



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

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

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Σπυρίδων Ζωγράφος , Ερευνητής Β
Γεωργία Ασυμομύτη**

ΑΜ: 00001

Αθήνα, 2018



**INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF
POSTGRADUATE STUDIES
IN
BIOENTREPRENEURSHIP**



MASTER THESIS

**Development of bioactive compound extraction methods from the
Salvia triloba plant and feasibility study for new product development**

SUPERVISOR: Spyridon Zographos , Researcher B'

Georgia Asymomyti

AM: 00001

Athens, 2018

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 Arivita S.A

Εγκρίθηκε την από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Ζωγράφος Σπυρίδων	B'	
Ζουμπουλάκη Παναγιώτη	B'	
Παπαδημητρίου Βασιλική	B'	

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στο πλαίσιο του διιδρυματικού μεταπτυχιακού προγράμματος «Βιοεπιχειρείν» που υλοποιείται από το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και το Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του ΕΙΕ.

Πριν την παρουσία των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Πρώτο από όλους θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής εργασίας, κ. Ζωγράφο Σπυρίδωνα, Ερευνητή Β΄ του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για την πολύτιμη καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής, τον κ. Ζουμπουλάκη Παναγιώτη Ερευνητή Β΄ του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και την κ. Παπαδημητρίου Βασιλική Ερευνήτρια Β΄ του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την εταιρεία APIVITA S.A. για τη βοήθεια που μου πρόσφερε επιτρέποντάς μου να χρησιμοποιήσω τα εργαστήριά της για την υλοποίηση ορισμένων πειραματικών διαδικασιών της εργασίας μου. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή Επιστημονικών Υποθέσεων της APIVITA, Δρ. Κ. Γαρδίκη και τα μέλη της επιστημονικής του ομάδας, Δρ. Παντελή Νατσκούλη και Ελένη Σπανίδη, για την καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου πρόσφεραν.

Ιδιαιτέρες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω προς τις διδακτορικές φοιτήτριες Δήμητρα Λαντζουράκη και Θάλεια Τσιάκα για την πολύτιμη βοήθεια, τις συμβουλές, την υποστήριξή τους και την άριστη συνεργασία για την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους φίλους μου για την κατανόηση που επέδειξαν στο δύσκολο διάστημα της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Ιδιαιτέρως, ευχαριστώ τη φίλη και συμφοιτήτρια μου Σωτηρίου

Ναταλία, που με την έμπρακτη υποστηριχή της, τις επισημάνσεις της συνέβαλε με το δικό της ξεχωριστό τρόπο στην ολοκλήρωση της συγγραφής.

Κλείνοντας, ευχαριστώ ειλικρινά, την οικογενειά μου και κυρίως στους γονείς μου Νίκο και Μαρία για τη διαχρονική συμπαράσταση τους και την υλική και ηθική στήριξη των επιλογών μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	10
ABSTRACT	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ	12
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	16
2.1 ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΣΥΧΡΟΝΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ	16
2.2 ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ	17
2.3 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΑΝΑΦΕΡΘΕΙ ΣΤΟ ΓΕΝΟΣ SALVIA.....	18
2.4 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ	19
2.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ	20
2.5.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ (ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION – UAE)	21
2.5.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION – PLE).....	23
2.6 ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	24
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
3.1. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ-ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	27
3.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ (UAE)	28
3.3 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	30
3.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΠΙΕΣΗ (PLE)	31
3.5 ΈΛΕΓΧΟΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ	33
3.6.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEU	34
3.6.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ AlCl ₃	35
3.6.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗΣ ΣΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΗΣ 1,1-ΔΙΦΑΙΝΟΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΟ-ΥΔΡΑΖΥΛΟ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DRPH.....	37
3.6.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ FRAP.....	39
3.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ MICROPLATE READER	40
3.7.1 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEAU	40
3.7.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DRPH	42
3.7.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ AlCl ₃ (TFC)	43
3.8 ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	44
3.8.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ (TPC) ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (UAE) ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PLE).	45
3.8.2 Η ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ (TFC) ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (UAE) ΚΑΙ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PLE).	49
3.8.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (UAE) ΚΑΙ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PLE) ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ DRPH	52

