοίωτο ίσως λίγο πιο έντονο από τα εκχυλίσματα στις άλλες συνθήκες αποθήκευσης, τα οποία παρουσίασαν πιο εξασθετισμένο χρώμα. Κατά την 8^η εβδομάδα παρατηρήθηκε ίζημα στις συνθήκες 25°C και 38°C. Η οσμή του εκχυλίσματος ήταν χαρακτηριστική. Συγκεκριμένα, παρέμεινε αναλλοίωτη μέχρι και την 2^η εβδομάδα ενώ την 8^η εβδομάδα εμφάνισε κάποια εξασθένηση.

➤ Εκχύλισμα H₂O-Gly 4:1 / PELE

Πίνακας 3.7.2: Έλεγχος σταθερότητας εκχυλισμάτων H₂O-Gly 4:1 που προήλθαν μέσω της τεχνικής εκχύλισης PELE. Οι μετρήσεις αφορούν το pH και το δείκτη διάθλασης (RI) και εκτιμήθηκε η όψη-χρώμα και η οσμή των εκχυλισμάτων. Ο χρόνος λήψης των μετρήσεων ήταν: 1^η, 2^η, 3^η και 8^η εβδομάδα από την μέρα παραγωγής του κάθε εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών καταγράφηκαν με κλίμακα 1-9 (9= μηδενική μεταβολή του εκχυλίσματος, 1= πολύ μεγάλη μεταβλητότητα – αλλοίωση των αρχικών χαρακτηριστικών των εκχυλισμάτων).

Εβδομάδα	Παράμετροι	pH	RI(Brix %)	Χρώμα	Οσμή
1η Εβδομάδα	5-7°C	3,92	16,28	9	9
	25°C	3,91	16,4	9	9
	38°C	3,94	17,17	9	9
	UV	3,92	16,24	9	9
2η Εβδομάδα	5-7°C	3,91	16,24	9	9
	25°C	3,92	16,22	9	9
	38°C	3,95	17,3	9	9
	UV	3,92	16,21	9	9
3η Εβδομάδα	5-7°C	3,92	16,14	7	7
	25°C	3,91	16,11	7	7
	38°C	3,93	17,2	9	7
	UV	3,91	16,05	6	7
8η Εβδομάδα	5-7°C	3,93	16,24	7	5
	25°C	3,93	16,26	7 (ίζημα)	5

	38°C	3,94	17,33	9	6
	UV	3,94	16,18	6	5

Αμέσως μετά την παραγωγή του εκχυλίσματος, μετρήθηκε το pH και ο δείκτης διάθλασης και οι τιμές ήταν 3,89 και 16,23% αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον πίνακα 3.7.2, η οξύτητα του εκχυλίσματος H₂O-Gly 4:1 /PELE κυμαίνεται γύρω στο pH 3,91-3,94 κατά την διάρκεια και των 8 εβδομάδων του ελέγχου. Το pH ρυθμίζεται κατά την παραγωγή των εκχυλισμάτων περίπου στο 4 με προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας κιτρικού οξέως όπως και στα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Δεν παρατηρείται κάποια σημαντική μεταβολή στην οξύτητα του εκχυλίσματος κατά την συνολική διάρκεια του ελέγχου. Οι τιμές του δείκτη διάθλασης στους 38°C εμφανίζουν μια πολύ μικρή αύξηση, η οποία δεν αποτελεί σημαντική μεταβολή. Όσον αφορά το χρώμα του εκχυλίσματος, στους 38°C το χρώμα παρέμεινε αναλλοίωτο ίσως λίγο πιο έντονο από τα εκχυλίσματα στις άλλες συνθήκες αποθήκευσης, τα οποία παρουσίασαν πιο εξασθετισμένο χρώμα. Το γεγονός αυτό εμφανίστηκε και στο εκχύλισμα H₂O/PELE. Κατά την 8^η εβδομάδα παρατηρήθηκε ίζημα σε μορφή μικρών κρυσταλλών στη συνθήκη αποθήκευσης στους 25°C. Η οσμή του εκχυλίσματος ήταν χαρακτηριστική. Συγκεκριμένα, η οσμή παρέμεινε αναλλοίωτη μέχρι και την 2^η εβδομάδα ενώ την 8^η εβδομάδα εμφάνισε κάποια εξασθένιση.

➤ Εκχύλισμα H₂O-Gly 3:2 / PELE

Πίνακας 3.7.3: Έλεγχος σταθερότητας εκχυλισμάτων H₂O-Gly 3:2 που προήλθαν μέσω της τεχνικής εκχύλισης PELE. Οι μετρήσεις αφορούν το pH και το δείκτη διάθλασης (RI) και εκτιμήθηκε η όψη-χρώμα και η οσμή των εκχυλισμάτων. Ο χρόνος λήψης των μετρήσεων ήταν: 1η, 2η, 3η και 8η εβδομάδα από την μέρα παραγωγής του κάθε εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών καταγράφηκαν με κλίμακα 1-9 (9= μηδενική μεταβολή του εκχυλίσματος, 1= πολύ μεγάλη μεταβλητότητα – αλλοίωση των αρχικών χαρακτηριστικών των εκχυλισμάτων).

Εβδομάδα	Παράμετροι	pH	RI(Brix %)	Χρώμα	Οσμή
1η Εβδομάδα	5-7°C	4,1	36,23	9	9
	25°C	4,1	36,31	9	9
	38°C	4,1	36,22	9	9
	UV	4	36,2	9	9
2η Εβδομάδα	5-7°C	4	36,25	9 (αρχίζει ίζημα)	9
	25°C	4,1	36,24	9	9
	38°C	4,1	36,24	9	9
	UV	4	36,22	9	9
3η Εβδομάδα	5-7°C	4	36,13	7 (ίζημα)	7
	25°C	4	36,13	7	7
	38°C	4,1	36,15	9	7
	UV	4	36,06	6	7
8η Εβδομάδα	5-7°C	4	36,25	7 (ίζημα)	7
	25°C	4,1	36,27	7	7
	38°C	4,1	36,29	9	6

	UV	4,1	36,18	6	6
--	----	-----	-------	---	---

Στη μηδενική εβδομάδα, αμέσως μετά την παραγωγή του εκχυλίσματος, μετρήθηκε το pH και ο δείκτης διάθλασης και οι τιμές ήταν 4,02 και 36,20% αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον πίνακα 3.7.3, η οξύτητα του εκχυλίσματος H₂O-Gly 3:2 /PELE κυμαίνεται γύρω στο pH 4-4,1 κατά την διάρκεια και των 8 εβδομάδων του ελέγχου. Δεν παρατηρείται κάποια σημαντική μεταβολή στην οξύτητα του εκχυλίσματος κατά την συνολική διάρκεια του ελέγχου. Οι τιμές του δείκτη διάθλασης φαίνεται να παρουσιάζουν μια πολύ μικρή διακύμανση προς τα κάτω κατά την 3^η εβδομάδα του ελέγχου, ενώ την 8^η εβδομάδα επανέρχονται στην τιμή 36,18-36,29%. Όσον αφορά το χρώμα του εκχυλίσματος, στους 38°C το χρώμα παρέμεινε αναλλοίωτο ίσως λίγο πιο έντονο από τα εκχυλίσματα στις άλλες συνθήκες αποθήκευσης, τα οποία παρουσίασαν πιο εξασθετισμένο χρώμα. Το γεγονός αυτό εμφανίσθηκε στα εκχυλίσματα H₂O/PLE και H₂O-Gly 4:1 /PELE. Κατά την 2^η εβδομάδα πρωτοεμφανίσθηκε ίζημα στους 5-7°C, το οποίο παρέμεινε μέχρι το τέλος του ελέγχου των 8 εβδομάδων. Η οσμή του εκχυλίσματος ήταν χαρακτηριστική. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι και την 2^η εβδομάδα η οσμή παρέμεινε αναλλοίωτη ενώ την 8^η εβδομάδα εμφάνισε κάποια μικρή εξασθένηση.

➤ Εκχύλισμα H₂O-Gly 1:1 / PELE

Πίνακας 3.7.4: Έλεγχος σταθερότητας εκχυλισμάτων H₂O-Gly 1:1 που προήλθαν μέσω της τεχνικής εκχύλισης PELE. Οι μετρήσεις αφορούν το pH και το δείκτη διάθλασης (RI) και εκτιμήθηκε η όψη-χρώμα και η οσμή των εκχυλισμάτων. Ο χρόνος λήψης των μετρήσεων ήταν: 1η, 2η, 3η και 8η εβδομάδα από την μέρα παραγωγής του κάθε εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών καταγράφηκαν με κλίμακα 1-9 (9= μηδενική μεταβολή του εκχυλίσματος, 1= πολύ μεγάλη μεταβλητότητα – αλλοίωση των αρχικών χαρακτηριστικών των εκχυλισμάτων).

Εβδομάδα	Παράμετροι	pH	RI(Brix %)	Χρώμα	Οσμή
1η Εβδομάδα	5-7°C	4	30,8	9	9
	25°C	4	30,9	9	9
	38°C	4	30,84	9	9
	UV	3,9	30,8	9	9
2η Εβδομάδα	5-7°C	4	30,81	9 (αρχίζει ίζημα)	9
	25°C	4	30,82	9 (αρχίζει ίζημα)	9
	38°C	4	30,85	9	9
	UV	4	30,81	9	9
3η Εβδομάδα	5-7°C	4	30,74	7 (ίζημα)	7
	25°C	4	30,76	7(αρχίζει ίζημα)	7
	38°C	4	30,79	9 (αρχίζει ίζημα)	7
	UV	4	30,75	6	7
8η Εβδομάδα	5-7°C	4	30,84	7 (ίζημα)	7
	25°C	4	30,89	7 (αρχίζει ίζημα)	7
	38°C	4	30,9	9 (αρχίζει ίζημα)	7
	UV	4	30,86	6	7

Στη μηδενική εβδομάδα, αμέσως μετά την παραγωγή του εκχυλίσματος, μετρήθηκε το pH και ο δείκτης διάθλασης και οι τιμές ήταν 3,96 και 30,80% αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον

πίνακα 3.7.4, η οξύτητα του εκχυλίσματος H₂O-Gly 1:1 /PELE κυμαίνεται γύρω στο pH 4 κατά την διάρκεια και των 8 εβδομάδων του ελέγχου. Δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στην οξύτητα του εκχυλίσματος κατά την συνολική διάρκεια του ελέγχου. Οι τιμές του δείκτη διάθλασης φαίνεται να παρουσιάζουν μια πολύ μικρή διακύμανση προς τα κάτω κατά την 3^η εβδομάδα του ελέγχου, ενώ την 8^η εβδομάδα επανέρχονται στην τιμή ≈30,90%. Όσον αφορά το χρώμα του εκχυλίσματος, στους 38°C το χρώμα ήταν λίγο πιο έντονο από τα εκχυλίσματα στις άλλες συνθήκες αποθήκευσης, τα οποία παρουσίασαν πιο εξασθετισμένο χρώμα. Το γεγονός αυτό εμφανίστηκε στα εκχυλίσματα H₂O/PELE, H₂O-Gly 4:1 /PELE και H₂O-Gly 3:2 /PELE. Κατά την 2^η εβδομάδα πρωτοεμφανίστηκε ίζημα στα εκχυλίσματα που αποθηκεύτηκαν στους 5-7°C, 25°C και την 3^η εβδομάδα στο εκχύλισμα των 38°C το οποίο παρέμεινε μέχρι το τέλος του ελέγχου των 8 εβδομάδων. Η οσμή του εκχυλίσματος ήταν χαρακτηριστική. Συγκεκριμένα, η οσμή παρέμεινε αναλλοίωτη μέχρι και την 2^η εβδομάδα ενώ την 8^η εβδομάδα εμφάνισε κάποια εξασθένηση.

➤ Εκχύλισμα H₂O-Gly 2:3 / PELE

Πίνακας 3.7.5: Έλεγχος σταθερότητας εκχυλισμάτων H₂O-Gly 2:3 που προήλθαν μέσω της τεχνικής εκχύλισης PELE. Οι μετρήσεις αφορούν το pH και το δείκτη διάθλασης (RI) και εκτιμήθηκε η όψη-χρώμα και η οσμή των εκχυλισμάτων. Ο χρόνος λήψης των μετρήσεων ήταν: 1η , 2η, 3η και 8η εβδομάδα από την μέρα παραγωγής του κάθε εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών καταγράφηκαν με κλίμακα 1-9 (9= μηδενική μεταβολή του εκχυλίσματος , 1= πολύ μεγάλη μεταβλητότητα – αλλοίωση των αρχικών χαρακτηριστικών των εκχυλισμάτων).

Εβδομάδα	Παράμετροι	pH	RI(Brix %)	Χρώμα	Οσμή
1η Εβδομάδα	5-7°C	4,1	44,02	9	9
	25°C	4,1	44	9	9
	38°C	4,1	44	9	9
	UV	4,1	43,99	9	9
2η Εβδομάδα	5-7°C	4,1	43,99	9	9
	25°C	4,1	43,99	9	9
	38°C	4,1	44	9 (αρχίζει ίζημα)	9
	UV	4,1	44	9	9
3η Εβδομάδα	5-7°C	4,1	43,94	7	7
	25°C	4,1	43,85	7	7
	38°C	4,1	43,95	9 (αρχίζει ίζημα)	7
	UV	4,1	43,98	6	7
8η Εβδομάδα	5-7°C	4,1	44,02	7	7
	25°C	4,1	43,95	7	7
	38°C	4,1	43,99	9 (αρχίζει ίζημα)	7
	UV	4,1	44,05	6	7

Σε μηδενικό χρόνο, δηλαδή μετά την παραγωγή του εκχυλίσματος μετρήθηκε τόσο το pH όσο και ο δείκτης διάθλασης και οι τιμές ήταν 4,04 και 44,01% αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.7.5, το εκχύλισμα H₂O-Gly 2:3 / PELE έχει pH γύρω στο 4,1 κατά την διάρκεια και των 8 εβδομάδων του ελέγχου. Οι τιμές του δείκτη διάθλασης φαίνεται να μην παρουσιάζουν κάποια σημαντική μεταβλητότητα με το πέρας των 8 εβδομάδων ελέγχου.

Όσον αφορά το χρώμα του εκχυλίσματος, στους 38°C το χρώμα ήταν πιο έντονο από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα που αποθηκεύτηκαν στις άλλες συνθήκες, τα οποία παρουσίασαν πιο εξασθετισμένο χρώμα. Κατά την 2^η εβδομάδα παρατηρήθηκε σχηματισμός ιζήματος στο εκχύλισμα που αποθηκευόταν στους 38°C. Το ίζημα ήταν εμφανές μέχρι το τέλος του ελέγχου σταθερότητας του εκχυλίσματος. Η οσμή του εκχυλίσματος ήταν χαρακτηριστική και αρκετά γλυκιά χάρις την αυξημένη ποσότητα γλυκερίνης που προστέθηκε κατά την παραγωγή του. Συγκεκριμένα, μέχρι και την 2^η εβδομάδα η οσμή παρέμεινε αναλλοίωτη ενώ την 8^η εβδομάδα εμφάνισε πολύ μικρή εξασθένηση.