3.8.4 Η ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ/ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΥΠΕΡΗΧΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ FRAP.	55
3.8.6 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ PLE.....	60
ΜΕΛΕΤΗ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΠΤΗΞΗΣ ΝΕΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ <i>SALVIA TRILOBA</i>	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΜΕΛΕΤΗ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑΣ.....	65
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	65
4.2 ΑΝΑΓΚΕΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗ-ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ	65
4.3 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΣ	67
4.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣWOT	71
4.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΓΟΡΩΝ	72
4.5.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ-ΑΓΟΡΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	72
4.5.2 ΑΓΟΡΑ-ΠΡΟΦΙΛ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΩΝ	73
4.5.3 ΚΑΝΑΛΙΑ ΔΙΑΝΟΜΗΣ-ΠΩΛΗΣΗΣ	75
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 3.1 Πειραματικές συνθήκες για τη λειτουργία της συσκευής εκχύλισης με υπερήχους	29
Πίνακας 3.2 Προσδιορισμός απόδοσης των εκχυλισμάτων UAE.....	45
Πίνακας 3.3 Συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική PLE των φύλλων <i>Salvia triloba</i> L (Μέσος όρος ±SD).....	46
Πίνακας 3.4 Συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική UAE των φύλλων <i>Salvia triloba</i> L (Μέσος όρος ±SD).....	47
Πίνακας 3.5. Συγκέντρωση των φλαβονοειδών εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων της κερκετίνης (Quercetin Equivalents, QE) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική PLE των φύλλων <i>Salvia triloba</i> (Μέσος όρος ± SD)	49
Πίνακας 3.6 Συγκέντρωση των φλαβονοειδών εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων της κερκετίνης (Quercetin Equivalents, QE) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική UAE των φύλλων <i>Salvia triloba</i> L (Μέσος όρος ± SD)	50
Πίνακας 3.7. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικής- ικανότητας εκφρασμένη σε µg Trolox (Trolox Equivalents, TE) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική PLE των φύλλων <i>Salvia triloba</i> L (Μέσος όρος ±SD).....	52
Πίνακας 3.8 Συγκέντρωση αντιοξειδωτικής-αντιριζικής ικανότητας εκφρασμένη σε µg Trolox (Trolox Equivalents, TE) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική UAE των φύλλων <i>Salvia triloba</i> L (Μέσος όρος ±SD).....	53

Πίνακας 3.9. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ικανότητας εκφρασμένη σε $\mu\text{g Fe (II)}$ ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική PLE των φύλλων <i>Salvia triloba</i> L (Μέσος όρος \pm SD)	55
Πίνακας 3.10 Συγκέντρωση αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ικανότητας εκφρασμένη σε $\mu\text{g Fe (II)}$ ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική UAE φύλλων <i>Salvia triloba</i> L (Μέσος όρος \pm SD)	56
Πίνακας 3.11 Οι συντελεστές συσχέτισης κατά Pearson όπως υπολογίστηκαν από τα αποτελέσματα της μεθόδου UAE	59
Πίνακας 3.12 Οι συντελεστές συσχέτισης κατά Pearson όπως υπολογίστηκαν μέσω των αποτελεσμάτων της μεθόδου PLE	60

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 3.1 Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή Folin–Ciocalteu.....	35
Σχήμα 3.2 Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή AlCl_3	36
Σχήμα 3.3 Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή DPPH.....	39
Σχήμα 3.4 Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης Fe(III) – TPTZ (μM).....	40
Σχήμα 3.5 Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή Folin–Ciocalteu.....	41
Σχήμα 3.6 Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή DPPH.....	43
Σχήμα 3.7 Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή AlCl_3	44

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1 Το φυτό <i>Salvia triloba</i>	13
Εικόνα 3.1 Συσκευή εκχύλισης με υπερήχους.....	29
Εικόνα 3.2 Συσκευή λυοφιλίωσης.....	31
Εικόνα 3.3 Εκχυλιστήρας τύπου Timatic mini. A: Θάλαμος εκχύλισης B: Έμβολο πίεσης E: Πνευματική βαλβίδα.....	32

Εικόνα 3.4 Εβδομαδιαίες μετρήσεις αποθήκευσης	61
Εικόνα 3. 5 Ελεγκτική διαδικασία.....	62