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα οι δείκτες ποιοτικού ελέγχου pH και δείκτης διάθλασης δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική μεταβολή κατά τη διάρκεια του ελέγχου σταθερότητας των πέντε εκχυλισμάτων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει μια σχετική σταθερότητα στα εκχυλίσματα. Ωστόσο δεν φαίνεται να παρατηρείται το ίδιο στην όψη-χρώμα των εκχυλισμάτων. Τα εκχυλίσματα H₂O-Gly 3:2 / PELE και H₂O-Gly 1:1 / PELE εμφάνισαν σχηματισμό ιζήματος από την 2^η εβδομάδα έως και την 8^η εβδομάδα του ελέγχου σταθερότητας και επομένως κρίνονται ως ασταθή. Όσον αφορά το εκχύλισμα H₂O-Gly 4:1 / PELE παρατηρήθηκε σχηματισμός ιζήματος κατά την 8^η εβδομάδα στους 25°C και κρίνεται επίσης ως ασταθή εκχύλισμα. Το εκχύλισμα H₂O/PLE εμφάνισε σχηματισμό ιζήματος κατά την 8^η εβδομάδα του ελέγχου στις συνθήκες αποθήκευσης των 25°C και 38°C. Στην περίπτωση του εκχυλίσματος H₂O-Gly 2:3 / PELE, παρατηρήθηκαν ελάχιστα ίχνη ιζήματος από την 2^η μέχρι το τέλος του ελέγχου δηλαδή την 8^η εβδομάδα μόνο στη συνθήκη των 38°C. Συνεπώς, τα εκχυλίσματα H₂O / PELE και H₂O-Gly 2:3 / PELE φαίνεται να είναι τα σταθερότερα εκχυλίσματα συγκριτικά με τα υπόλοιπα που πάρθηκαν με την ίδια μέθοδο εκχύλισης. Το εκχύλισμα H₂O-Gly 2:3 / PELE μπορεί να χαρακτηριστεί ως σταθερότερο από το H₂O / PELE καθώς δεν εμφανίζει καμία διακύμανση στις μετρήσεις του δείκτη διάθλασης όπως συμβαίνει στο εκχύλισμα H₂O / PELE.

4. ΜΕΛΕΤΗ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΝΕΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΦΥΛΛΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Μελέτη Σκοπιμότητας είναι η ανάλυση μιας νέας επιχειρηματικής ιδέας ώστε να διαπιστωθεί αν θα είναι βιώσιμη επένδυση για μια υπάρχουσα εταιρία όπως η εταιρία φυσικών καλλυντικών APIVITA. Αποτελεί διαδικασία εντοπισμού προβλημάτων και ευκαιριών, εξεύρεσης κατάλληλων λύσεων καθώς και της στάθμισης μειονεκτημάτων και πλεονεκτημάτων των εναλλακτικών λύσεων. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης σκοπιμότητας είναι η ανάλυση των πλεονεκτημάτων, των κινδύνων, των ευκαιριών και του δυνητικού κόστους της παραγωγής και προώθησης φυσικών καλλυντικών που να περιέχουν εκχύλισμα από φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι (*Vitis vinifera*). Ο σχεδιασμός ενός νέου προϊόντος αποτελεί μια στρατηγική απόφαση κάθε υφιστάμενης επιχείρησης, καθώς υπάρχει τεράστιος ανταγωνισμός στην αγορά φυσικών καλλυντικών. Επιπλέον, δεν μπορούν να παραληφθούν οι αυξημένες απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού και η συνεχής μεταβολή των δεδομένων της αγοράς, σημαντικοί παράγοντες οι οποίοι εντείνουν

την πίεση των επιχειρήσεων ως προς την διαδικασία ανάπτυξης επιτυχημένων καινοτόμων προϊόντων.

Η APIVITA είναι μια αμιγώς ελληνική εταιρία φυσικών καλλυντικών που ιδρύθηκε το 1972 από δύο φαρμακοποιούς, τον Νίκο και Νίκη Κουτσιανά. Με έμπνευση την κοινωνία της μέλισσας, την βιοποικιλότητα της ελληνικής χλωρίδας και την ολιστική προσέγγιση του Ιπποκράτη για την υγεία, την ομορφιά και την ευεξία δημιούργησαν τα πρώτα τους προϊόντα. Σήμερα η APIVITA έχει αναπτύξει πάνω από τριακόσια φυσικά, αποτελεσματικά και ολιστικά προϊόντα για το πρόσωπο, το σώμα και τα μαλλιά, τα οποία εμπεριέχουν υψηλής βιολογικής αξίας μελισσοκομικά προϊόντα, εκχυλίσματα από ελληνικά βότανα, αγνά αιθέρια έλαια και πολλές πράσινες καινοτομίες και ευρεσιτεχνίες. Αποστολή της εταιρίας είναι η ανάπτυξη προϊόντων και υπηρεσιών ομορφιάς που να βασίζονται στην ελληνική φύση, στα μοναδικά μελισσοκομικά προϊόντα έτσι ώστε να προάγεται ένας ποιο φυσικός, ολιστικός και αρμονικός τρόπος ζωής. Τα προϊόντα που παράγει η APIVITA περιέχουν φυσικά συστατικά σε ποσοστό 85% έως 100%. Η εταιρία εξάγει τα προϊόντα της σε 15 χώρες της Ευρώπης, Αμερικής και της Ασίας όπως στην Ισπανία, Ιαπωνία, Χονγκ Κονγκ, Κύπρο, Ουκρανία, Ρουμανία, Βουλγαρία, Βέλγιο, Ολλανδία κ.α.

4.2 ΑΝΑΓΚΕΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗ-ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Τα τελευταία χρόνια, οι καταναλωτές έχουν περισσότερη επίγνωση σχετικά με τι περιέχουν τα προϊόντα που χρησιμοποιούν. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, όπως η ευκολία που παρέχει το διαδίκτυο και η τεχνολογία ενός κινητού τηλεφώνου ή του υπολογιστή, έτσι ώστε ο άνθρωπος ανεξαρτήτως ηλικίας να μπορεί να ερευνησει οτιδήποτε του κεντρίσει την περιέργεια. Οι καταναλωτές πλέον μπορούν να ενημερωθούν για την συσχέτιση των χημικών συστατικών που περιέχονται στα καλλυντικά προϊόντα με τις κακές επιδράσεις στον οργανισμό τους. Επομένως, έχει αυξηθεί ραγδαία η ανάγκη χρησιμοποίησης καλλυντικών προϊόντων με όσο το δυνατό λιγότερα χημικά συστατικά, δηλαδή προϊόντα φυσικής προέλευσης και με την χαμηλότερη περιβαλλοντική επιβάρυνση.

Οι αλλαγές των κλιματικών συνθηκών, η επιβάρυνση της ατμόσφαιρας με ρύπους σε συνδυασμό με το έντονο στρες που διακατέχει το σύγχρονο πολίτη έχουν άμεση επίπτωση στην υγεία του κάθε ανθρώπου. Φυσιολογικά στα ανθρώπινα κύτταρα παράγονται συνεχώς δραστικές ελεύθερες ρίζες οι οποίες εξουδετερώνονται από την άμυνα του οργανισμού. Όταν όμως ο ανθρώπινος οργανισμός είναι συνεχώς εκτεθειμένος στις επιβλαβείς συνθήκες που έχουν αναφερθεί, η παραγωγή των ελευθέρων ριζών αυξάνεται κατά πολύ, οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού δεν επαρκούν, διαδικασία που οδηγεί στη πρόκληση οξειδωτικού στρες στα κύτταρα και στους ιστούς και κατ' επέκταση στην ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών και πρόωρη γήρανση του οργανισμού. Η υπεριώδης ακτινοβολία αποτελεί ένα σημαντικό εξωτερικό παράγοντα δημιουργίας δραστικών ελευθέρων ριζών στο δέρμα, οι οποίες έχουν άμεση αρνητική επίδραση στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια με αποτέλεσμα να προκαλείται πρόωρη γήρανση του δέρματος. Η πρόωρη γήρανση του δέρματος περιλαμβάνει διάφορα συμπτώματα όπως για παράδειγμα την εμφάνιση ρυτίδων, λεπτών γραμμών, πανάδων και μείωση της ελαστικότητας του δέρματος.

Η αντιμετώπιση της πρόωρης γήρανσης μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση προϊόντων που περιέχουν συστατικά με αντιοξειδωτικές ικανότητες για την εξουδετέρωση των παραγόμενων ελευθέρων ριζών και που να παρέχουν φυσικά φίλτρα προστασίας από την UV ακτινοβολία. Ιδανικά, ο συνδυασμός της αντιοξειδωτικής δράσης φυσικών συστατικών και της αντηλιακής προστασίας του δέρματος προσδίδουν μεγάλο πλεονέκτημα σε ένα φυσικό καλλυντικό σκεύασμα. Το προϊόν αυτό έρχεται να καλύψει τις βασικές ανάγκες του καταναλωτή σχετικά με την πρόληψη της γήρανσης που εντείνεται με την υπεριώδη ακτινοβολία του ήλιου. Συμφώνα με τις ερευνητικές μελέτες που έχουν προηγηθεί στα εκχυλίσματα φύλλων από το φυτό *Vitis vinifera*, δηλαδή της αμπέλου, φάνηκε έχουν μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα και είναι πλούσια σε φλαβονοειδή συστατικά. Τα φλαβονοειδή συστατικά παράλληλα με την αντιοξειδωτική και αντιριζική δράση που έχουν, δρουν φωτοπροστατευτικά από τον ήλιο και μειώνουν τις φλεγμονώδους αντιδράσεις στα κύτταρα (Georgiev et al. 2014). Τα αποτελέσματα είναι πολύ ελπιδοφόρα για την βιομηχανία της κοσμετολογίας γιατί τα φύλλα είναι υπό-προϊόντα της διαδικασίας παραγωγής κρασιού και επομένως θα παράμεναν ανεκμετάλλευτα. Τα φυτικά εκχυλίσματα φύλλων από το φυτό *Vitis vinifera* είναι κατάλληλα ώστε να ενταχθούν σε κρέμες και ορούς προσώπου και ματιών για πρόληψη της γήρανσης, σε αντηλιακές κρέμες προσώπου και σώματος, αλλά και σε κρέμες σώματος.

4.3 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΣ

Τόσο στην εγχώρια όσο και στην διεθνή αγορά υπάρχουν καλλυντικά προϊόντα περιποίησης φυσικής προέλευσης τα οποία περιέχουν εκχύλισμα από φύλλα της αμπέλου. Στα προϊόντα περιέχεται εκχύλισμα από φύλλα της αμπέλου λευκών αλλά και ερυθρών ποικιλιών.

Πίνακας 4.3.1 Παρουσίαση καλλυντικών προϊόντων φυσικής προέλευσης που περιέχουν εκχυλίσματα από φύλλα αμπέλου και υπάρχουν σήμερα στην εγχώρια και διεθνή αγορά.

Brand	Προϊόν	Χρησιμότητα προϊόντος
Arcaya	No6 Red Wonder	Αντιγηραντική κρέμα προσώπου, κατά της ερυθρότητας
Lenga Grape Spa	Aegean grape Body Lotion	Ενυδατική κρέμα σώματος
Lenga Grape Spa	Aegean grape Shower gel	Αφρόλουτρο σώματος
Lenga Grape Spa	Aegean grape hand cream	Ενυδατική κρέμα χεριών
Helan	60+ BIO	Συσφικτική κρέμα αναδόμησης για ώριμο

		δέρμα
Peclarus	Vine leaf cream	Κρέμα για τα κάτω άκρα
CMD Naturkosmetik	Red Vine Leaf Leg Cream	Κρέμα για κουρασμένα κάτω άκρα
ORIKI	DEEP MOISTURIZING NIGHT CREAM WITH GRAPE LEAF	Κρέμα προσώπου νυκτός βαθιάς ενυδάτωσης
CASA EMMA	Antiage face cream with red grape leaf extract and olive oil	Αντιγηραντική κρέμα αναδόμησης και αναζωογόνησης
Fresh Line	Grape Shower Wash	Αφρόλουτρο σώματος

Όπως φαίνεται στο πίνακα 4.3.1 τα προϊόντα που υπάρχουν στην αγορά εστιάζουν κυρίως στην ενυδάτωση, σύσφιξη, αντιγήρανση και στην ανακούφιση των πρησμένων και κουρασμένων κάτω άκρων. Παρατηρείται ότι κανένα προϊόν μέχρι στιγμής δεν έχει αξιοποιήσει την διπλή δράση που παρέχουν τα φλαβονοειδή στα εκχυλίσματα. Η εφαρμογή των διαφόρων πειραματικές διεργασιών που εφαρμόστηκαν στη παρούσα εργασία, έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα της λευκής ποικιλίας Αθήρι είναι πλούσια σε φλαβονοειδή τα οποία έχουν πολύ μεγάλη αντιοξειδωτική και αντιριζική ικανότητα. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία τα φλαβονοειδή εκτός από την αντιριζική, αντιοξειδωτική και αντιγηραντική τους δράση φαίνεται να δρουν προστατευτικά από την βλαβερή ηλιακή ακτινοβολία. Επομένως, παρέχουν φυσικά αντηλιακά φίλτρα τα οποία μπορούν να ενσωματωθούν σε καλλυντικά προϊόντα που να συνδυάζουν τις αντιγηραντικές τους ιδιότητες με την φωτοπροστασία κάτι που προσδίδει ένα μεγάλο ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στο σχεδιασμό του νέου καινοτόμου προϊόντος.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι στην εγχώρια και διεθνή αγορά, κυκλοφορούν αντηλιακά προϊόντα φυσικής προέλευσης τα οποία περιέχουν εκχυλίσματα από τον καρπό ή τα κουκούτσια της αμπέλου. Τα προϊόντα αυτά, πιθανόν να εντείνουν τον ανταγωνισμό καθώς προέρχονται από το ίδιο είδος φυτικού υποστρώματος και είναι εξίσου πλούσια σε πολυφαινόλες.

Χάρη τον μοναδικό τρόπο καλλιέργειας και του τρόπου κλαδέματος της αμπέλου στη Σαντορίνη, τα φύλλα είναι συνεχώς εκτεθειμένα στην ηλιακή ακτινοβολία. Έτσι, αυξάνεται δραματικά η παραγωγή φαινολικών ενώσεων στα φυτικά κύτταρα ως μια μορφή αμυντικού μηχανισμού του φυτού από την ηλιακή ακτινοβολία. Οι παράγοντες αυτοί, βοηθούν στην αύξηση της περιεκτικότητας των φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα των φύλλων της αμπέλου τα οποία πρόκειται να ενταχθούν σε νέα, ανταγωνιστικά, καινοτόμα προϊόντα ομορφιάς.

4.4 ANALΥΣΗ SWOT

Η ανάλυση SWOT αποτελεί ένα καλό εργαλείο αποτύπωσης της υφιστάμενης κατάστασης κατά την οποία επιχειρείται η γέννηση μιας νέας ιδέας. Κατ' αυτό τον τρόπο μελετώνται τα δυνατά (Strengths) και αδύνατα (Weaknesses) σημεία τις νέας επιχειρηματικής ιδέας καθώς και οι ευκαιρίες (Opportunities) και οι απειλές (Threats) που υπάρχουν. Τα δυνατά και αδύνατα σημεία αφορούν το εσωτερικό περιβάλλον της επιχειρηματικής ιδέας, ενώ οι ευκαιρίες και οι απειλές το εξωτερικό περιβάλλον της επιχειρηματικής ιδέας.



Στη παρούσα μελέτη σκοπιμότητας, αποτυπώνονται οι ευκαιρίες, οι απειλές, τα δυνατά και τα αδύνατα σημεία της ένταξης φυτικών εκχυλισμάτων από φύλλα αμπέλου (*Vitis vinifera*) λευκής ποικιλίας Αθήρι σε νέα καλλυντικά προϊόντα φυσικής προέλευσης τα οποία θα παρέχουν αντηλιακή προστασία και αντιοξειδωτική προστασία προλαμβάνοντας την γήρανση του δέρματος.