Κατάλογος Γραφημάτων

Γράφημα 3.1 Σύγκριση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών που λήφθηκαν εκχυλίστηκαν με την τεχνική PLE από φύλλα <i>Salvia triloba</i> , εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων του γαλλικού οξέως ανά mL εκχυλίσματος.....	48
Γράφημα 3.2 Σύγκριση της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών που εκχυλίστηκαν με την τεχνική UAE από φύλλα <i>Salvia triloba</i> , εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων του γαλλικού οξέως ανά mL εκχυλίσματος.	48
Γράφημα 3.3 Σύγκριση της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών συστατικών που εκχυλίστηκαν με την τεχνική PLE από φύλλα <i>Salvia triloba</i> εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων κερκετίνης ανά mL εκχυλίσματος.	51
Γράφημα 3.4 Σύγκριση της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών συστατικών που εκχυλίστηκαν με την τεχνική PLE από φύλλα <i>Salvia triloba</i> εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων κερκετίνης ανά mL εκχυλίσματος.	51
Γράφημα 3.5 Σύγκριση της αντιοξειδωτικής /αντιριζικής ισχύος των εκχυλισμάτων με την τεχνική PLE από τα φύλλα <i>Salvia triloba</i> , εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων ανά mL εκχυλίσματος.	54
Γράφημα 3.6 Σύγκριση της αντιοξειδωτικής/αντιριζικής ισχύος των εκχυλισμάτων με την τεχνική UAE από τα φύλλα <i>Salvia triloba</i> , εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων ανά mL εκχυλίσματος.	54
Γράφημα 3.7 Σύγκριση της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ισχύος των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με την τεχνική PLE από φύλλα <i>Salvia triloba</i> , εκφρασμένη σε Fe (II) µg ανά mL εκχυλίσματος.	58
Γράφημα 3.8 Σύγκριση της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ισχύος των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με την τεχνική UAE από φύλλα <i>Salvia triloba</i> , εκφρασμένη σε Fe (II) µg ανά mL εκχυλίσματος.	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη έχει ως αντικείμενο το χαρακτηρισμό του χημικού προφίλ των βιοδιαδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων που ελήφθησαν από τα φύλλα του φυτού του γένους *Salvia triloba*. Τα φύλλα του φυτού τα τελευταία χρόνια έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον για την πλούσια περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις. Πραγματοποιήθηκε εφαρμογή τεχνικών εκχύλισης με υπέρηχους (UAE) και με υποβοηθούμενη πίεση (PLE) για την παραλαβή εκχυλισμάτων από τα φύλλα της *Salvia triloba*. Για την εκχύλιση με υπέρηχους (UAE) χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές αναλογίες διαλυτών H₂O και μεθανόλης. Για την εκχύλιση υποβοηθούμενη υπό πίεση (PLE) χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές αναλογίες διαλυτών H₂O και γλυκερόλης. Ακολούθως, μετρήθηκε το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, το ολικό περιεχόμενο φλαβονοειδών με τη μέθοδο AlCl₃ και προσδιορίστηκε η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τις μεθόδους FRAP και DPPH·. Τα εκχυλίσματα από τα φύλλα *Salvia triloba* τα οποία έδειξαν να έχουν τα βέλτιστα αποτελέσματα σε περιεκτικότητα ολικών φαινολικών ενώσεων, φλαβονοειδών και αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι τα: H₂O (PLE), H₂O-MeOH 1:4(UAE) και H₂O-MeOH 1:1 (UAE). Τα αποτελέσματα αυτά, μπορούν να αξιοποιηθούν από εταιρία παραγωγής καλλυντικών προϊόντων φυσικής προέλευσης με σκοπό τον σχεδιασμό ενός καινοτόμου προϊόντος το οποίο θα περιέχει εκχυλίσματα από φύλλα *Salvia triloba*. Η ενσωμάτωση εκχυλισμάτων από φύλλα της *S. triloba* σε οδοντόκρεμα επιδιώκει να ενισχύσει την ποιότητα των συστατικών της και συγχρόνως να συμβάλλει στη στοματική υγιεινή χάρη στη μεγάλη περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδή συστατικά. Τα φλαβονοειδή εμποδίζουν στο σχηματισμό πλάκας στα δόντια ενώ παράλληλα προσφέρουν προοδευτική λευκαντική δράση.

Λέξεις Κλειδιά: *Salvia triloba*, μελέτη σκοπιμότητας, εκχύλιση, αντιοξειδωτική δράση, ολικό φαινολικό περιεχόμενο, δέσμευση ελευθέρων ριζών

ABSTRACT

The subject of this master thesis is the determination of the chemical profile of the biointeractive ingredients of the leaf extracts obtained from the leaves of the plant *Salvia triloba*.