	ΒΟΗΘΟΥΝ ΤΗΝ ΕΠΙΤΕΥΞΗ ΤΩΝ ΣΤΟΧΩΝ	ΕΜΠΟΔΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΠΙΤΕΥΞΗ ΤΩΝ ΣΤΟΧΩΝ
Εσωτερικοί παράγοντες	<ul style="list-style-type: none"> Τα φυτικά εκχυλίσματα από φύλλα αμπέλου έχουν μεγάλη αντιοξειδωτική και αντιριζική ικανότητα και είναι πλούσια σε πολυφαινόλες π.χ. φλαβονοειδή συστατικά Τα φυτικά εκχυλίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλη γκάμα προϊόντων Τα φυτικά εκχυλίσματα μπορούν να αξιοποιηθούν από νέα σειρά προϊόντων αλλά και να ενσωματωθούν σε ήδη υπάρχον σειρές προϊόντων. Η παραγωγή των εκχυλισμάτων και των νέων προϊόντων μπορεί να γίνει στις εγκαταστάσεις (εργαστήρια, ανθρώπινο δυναμικό, παραγωγή κλπ.) της υφιστάμενης εταιρίας APIVITA 	<ul style="list-style-type: none"> Στην Ελλάδα δεν υπάρχει η απαραίτητη κατάρτιση για την εφοδιαστική αλυσίδα των φύλλων της αμπέλου. Έλλειψη υποδομών συλλογής και φύλαξης του φυτικού υποστρώματος. Υψηλό κόστος φυτικού υποστρώματος με προέλευση τη Σαντορίνη λόγω της ειδικής μεταχείρισης που χρειάζεται στη συλλογή, αποθήκευση και μεταφορά του μέχρι τις εγκαταστάσεις της εταιρίας.
Εξωτερικοί παράγοντες	<ul style="list-style-type: none"> Η αγορά των φυσικών καλλυντικών εμφανίζει μεγάλη ανάπτυξη παγκοσμίως. Οι καταναλωτές στρέφονται προς ένα πιο «φυσικό» τρόπο ζωής με σεβασμό προς το περιβάλλον. Περιορισμένος αριθμός προϊόντων με βιοδραστικά συστατικά από φύλλα αμπέλου στην αγορά. Η APIVITA είναι μία διεθνώς αναγνωρισμένη εταιρία καλλυντικών 	<ul style="list-style-type: none"> Αντιγραφή ιδέας από άλλες εταιρίες φυσικών καλλυντικών προϊόντων. Στην αγορά υπάρχουν προϊόντα με εκχυλίσματα από το καρπό και τα κουκούτσια της αμπέλου τα οποία είναι εξίσου πλούσια σε πολυφαινόλες. Πιθανόν ο καταναλωτής να μην γνωρίζει τις ευεργετικές ιδιότητες που έχουν τα φύλλα της αμπέλου. Θα χρειαστεί πολύ καλή προώθηση ώστε ο

	<p>προϊόντων φυσικής προέλευσης.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω κάποια πιθανή συνεργασία με βιομηχανία οινοποιίας ή με αμπελουργούς ώστε να γίνει εκμετάλλευση των φύλλων της αμπέλου. Η διαδικασία αυτή θα ωφελήσει και τις δύο γραμμές παραγωγής, καθώς θα μειωθούν τα «απόβλητα» της βιομηχανίας οινοποιίας για να χρησιμοποιηθούν προς όφελος της εταιρίας παραγωγής φυσικών καλλυντικών. 	<p>καταναλωτής να πληροφορηθεί για τις ευεργετικές ιδιότητες των φύλλων της αμπέλου προκειμένου να εμπιστευτεί τα προϊόντα στα οποία θα εμπεριέχονται τα νέα εκχυλίσματα.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Η οικονομική κρίση μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τις πωλήσεις νέων προϊόντων ή του εκχυλίσματος.
--	---	---

4.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΓΟΡΑΣ

4.5.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ-ΑΓΟΡΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Η αγορά των καλλυντικών προϊόντων μπορεί να διαχωριστεί ανάλογα με την κατηγορία των καλλυντικών, το κανάλι πώλησης των καλλυντικών, το φύλο και την γεωγραφική κατανομή. Οι κατηγορίες των καλλυντικών διαχωρίζονται ανάλογα με το μέρος του σώματος για το οποίο προορίζεται η χρήση τους και περιλαμβάνει προϊόντα περιποίησης προσώπου, προϊόντα περιποίησης σώματος, προϊόντα περιποίησης μαλλιών, αποσμητικά προϊόντα, προϊόντα μακιγιάζ και αρώματα. Μεταξύ αυτών, τα επικρατέστερα στην διεθνή αγορά είναι τα προϊόντα περιποίησης προσώπου και μαλλιών και αντιηλιακής προστασίας. Τα κανάλια διανομής και πώλησης στην Ελληνική αγορά αλλά και στο εξωτερικό είναι τα εξής: Ευρεία διανομή, επιλεκτική διανομή, φαρμακεία, κομμωτήρια και online καταστήματα. Η ευρεία διανομή καλλυντικών προϊόντων περιλαμβάνει τα σούπερ μάρκετ, μεγάλες αλυσίδες καλλυντικών (π.χ. Sephora, Hondos Center κλπ.), μεμονωμένα καταστήματα ή πολυκαταστήματα (π.χ. Attica beauty shop), ενώ η επιλεκτική διανομή περιλαμβάνει καλλυντικά προϊόντα γνωστών εταιριών του εξωτερικού που διατίθενται στο πελάτη αποκλειστικά και μόνο από τις αλυσίδες και τα καταστήματα καλλυντικών.

Οι παραπάνω κατηγορίες μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω βάση των συστατικών που περιέχονται στο προϊόν. Συγκεκριμένα υπάρχουν τα εξής:

- 🚩 Καλλυντικά προϊόντα με χημικά συστατικά
- 🚩 Καλλυντικά προϊόντα με χημικά και φυσικά συστατικά
- 🚩 Καλλυντικά προϊόντα με δραστικά συστατικά φυσικής προέλευσης ή φυσικά καλλυντικά (μπορεί να περιέχουν ελάχιστη ποσότητα χημικών συστατικών)

Η κατηγορία των φυσικών καλλυντικών αποτελεί ένα πολύ μικρό κομμάτι στην βιομηχανία των καλλυντικών, το οποίο φαίνεται να αναπτύσσεται με γοργούς ρυθμούς την τελευταία δεκαετία. Η «Grand View Research» δημοσίευσε ότι η αξία των πωλήσεων των φυσικών καλλυντικών μέχρι το 2024 θα έχει φτάσει τα \$22 δισεκατομμύρια, γεγονός που δίνει πρόσφορο έδαφος στις υφιστάμενες επιχειρήσεις ώστε να επενδύσουν σε ανάπτυξη νέων προϊόντων αλλά και σε νέες επιχειρήσεις που επιθυμούν να ενταχθούν στο τομέα των φυσικών καλλυντικών. Τα πιο πάνω στατιστικά δείχνουν μία αύξηση της αξίας των πωλήσεων 8-10% κάθε χρόνο. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν ότι η τάση που επικρατεί τα τελευταία χρόνια για ένα πιο «φυσικό» τρόπο ζωής με σεβασμό προς το περιβάλλον δεν

είναι κάτι προσωρινό αλλά κάτι που ενδέχεται να αφομοιωθεί πλήρως από την παγκόσμια αγορά σε βάθος χρόνου.

Στο κλάδο των καλλυντικών δραστηριοποιείται ένας μεγάλος αριθμός επιχειρήσεων, όπου οι περισσότερες από αυτές ασχολούνται με περισσότερες από μία κατηγορίες καλλυντικών. Στην Ελλάδα, υπάρχουν πάρα πολλές θυγατρικές εταιρίες μεγάλων ομίλων του εξωτερικού. Κάποιες από αυτές τις πολυεθνικές επιχειρήσεις έχουν παραγωγική μονάδα στην Ελλάδα, αφού εξασφαλίσουν άδεια από την μητρική εταιρία. Αξίζει να σημειωθεί ότι τις τελευταίες δεκαετίες έχουν δημιουργηθεί πολλές Ελληνικές επιχειρήσεις καλλυντικών με σημαντική θέση τόσο στην Ελληνική όσο και στην Παγκόσμια αγορά. Κύριος ανταγωνιστής της εταιρίας APIVITA στην Ελλάδα είναι η ελληνική εταιρία KORRES φυσικών καλλυντικών η οποία παρουσιάζει εξίσου σημαντική εγχώρια και εξαγωγική δράση.