In recent years, the leaves of the plant have gained particular research interest in relation to their rich content in phenolic compounds. Ultrasonic-assisted extraction (UAE) and pressurized liquid extraction (PLE) techniques were applied to obtain *Salvia triloba* leaf extracts. Five different ratios of H₂O and methanol solvents were used for the ultrasonic-assisted extraction (UAE). Five different ratios of H₂O and glycerol solvents were used for the pressurized liquid extraction (PLE). Subsequently, the content of the extracts in total phenols was measured with the Folin-Ciocalteu method, the flavonoids with the AlCl₃ method and their antioxidant and anti-radical capacity was determined using the FRAP and DPPH methods, respectively. The extracts from the *Salvia triloba* leaves which yielded the best results in total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant-anti-radical capacity are: H₂O (PLE), H₂O-MeOH 1:4 (UAE) and H₂O-MeOH 1:1 (UAE). These results can be exploited by a natural cosmetics company in order to design an innovative product containing salvia triloba leaf extracts. The inclusion of *Salvia triloba* leaf extracts into toothpaste seeks to enhance the quality of its ingredients while at the same time contributing to oral hygiene due to the high content of extracts in flavonoid ingredients. Flavonoids inhibit plaque formation in the teeth while producing progressive bleaching.

Keywords: *Salvia triloba*, business plan, extraction, antioxidant action, total phenolic content, free radical binding

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *Salvia triloba* συγκαταλέγεται μεταξύ των περίπου 960 ποωδών και ξυλωδών φυτών της μεγάλης οικογένειας Lamiaceae και το γένος *Salvia*. Είναι πλούσιος αιθαλής θάμνος με πολύ πυκνό ριζικό σύστημα, ημιξυλώδεις βλαστούς με χνούδι, με έντονη διακλάδωση και ύψος έως 80 εκατοστά. Τα φύλλα είναι γκριζοπράσινα, χνουδοτά, λογχοειδή ή ωοειδή, στη βάση τους φέρουν δύο λόβους, ένα από κάθε πλευρά ώστε το φύλλο να φαίνεται τρίλοβο.

Τα φυτά που περιλαμβάνει εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα σε δευτερογενείς μεταβολίτες, καθώς και σε φαρμακολογικές δράσεις. Πολλά είδη του γένους *Salvia* έχουν συμπεριληφθεί σε διάφορες φαρμακοποιείες για διατροφικούς, φαρμακολογικούς και κοσμητολογικούς σκοπούς.

Τα περισσότερα είδη *Salvia* φύονται σε πετρώδεις πλαγιές ή στις άκρες των δρόμων, σε ξηρά λιβάδια, σε καλλιεργούμενα εδάφη και σε άλλους παρόμοιους βιότοπους (Hedge IC, 1972). Γενικά, αναπτύσσονται καλύτερα με την παρουσία έντονης ηλιοφάνειας και σε καλά αποστραγγιζόμενα υποστρώματα (Kamatou G.P.P et al., 2008).

Το γένος *Salvia* συναντάται κατά κύριο λόγο στην Ευρασία και την Αμερική, ειδικότερα στις περιοχές της Κεντρικής Αμερικής και της Μεσογείου (Britannica, 2015). Η *Salvia triloba* συγκεκριμένα, εντοπίζεται κυρίως στη Μεσόγειο και τη Θάλασσα του Μαρμαρά. Στη Τουρκία είναι επίσης γνωστή ως: «Το μήλο των βουνών».

Είναι γνωστό ότι πλήθος εκ των εξεταζόμενων ειδών *Salvia* όπως *S. officinalis*, *S. pretenses*, *S. sclarae*, *S. glutinoza* κ.ά., έχουν σημαντική περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (σουκρόζη), τριτερπενοειδή (ολεονολικό οξύ), Τανσινόνη I, ανθοκυάνες (ακετυλο-ανθοκυάνες) και άλλα συστατικά (Ulubelen, 1968). Ήδη από το 1954, ο Leiner κατάφερε να εξετάσει την *S. triloba*, λαμβάνοντας εκχυλίσματα αιθέριων ελαίων από το στέλεχος. Τα αποτελέσματα της έρευνάς του έδειξαν περιεκτικότητα σε ουρσολικό οξύ I και II, ολοελονικό οξύ, παραφίνη, πολυτερπένιο, ελαιώδεις ενώσεις, ενώ οι Brieskorn and Karadia (1979) σε μετέπειτα μελέτη τους επιβεβαίωσαν τα ευρήματα.

Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι τα δείγματα *S. triloba* που είχαν συλλεχθεί από τον ελλαδικό χώρο, περιείχαν υψηλή περιεκτικότητα σε ολεολονικό και ουσρολικό οξύ I & II, (Ulubelen, 1968). Πιο πρόσφατες μελέτες ερευνητών, προσδιόρισαν συγκεκριμένα συστατικά. Για παράδειγμα ο El-Sayed και οι συνεργάτες του (El-Sayed et al., 2001), κατέγραψαν δώδεκα υδατάνθρακες, τέσσερις στερόλες, τρία τριτερπένια, δεκαεννέα λιπαρά οξέα, δύο φαινολικά οξέα και πέντε φλαβονοειδή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, με περισσότερα από 160 να έχουν απομονωθεί από τα είδη *Salvia* γενικότερα, ορισμένα εκ των οποίων συναντιούνται μόνο σε αυτά τα φυτά, ενώ τις τελευταίες δύο δεκαετίες, οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στα βιοενεργά, υδατοδιαλυτά συστατικά, τα οποία χρησιμοποιούνται εκτενώς σε παραδοσιακές ιατρικές εφαρμογές, σε χώρες όπως η Κίνα (Lu et al., 2002). Η παρούσα εργασία εστιάζει στην ανάπτυξη μεθόδων παραλαβής εκχυλισμάτων βιοδραστικών συστατικών από το φυτό *S. triloba* καθώς και στη προετοιμασία μελέτης σκοπιμότητας για την ανάπτυξη νέου προϊόντος.



Εικόνα 1.1 Το φυτό *Salvia triloba*

Δεδομένων των παραπάνω, το φυτό *S. triloba* είναι εν δυνάμει σημαντικό για την παρασκευή νέου καλλυντικού προϊόντος με συγκεκριμένη δυναμική κυρίως λόγω της πρωτοτυπίας που θα έχει, της σύστασης του σε φυσικά υλικά και του ευρέος δικτύου προώθησης του. Για το λόγο αυτό, στα πλαίσια αυτής της εργασίας πραγματοποιήθηκε η μελέτη του συγκεκριμένου φυτού και

υπήρξαν διαπιστώσεις σε σχέση με την ευρύτερη χρήση του αλλά και σε σχέση με την υγεία του μέσου ανθρώπου. Η ανάπτυξη του θέματος θα γίνει μέσα από τις ακόλουθες ενότητες:

Κεφάλαιο 1^ο: Στο πρώτο κεφάλαιο αναπτύσσεται ο σκοπός και οι στόχοι της παρούσας μελέτης.

Κεφάλαιο 2^ο: Στο δεύτερο κεφάλαιο της μελέτης παρουσιάζεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση, η οποία βοήθησε στην ανάπτυξη πειραματικών πρωτοκόλλων αλλά και του επιχειρηματικού πλάνου της μελέτης.

Κεφάλαιο 3^ο: Στο τρίτο κεφάλαιο της μελέτης αναπτύσσεται η πειραματική διαδικασία.

Κεφάλαιο 4^ο: Στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζεται η μελέτη σκοπιμότητας του νέου προϊόντος .

Κεφάλαιο 5^ο: Στο Κεφάλαιο 5 παρατίθενται τα τελικά συμπεράσματα της μελέτης.

1.2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτελεί η προκατακτική μελέτη για την ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος, με βάση τα εκχυλίσματα βιοδραστικών συστατικών από το φυτό *Salvia triloba* που προέκυψαν από τις μεθόδους εκχύλισης. Προς διερεύνηση και υλοποίηση του παρόντος σκοπού, υλοποιήθηκε η προετοιμασία μελέτης σκοπιμότητας για την ανάπτυξη νέου προϊόντος.

Θεωρητικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

2.1 ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΣΥΧΡΟΝΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ

Τα είδη *Salvia* έχουν χρησιμοποιηθεί για τις θεραπευτικές ιδιοτητές τους πολλά χρόνια πριν. Έχουν πάρει το λατινικό όνομα «*Salvia*» από το ρήμα *salvere*, που σημαίνει «είμαι υγιής». Υπάρχουν αναφορές του φυτού απο τον Ιπποκράτη, τον Θεόφραστο και τον Διοσκουρίδη, οι οποίοι το εκθείαζαν ιδιαίτερος και το χρησιμοποιούσαν τόσο για θεραπευτικούς σκοπούς αλλά και ως τονωτικό του μυαλού και του σώματος. Οι ευεργετικές ιδιότητες του φυτού ήταν γνωστές και στους αρχαίους Αιγύπτιους, οι οποίοι το χρησιμοποιούσαν, για να αυξήσουν τη γονιμότητα των γυναικών. Τέλος, τόσο οι Άραβες όσο και οι Λατίνοι θεωρούσαν ότι δεν υπάρχει καλύτερο φάρμακο κατά του θανάτου. Μάλιστα, υπάρχει και μια παροιμία που λειί: ο άνθρωπος που έχει στον κήπο του *Salvia* δεν χρειάζεται γιατρό.