4.5.2 ΑΓΟΡΑ-ΣΤΟΧΟΣ

Ο τομέας των φυσικών καλλυντικών επεκτείνεται σε διεθνείς αγορές διαφορετικού επιπέδου ανάπτυξης κάτι που χρειάζεται να μελετηθεί προσεκτικά προκειμένου να υπάρχει ξεκάθαρη εικόνα. Οι τρεις βασικές αγορές στις οποίες παρουσιάζουν άνθηση οι πωλήσεις των φυσικών καλλυντικών είναι η Ευρώπη, η Ασία και οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής. Σύμφωνα με την «Grand View Research», η Ευρώπη είναι η δεύτερη μεγαλύτερη αγορά φυσικών καλλυντικών με πρωτοπόρους την Γαλλία και την Γερμανία όπου εκτός από την τεράστια αγορά που κατέχουν στον τομέα, έχουν την δυναμική να καθορίζουν μαζί με τις ΗΠΑ τις νέες τάσεις στο τομέα της κοσμετολογίας ανά το παγκόσμιο. Όλες αυτές οι χώρες κατόρθωσαν σημαντική αύξηση στις πωλήσεις των φυσικών καλλυντικών τα τελευταία χρόνια. Σημαντική παρατήρηση είναι η εμφάνιση μεγάλης αύξησης των πωλήσεων των πιστοποιημένων εταιριών φυσικών καλλυντικών, κάτι που αποδεικνύει ότι όσο «ωριμάζει» ο τομέας των φυσικών καλλυντικών στην αγορά, τόσο αυξάνουν οι απαιτήσεις και τα κριτήρια των καταναλωτών όσον αφορά τις επιλογές τους. Σύμφωνα με γερμανική έρευνα «Natural Cosmetics Annual Report 2014», η Γερμανική αγορά αυξήθηκε κατά 10% το 2013-2014 φτάνοντας τις πωλήσεις των φυσικών καλλυντικών να αγγίζουν το €1 δισεκατομμύριο για πρώτη φορά. Από τότε η Γερμανία έχει τη κυρίαρχη θέση στην αγορά των φυσικών καλλυντικών σε όλη την Ευρώπη και αναμένεται ακόμη μεγαλύτερη και επιτυχής ανάπτυξη. Η τεράστια αυτή επιτυχία οφείλεται κυρίως στην ανάπτυξη του σχεδίου μάρκετινγκ της εκάστοτε χώρας. Μαζί με την Ευρώπη πορεύεται και η Βόρεια Αμερική, καθώς φαίνεται να εμφανίζει σημαντική αύξηση ζήτησης φυσικών καλλυντικών και κατ' επέκταση των μεγάλη αύξηση πωλήσεων. Από την άλλη μεριά, η αγορά της Ασίας (Ιαπωνία, Ινδία και Κίνα) βρίσκεται σε διαφορετικό στάδιο ανάπτυξης στο τομέα των φυσικών καλλυντικών. Στην Ασία οι πωλήσεις των φυσικών καλλυντικών παρουσίασαν αύξηση κατά 15% το 2013, γεγονός που αποδεικνύει το ευνοϊκό περιβάλλον και την δυναμική του κλάδου στις χώρες αυτές. Οι ρυθμοί ανάπτυξης του κλάδου των φυσικών καλλυντικών στις αγορές της Ευρώπης, της Βορείου Αμερικής και της Ασίας είναι δραματικά ανεβασμένοι και δεν δείχνουν σημάδια εξασθένησης. Επομένως, οι αγορές της Ευρώπης, της Βορείου Αμερικής και της Ασίας έχουν την δυναμική να δεχθούν νέα προϊόντα που να περιέχουν εκχυλίσματα από φύλλα αμπέλου, ωστόσο πρέπει να ληφθεί υπόψη το στάδιο ανάπτυξης του κλάδου σε κάθε χώρα ο οποίος φαίνεται να διαφέρει. Έτσι, με βάση αυτή την διαφοροποίηση που

εμφανίζεται πρέπει να διαφοροποιηθεί αντίστοιχα η τοποθέτηση και η προώθηση των προϊόντων στην αγορά.

4.5.3 ΠΡΟΦΙΛ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗ- TARGET GROUP

Η καταγραφή του προφίλ του καταναλωτή-στόχου των φυσικών καλλυντικών αποτελεί μια πολυδιάστατη και δύσκολη διαδικασία. Αρχικά, πρέπει να διερευνηθεί η ευρύτερη αγορά ανά γεωγραφική ζώνη γιατί, όπως έχει αναφερθεί, διαφέρει το στάδιο ανάπτυξης και δυναμικής της κάθε αγοράς η οποία δύναται να υποστηρίξει νέα φυσικά καλλυντικά προϊόντα. Συγκεκριμένα, ο Αμερικανός καταναλωτής αντιλαμβάνεται διαφορετικά την έννοια «φυσικά» καλλυντικά προϊόντα από τον Ασιάτη καταναλωτή, κάτι που αποδεικνύει την διαφοροποίηση τόσο στην αντίληψη του όσο και στην νοοτροπία του καταναλωτή.

Σε γενικές γραμμές, το αντιπροσωπευτικό προφίλ του καταναλωτή για τον τομέα των φυσικών καλλυντικών αποτελεί αναμφισβήτητη η γυναίκα ηλικίας 17-75, μεσαίας με υψηλής οικονομικής τάξης με υψηλό μορφωτικό επίπεδο. Τα τελευταία χρόνια εμφανίζουν ενδιαφέρον προς τα φυσικά καλλυντικά και οι άντρες, όμως σε αρκετά μικρότερο ποσοστό συγκριτικά με τις γυναίκες. Ο γυναικείος πληθυσμός αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό του καταναλωτικού κοινού και που δεν έχει σταματήσει να είναι φιλάρεσκος και επομένως δεν έχει σταματήσει να δαπανεί ετησίως σημαντικά κονδύλια. Επιπλέον, βασικό χαρακτηριστικό του αντιπροσωπευτικού καταναλωτή είναι η επίγνωση των βλαβερών επιπτώσεων που έχουν τα χημικά συστατικά των περισσότερων καλλυντικών προϊόντων στον οργανισμό αλλά και η αναγνώριση των ευεργετικών ιδιοτήτων που έχουν τα φυσικά δραστικά συστατικά των φυτικών εκχυλισμάτων. Τέλος, αναμφίβολα ο καταναλωτής χρειάζεται να έχει σεβασμό προς το περιβάλλον και να εκτιμά τις εταιρίες οι οποίες δεν το επιβαρύνουν με κάθε δυνατό τρόπο.

Η λανθασμένη σκιαγράφηση του αντιπροσωπευτικού καταναλωτή όσον αφορά τα χαρακτηριστικά και τις ανάγκες του μπορεί να αποβεί μοιραία για την προώθηση των προϊόντων και ουσιαστικά να λειτουργήσει ως απειλή προς τις πωλήσεις των προϊόντων. Αντίθετα, η ορθή «αποκωδικοποίηση» του δυνητικού πελάτη αποτελεί σημαντική παράμετρο που τελικά θα δώσει τρομερό ανταγωνιστικό πλεονέκτημα τόσο στα νέα προϊόντα όσο και στην εταιρία που τα παράγει.