Η Ανατολική Μεσογειακή φασκομηλία (*Salvia triloba*) είναι ένα εγχώριο φυτό της Μεσογείου, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή ιατρική από πολλές χώρες για να θεραπεύσει διάφορες ασθένειες. Τα υδατικά και ελαιώδη εκχυλίσματα του φασκόμηλου διαθέτουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινικές και αντιμικροβιακές δραστηριότητες (Hala Galil-Muhtasib, 2006).

Τα αιθέρα έλαια *Salvia triloba* εμφανίζουν αξιοσημείωτες βακτηριοστατικές και βακτηριοκτόνες δράσεις έναντι των ανθρώπινων παθογόνων. Η κακή στοματική υγιεινή επιτρέπει σε υπολείμματα τροφίμων να συλλέγονται στην επιφάνεια της γλώσσας, μεταξύ των δοντίων ή κατά μήκος του ιστού των ούλων που περιβάλλει τα δόντια. Τα βακτηρίδια που υπάρχουν στο στόμα, διασπούν τα σωματίδια των τροφίμων, με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν χημικές ουσίες με ισχυρή οσμή. Οι βακτηριοκτόνες ιδιότητες των φυτών του γένους *Salvia* είναι επαρκείς για να εξοντώσουν τα βακτήρια.

Η *Salvia* είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε μολύνσεις που αφορούν το λαιμό, οδοντικά αποστήματα, μολυσμένα ούλα και έλκη στο στόμα. Τα φαινορικά οξέα της *Salvia* είναι και αυτά ιδιαίτερα ισχυρά. Επίσης έχει στυπτική δράση λόγω της σχετικά υψηλής περιεκτικότητας σε ταννίνες. Η στυπτική της

δράση σε συνεργασία με τις αντιμικροβιακές της ιδιότητες, χρησιμοποιείται ως δραστικό συστατικό σε οδοντικά σκευάσματα, διότι μειώνει την ανάπτυξη της πλάκας, αναστέλλει τη δημιουργία φλεγμονών στα ούλα καθώς και τη δημιουργία τερηδόνας. Όλα αυτά αποδεικνύουν τη σημασία της *Salvia triloba* τόσο στην ιατρική όσο και στην οδοντιατρική θεραπεία (Narayan & Thangavelu, 2015).

Το φυτό *Salvia triloba* έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για την ενίσχυση της μνήμης, της συγκέντρωσης, ως ηρεμιστικό και για τη θεραπεία πονοκεφάλων (Abdelhalim et al., 2014).

Πρόσφατες έρευνες σε πειραματόζωα έδειξαν πως τα το φυτό *Salvia triloba* βοηθά και στη διαχείριση της δυσλιπιδαιμίας, του διαβήτη και της παχυσαρκίας. Έχει διπλές υποτριγλυκεριδαιμικές και αντιλιπολυτικές ιδιότητες που δείχνουν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταστολή της αύξησης του σωματικού βάρους (Arabiyat el at., 2016).

2.2 ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

Σύμφωνα με την συνδιάσκεψη της European Society for Biomaterials που έγινε στο Chester, U.K το Μάρτιο του 1986, ένα βιοδραστικό υλικό είναι: «*το υλικό που χρησιμοποιείται για να προκαλέσει μία συγκεκριμένη βιολογική δράση*» (Wright, 1989).

Σε σχέση με τα βιοδραστικά συστατικά των φυτών, διαπιστώνεται ότι χαρακτηρίζονται από αντιβακτηριδιακή, αντιμυκητιακή και βιοχημική δράση (Economou, Travlos, Kotoulas, Panagopoulos, 2011). Τα συγκεκριμένα συστατικά βοηθούν στη βελτίωση των φυτών και αφορούν τις μεθόδους υπάρχουσας γενετικής παραλλακτικότητας από φυσικούς πληθυσμούς (Tsivelikas and Chatzopoulou ,2011).

Τα φύλλα περιέχουν ως κύρια ουσία αιθέριο έλαιο, τερπένια, ρητίνες, διτερπένια, ταννίνες, τριτερπένια, φλαβονοειδή και θουγιόνη (thujone, μια μονοτερπενική κετόνη).

Οι χημικές ενώσεις του φυτού, είναι οι οποίες αναφέρονται στη συνολική

παραγομένη ποσότητα του αιθέριου ελαίου μεταβάλλονται ανάλογα με (Zurancic, 2001): α) το τμήμα του φυτού, β) την εποχή, γ) τη γεωγραφική περιοχή. Η βιοχημική ανάλυση των φυτών αποκάλυψε τρεις τύπους με βάση το λόγο α προς β-θουγιόνη (α/β 10:1, 1:10 αντίστοιχα). Έτσι τα φυτά κατανέμονται σε τρεις κατηγορίες αναλόγως του ποσού θουγιόνης στο αιθέριο έλαιο: πλούσια 39-44%, μεσαία 22-28% και φτωχά μικρότερα του 9%. Σε διάφορα πειράματα παρατηρείται ότι οι ενώσεις των στελεχών έχουν υψηλότερα επίπεδα περιεκτικότητας σε έλαιο (1.6% έναντι 1.1%) και β-πινένιο (27% έναντι 10%) σε σχέση με τα φύλλα, ενώ τα επίπεδα θουγιόνης είναι χαμηλότερα 16% έναντι 31%, αντιστοίχως (Skoula et al., 2000).

Η βιοδραστικότητα των εκχυλισμάτων οφείλεται στους δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι ορίζονται και ως φυσικά προϊόντα. Η χημεία των φυσικών προϊόντων αναπτύχθηκε ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια πράγμα που είναι απόρροια της παράλληλης ανάπτυξης των εξειδικευμένων τεχνικών απομόνωσης (Sarrou et al., 2016).

2.3 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΑΝΑΦΕΡΘΕΙ ΣΤΟ ΓΕΝΟΣ *SALVIA*

Το γένος *Salvia* αποτελεί αντικείμενο μιας εντατικής έρευνας για τα φαινολικά αντιοξειδωτικά του συστατικά. Οι κυριότεροι δευτερογενής μεταβολίτες που απαντώνται στο γένος είναι τα τερπένια και τα φλαβονοειδή. Η πλειοψηφία των φαινολικών είναι ουσιαστικά, τα φαινολικά οξέα (αποκλειστικά παράγωγα καφεϊκού οξέος) και φλαβονοειδή. Τα τερπενοειδή αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία χημικών ουσιών, η οποία περιλαμβάνει μονοτερπένια, διτερπένια, τριτερπένια και καροτενοειδή. Τα διτερπενοειδή και τα παράγωγα του καφεϊκού οξέος, ιδιαίτερα το ροσμαρινικό οξύ (Cuvelier et al., 1994) είναι υπεύθυνα για το κύριο αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα του *Salvia*.

Τα υπέργεια τμήματα των φυτών περιέχουν κυρίως φλαβονοειδή και τριτερπένια, ιδιαίτερα στα άνθη και στα φύλλα, καθώς και αιθέρια έλαια με πτητικές ενώσεις όπως μονοτερπένια. Σε κάποια είδη έχουν εντοπιστεί διάφορα τριτερπέμια και φλαβόνες στις ρίζες τους. Τα διτερπένια απαντώνται κυρίως στις

ρίζες των φυτών. Υπάρχουν όμως και αναφορές ειδών που περιέχουν διπερπένια και στα υπέργεια τμήματα του φυτού.

Στην πλειονότητα τους τα φλαβονοειδή αντιπροσωπεύονται από φλαβόνες, όπως η λουτεολίνη και η απιγενίνη καθώς και από ένα μεγάλο αριθμό μεθυλαιθέρων τους (Lu Y & Foo Y, 2002).

Οι κυριότεροι εκπρόσωποι των φλαβόνων στο γένος *Salvia* αποτελούν η πινοσεμβίνη, ο 4'-μεθυλαιθέρας της ναριγκενίνης, ο 4'-μεθυλαιθέρας και ο 7,4'-διμεθυλαιθέρας της εριοδικτυόλης (Lu Y & Foo Y, 2000)

2.4 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Η έννοια της «συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας» (TAC) προέρχεται από την χημεία και εφαρμόστηκε στη βιολογία και την ιατρική, καθώς και στη διατροφολογία και την επιδημιολογία. Η TAC χρειάζεται μία κριτική αξιολόγηση επειδή υπάρχουν σοβαροί περιορισμοί που αποκλείουν την ουσιαστική εφαρμογή σε συνθήκες *in vivo*. Τα κύτταρα, οι ιστοί και τα σωματικά υγρά είναι εξοπλισμένα με ισχυρά αμυντικά συστήματα που συμβάλλουν στην εξουδετέρωση της οξειδωτικής καταπόνησης (Reddy et al., 2013).