4.5.4 ΚΑΝΑΛΙΑ ΔΙΑΝΟΜΗΣ-ΠΩΛΗΣΗΣ

Όλες οι εταιρίες που ασχολούνται με το τομέα των καλλυντικών χρησιμοποιούν διάφορα κανάλια διανομής και πώλησης, πάντα ανάλογα με το είδος του προϊόντος που επιθυμούν να προωθήσουν. Μερικές από αυτές τις επιλογές είναι τα σουπερμάρκετ, μεγάλες αλυσίδες καταστημάτων, επιλεγμένα καταστήματα, φαρμακεία, κομμωτήρια, online καταστήματα κλπ. Όσον αφορά φυτικά εκχυλίσματα από φύλλα αμπέλου, ο καταναλωτής ή οποιαδήποτε επιχείρηση μπορεί να τα προμηθευτεί κυρίως από online καταστήματα (π.χ. www.alibaba.com). Τα καλλυντικά προϊόντα φυσικής προέλευσης που περιέχουν εκχυλίσματα από φύλλα αμπέλου είναι περιορισμένα στην αγορά. Ο καταναλωτής μπορεί να τα προμηθευτεί κυρίως από online καταστήματα φυτικών προϊόντων σε επιλεγμένα καταστήματα και φαρμακεία. Πάρα πολλές εταιρίες παγκοσμίως χρησιμοποιούν αυτά τα

κανάλια διανομής έτσι ώστε να φτάσουν τα προϊόντα τους στον καταναλωτή με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Ένας άλλος αποτελεσματικός τρόπος διανομής των προϊόντων που περιέχουν φυτικό εκχύλισμα από φύλλα σταφυλιού είναι τα καταστήματα της ίδιας της εταιρίας έτσι ώστε να υπάρχει πλήρης έλεγχος στο τρόπο προώθησής τους. Αρνητικό στοιχείο στον παραπάνω τρόπο είναι η μεγάλη δαπάνη χρόνου, χρημάτων, ανθρωπίνου δυναμικού κατάλληλα εκπαιδευμένο κλπ. Από την άλλη μεριά, ο τρόπος αυτός έχει να προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα. Η άμεση διανομή από τα καταστήματα της εταιρίας προσφέρει πλήρη έλεγχο όσον αφορά τον τρόπο με τον οποίο θα ενταχθεί το νέο προϊόν στην αγορά. Έτσι, το ανθρώπινο δυναμικό θα είναι σε θέση να καταλάβει τις ανάγκες και τις απαιτήσεις του κάθε καταναλωτή. Ακόμα, υπάρχει δυνατότητα προώθησης των νέων προϊόντων σε καταναλωτές οι οποίοι δεν έχουν δείξει ενδιαφέρον ως προς τα προϊόντα με εκχύλισμα από φύλλα σταφυλιού που όμως αγαπάνε και αγοράζουν φυσικά καλλυντικά. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας νέας ομάδας αντιπροσωπευτικού καταναλωτή, πράγμα που καθίσταται εξαιρετικά σημαντικό για την μελλοντική εξάπλωση των προϊόντων στην διεθνή αγορά.

4.6 ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

4.6.1 ΠΗΓΕΣ ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ

Κάθε νέα επιχειρηματική ιδέα ή δραστηριότητα, όταν φτάσει στο σημείο υλοποίησης της αντιμετωπίζει το πρόβλημα της χρηματοδότησης της ιδέας. Οι πιο συνηθισμένες πηγές χρηματοδότησης μιας επιχείρησης είναι η τράπεζα, η κρατικές επιχορηγήσεις, επενδυτές, φίλοι, οικογένεια κλπ. Στη περίπτωση όμως της εταιρίας APIVITA η οποία διαθέτει μια καλά εδραιωμένη γραμμή παράγωγης προϊόντων που θέλει να επεκτείνει την παραγωγική διαδικασία σε νέα προϊόντα τα πράγματα είναι λίγο διαφορετικά. Μία νέα επιχειρηματική ιδέα για δημιουργία νέας σειράς προϊόντων που να περιέχουν φυτικά εκχυλίσματα από φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι, δεν συνεπάγεται ότι η εταιρία ξεκινάει από μηδενική βάση. Κατά αυτόν τον τρόπο, οι ήδη υπάρχουσες εγκαταστάσεις παραγωγής και το ανθρώπινο δυναμικό μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την υλοποίηση τις νέας ιδέας χωρίς να χρειαστεί να γίνουν τεράστιες δαπάνες κεφαλαίων ή λήψης δανείου. Το γεγονός αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό στοιχείο για την εταιρία, καθώς διανύουμε μια ασταθής οικονομικά περίοδο στην Ελλάδα.

4.6.2 ΚΕΦΑΛΑΙΑΚΕΣ ΑΝΑΓΚΕΣ

Ακόμα ένα σημαντικό βήμα είναι η καταγραφή του κεφαλαίου που κρίνεται απαραίτητο για την επιτυχημένη υλοποίηση της επιχειρηματικής ιδέας. Το κεφάλαιο μπορεί να καταγραφεί ως οι αναγκαίες εγκαταστάσεις που χρειάζονται, τα εργαστήρια, ο εξοπλισμός, το ανθρώπινο δυναμικό κλπ. Η διαδικασία αυτή πρέπει να γίνεται ως το πρώτο βήμα πριν την έρευνα για κάποια πηγή χρηματοδότησης ώστε να αποτυπωθούν οι ακριβείς ανάγκες προκειμένου να αποφευχθούν τα λάθη που πιθανόν να αποβούν μοιραία για την εταιρία.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση, η υφιστάμενη εταιρία παραγωγής φυσικών καλλυντικών έχει τις εγκαταστάσεις, τα εργαστήρια και το ανθρώπινο δυναμικό που απαιτεί η υλοποίηση της παραγωγής νέων προϊόντων βασισμένα σε εκχύλισμα φύλλων σταφυλιού, γεγονός που προσδίδει μεγάλο πλεονέκτημα τόσο στην εταιρία όσο και στο δυνητικό προϊόν. Επομένως, η παραγωγή νέων προϊόντων δεν θα χρειάζεται μεγάλες νέες δαπάνες οι οποίες θα ήταν απαραίτητες στην αντίθετη περίπτωση. Στη παρούσα φάση, το πιο πιθανό κόστος που θα υποστεί η εταιρία είναι το κόστος ευκαιρίας το οποίο υφίσταται όταν η παραγωγή του νέου προϊόντος θα προκαλέσει αναγκαστική μείωση της ταχύτητας παραγωγής των υπόλοιπων προϊόντων.

4.6.3 ΚΟΣΤΟΣ ΚΑΙ ΜΙΚΤΟ ΠΕΡΙΘΩΡΙΟ ΚΕΡΔΟΥΣ

Το κόστος παραγωγής ενός προϊόντος μπορεί να διαχωριστεί σε δύο κύριες κατηγορίες, το σταθερό κόστος και το μεταβλητό κόστος που αφορά το προϊόν που θα αναπτυχθεί. Το σταθερό κόστος περιλαμβάνει το κόστος της συσκευασίας, το κόστος του ονόματος της εταιρίας (label), το κόστος της μεταφοράς και το κόστος της παραγωγής του προϊόντος. Το σταθερό κόστος είναι παρόμοιο με αυτό των υπόλοιπων προϊόντων που παράγει η υφιστάμενη εταιρία και για αυτό το λόγο δεν είναι υψίστης σημασίας στη παρούσα φάση. Από την άλλη, το μεταβλητό κόστος που αφορά το προϊόν που θα δημιουργηθεί είναι πολύ σημαντική παράμετρος. Το κόστος αυτό επηρεάζεται άμεσα από την τιμή της πρώτης ύλης που θα χρησιμοποιηθεί (φύλλα αμπέλου ποικιλίας Αθήρι) και τη ποσότητα της πρώτης ύλης που θα ενταχθεί στα 100g νέου προϊόντος. Το κόστος της πρώτης ύλης που μελετήθηκε στη παρούσα εργασία είναι €80 ανά κιλό και η ποσότητα που συνηθίζεται να εντάσσεται στα προϊόντα κυμαίνεται 0.1-2%. Το μικτό περιθώριο κέρδους στη συγκεκριμένη περίπτωση επηρεάζεται άμεσα τόσο από την τιμή της πρώτης ύλης όσο και από την ποσότητα που θα ενταχθεί στο τελικό προϊόν.

4.6.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΕΚΡΟΥ ΣΗΜΕΙΟΥ

Η ανάλυση του Νεκρού Σημείου είναι ένα από τα σημαντικότερες οικονομικές παραμέτρους που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά το σχεδιασμό μιας νέας επιχειρηματικής ιδέας. Το Νεκρό Σημείο είναι το σημείο εκείνο των πωλήσεων, με το οποίο μια επιχείρηση καλύπτει τα σταθερά όσο και τα μεταβλητά της έξοδα χωρίς να πραγματοποιηθεί ούτε κέρδος ούτε ζημία. Υπολογίζει τον αριθμό των προϊόντων που πρέπει να πωληθούν, ώστε να καλυφθεί εξολοκλήρου το κόστος παραγωγής. Στην περίπτωση της υφιστάμενης εταιρίας η οποία διαθέτει ολοκληρωμένη γραμμή παραγωγής προϊόντων το σταθερό κόστος που δημιουργείται είναι αρκετά χαμηλό. Επομένως, το Νεκρό Σημείο της εταιρίας αναμένεται να παραμείνει στα ίδια επίπεδα πωλήσεων χωρίς κάποια σημαντική διαφορά. Άρα, με τις πρώτες πωλήσεις του νέου προϊόντος πρόκειται να καλυφτούν τα επιπλέον σταθερά έξοδα της εταιρίας, με αποτέλεσμα να αρχίζει να δημιουργείται κέρδος. Το γεγονός αυτό προσδίδει μεγάλη δυναμική στην υφιστάμενη εταιρεία συγκριτικά με μία νέα εταιρία η οποία θα είχε πολύ αυξημένα σταθερά έξοδα, λόγω της αναγκαιότητας εγκαταστάσεων κλπ., η οποία θα έπρεπε να κάνει πολύ περισσότερες πωλήσεις για να τα καλύψει.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Τα φύλλα αμπέλου αποτελούν ένα πολύ υποσχόμενο φυτικό υπόστρωμα για την μελλοντική παραγωγή νέων φυσικών καλλυντικών προϊόντων καθώς από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα εμφανίζει ιδιαίτερες ευεργετικές ιδιότητες.
- Τα εκχυλίσματα από φύλλα αμπέλου λευκής ποικιλίας Αθήρι τα οποία ξεχώρισαν είναι τα H₂O (PELE), H₂O-MeOH 1:1 (UAE) και H₂O-MeOH 1:4 (UAE). Τα εκχυλίσματα αυτά εμφανίζουν τα βέλτιστα αποτελέσματα καθώς είναι τα πλουσιότερα σε φαινολικές ενώσεις και σε φλαβονοειδή και έχουν την υψηλότερη αντιριζική και αντιοξειδωτική δραστηριότητα.
- Τα ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα που προσδίδει η αξιοποίηση των εκχυλισμάτων από φύλλα της αμπέλου στο σχεδιασμό ενός νέου καινοτόμου προϊόντος φυσικής προέλευσης είναι τα εξής :

- ✓ Φυσικά αντηλιακά φίλτρα
- ✓ Πρόληψη γήρανσης του δέρματος

Η διπλή δράση που φαίνεται να έχουν τα εκχυλίσματα των φύλλων της ποικιλίας Αθήρι πιθανόν να οφείλεται στη πλούσια περιεκτικότητά τους σε φλαβονοειδή ενώσεις.

- Το νέο καλλυντικό προϊόν ομορφιάς μπορεί να ενταχθεί στις αγορές της Ευρώπης, Ασίας και Βόρειου Αμερικής καθώς οι ρυθμοί ανάπτυξης του κλάδου των φυσικών καλλυντικών σε αυτές τις ηπείρους είναι δραματικά ανεβασμένοι και δεν δείχνουν σημάδια εξασθένισης. Η τεράστια άνθιση του τομέα των φυσικών καλλυντικών οφείλεται κυρίως στην στροφή των καταναλωτών προς ένα πιο φυσικό τρόπο ζωής με όσο το δυνατό λιγότερη επαφή με βλαβερά χημικά συστατικά και πάντα με σεβασμό προς το περιβάλλον.
- Στη διεθνή αγορά έχει δημιουργηθεί ένα ευνοϊκό περιβάλλον στο οποίο μπορεί να ενταχθεί ένα νέο καινοτόμο φυσικό καλλυντικό προϊόν που να περιέχει εκχύλισμα από φύλλα αμπέλου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Azmir, J. et al., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), pp.426–436
- Benzie, I. & Strain, J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), pp.70–6
- Berichte, U.N.D. & Pharmazeutischen, D.E.R.D., 1989. *Archiv pharmazie.* , 4760(1956), pp.8–11.
- Bondet, V., Brand-Williams, W. & Berset, C., 1997. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*, 30(6), pp.609–615
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), pp.25–30
- Brewer, M.S., 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), pp.221–247.
- Carabias-Martínez, R. et al., 2005. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *Journal of Chromatography A*, 1089(1–2), pp.1–17.
- Carrera, C. et al., 2012. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, pp.100–104
- Casazza, A.A. et al., 2010. Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering*, 100(1), pp.50–55
- Cheynier, V., 2012. Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11(2–3), pp.153–177
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), pp.564–82
- Crozier, A., Jaganath, I.B. & Clifford, M.N., 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product reports*, 26(8), pp.1001–1043.
- Devasagayam, T. et al., 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*, (November 2004), pp.291–97.
- Dresch, R.R. et al., 2014. Phenolic Compounds from the Leaves of *Vitis labrusca* and *Vitis vinifera* L. as a Source of Waste Byproducts: Development and Validation of LC Method and Antichemotactic Activity. *Food Analytical Methods*, 7(3), pp.527–539.
- Fernandes, F. et al., 2013. *Vitis vinifera* leaves towards bioactivity. *Industrial Crops and Products*, 43(1), pp.434–440
- Georgiev, V., Ananga, A. & Tsolova, V., 2014. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, 6(1), pp.391–415.
- Ghafoor, K. et al., 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), pp.4988–4994.
- Halliwel, B. & Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in

- human disease: An overview. *Methods in Enzymology*, 186(1981), pp.1–85
- Katalinic, V. et al., 2013. Phenolic Profile, Antioxidant Capacity, and Antimicrobial Activity of Leaf Extracts from Six *Vitis vinifera* L. Varieties. *International Journal of Food Properties*, 16(1), pp.45–60.
- Malešev, D. & Kuntić, V., 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(10), pp.921–939.
- Mason, T.J., Paniwnyk, L. & Lorimer, J.P., 1996. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), pp.S253–S260.
- Monagas, M. et al., 2006. Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2 SPEC. ISS.), pp.401–410.
- National Institute of Health, 2014. Coronary Heart Disease? *National heart, blood and lung institute*, (in), pp.1523–1526
- Novak, I. et al., 2008. Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, 630(2), pp.107–115.
- Orhan, D.D. et al., 2009. Biological activities of *Vitis vinifera* L. leaves. *Turkish Journal of Biology*, 33, pp.341–348
- Pękal, A. & Pyrzyńska, K., 2014. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), pp.1776–1782.
- Da Porto, C., Porretto, E. & Decorti, D., 2013. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), pp.1076–1080
- Prior, R.L., Wu, X. & Schaich, K., 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), pp.4290–4302.
- Ratti, C., 2001. Hot air and freeze-drying of high-value foods: A review. *Journal of Food Engineering*, 49(4), pp.311–319.
- Richter, B.E. et al., 1996. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Anal. Chem.*, 68(6), pp.1033–1039.
- Sies, B.H., 1986. [Tg. , 25, pp.1058–1071.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R.M., 1998. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299(1974), pp.152–178.
- Soria, A.C. & Villamiel, M., 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), pp.323–331
- Teixeira, A. et al., 2014. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), pp.15638–15678.
- Terral, J.F. et al., 2010. Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under

domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of botany*, 105(3), pp.443–455.

Xia, E. et al., 2013. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1, pp.47–58.

P.A. Norrie, 2003. Wine: A scientific exploration, Unit 2: The history of wine as a medicine, pages 21-25. Taylor & Francis Group, London and New York

Μαρία Τζιτζι και Πάρης Κυπαρισσού, 2015. Στοιχεία Οινολογίας, η τέχνη του οινοχόου. Εκδόσεις Les Livres du Tourisme

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ:

<http://www.vivc.de>

<http://www.grandviewresearch.com/press-release/global-organic-personal-care-market>

<http://www.cosmetic-business.com/de/News/europes-leading-natural-cosmetics-market/287467>