Για να διατηρηθεί μια σταθερή κατάσταση μεταβολιτών και μια λειτουργική ακεραιότητα στο αερόβιο περιβάλλον, η αντιοξειδωτική άμυνα οργανώνεται σε τρία κύρια επίπεδα προστασίας: πρόληψη, την αναχαίτιση και την αποκατάσταση. Συνδυάζοντας την ποικιλία των προ-οξειδωτικών, το αντιοξειδωτικό οπλοστάσιο περιλαμβάνει μια ευρεία σειρά αντιοξειδωτικών συστημάτων (αντιοξειδωτικό δίκτυο) (Sies, 2007).

Το φυτό *Salvia triloba* διαθέτει στα φύλλα του και στους καρπούς του υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης αντιοξειδωτικών ενώσεων. Το ροσμαρινικό οξύ αποτελεί τον κυριότερο εκπρόσωπο των φαινολικών οξέων που απαντάται στη *S. triloba* και θεωρείται υπεύθυνο για την αντιοξειδωτική δράση που εμφανίζουν τα μεθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα του φυτού (Lu Y & Foo Y, 2002). Άλλα φαινολικά οξέα που έχουν αναφερθεί στο είδος είναι το καφεϊκό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το φερουλικό οξύ, το βανιλλικό οξύ και το p-κουμαρικό οξύ (N.H. El-Sayed et al., 2001). Η *Salvia triloba* είναι ένα βότανο κατεξοχήν

πλούσιο σε φλαβονοειδή, κυρίως γλυκοσίδες αυτών.

Η αρχική λειτουργία τους είναι η παροχή προστασίας από τις επιβλαβείς δραστικές οξυγονούχες ενώσεις που σχηματίζονται π.χ κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης ή της αναπνοής. Σε αυτές τις ενώσεις εντάσσονται διάφορες ελεύθερες ρίζες και μόρια (Albano & Miguel, 2011).

2.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ

Σήμερα, σε διάφορους εμπορικούς κλάδους, όπως των τροφίμων αλλά και άλλων προϊόντων φυτικής προέλευσης (φάρμακα, καλλυντικά) θεωρείται ως αναγκαία η διαδικασία της εκχύλισης δραστικών συστατικών. Παράλληλα με τις συμβατικές μεθόδους, έχουν καθιερωθεί και πολλές νέες μέθοδοι, όπως η εκχύλιση βιοενεργών ενώσεων.

Επιπροσθέτως, παρατηρείται πλήθος καινοτόμων τεχνικών εκχύλισης οι οποίες έχουν ερευνηθεί και εφαρμοστεί για την ικανότητά τους να εξαγάγουν βιοδραστικές ενώσεις από καρπούς και φυτά, όπως μέθοδοι εκχύλισης με μικροκύματα και υπερήχους, με χρήση υπερκρίσιμων ρευστών, με επιταχυντικό διαλύτη, μικρο-εκχύλιση στερεής φάσης κ.ά. (Wang et al., 2006). Η επίτευξη συγκεκριμένων συνθηκών λειτουργίας όπως υψηλές τιμές θερμοκρασίας και πίεσης, απαιτούν κατανάλωση ενέργειας, με τις αντίστοιχες μεθόδους να χαρακτηρίζονται ως εκχυλίσσεις υψηλής ενέργειας.

Τα προϊόντα φυτικής προέλευσης αντιπροσωπεύουν μια πλούσια πηγή βιοδραστικών ενώσεων. Ωστόσο, για την αξιοποίηση αυτών των πόρων πρέπει να αναπτυχθούν καινοτόμες στρατηγικές για την απομόνωση τους. Η συγκεκριμένη διαδικασία επικεντρώνεται στην εκχύλιση βιοενεργών ενώσεων από υποπροϊόντα φυτικής προέλευσης με χρήση διαφόρων νέων μεθόδων, συμπεριλαμβανομένης της υγρής εκχύλισης υπό πίεση και της εκχύλισης με τη χρήση CO₂. Σήμερα χρησιμοποιούνται μέθοδοι που θεωρούνται πιο αποτελεσματικές για τις άπολες ενώσεις. Αντίθετα, η εκχύλιση υπό πίεση εφαρμόζεται για την παραλαβή πολικών ενώσεων, όπως είναι οι πολυφαινόλες (Wijngaard et al., 2012).

Η χρήση συμβατικών και μη συμβατικών μεθόδων ανά περίπτωση βοηθά

στην εξαγωγή άμεσων και αποτελεσματικών αποτελεσμάτων (Azmir, 2013). Η παρούσα διπλωματική εργασία βασίστηκε στις μη-συμβατικές μεθόδους εκχύλισεων.

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

Παρακάτω παρατίθενται ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ των μη συμβατικών μεθόδων εκχύλισης (Azmir et al. 2013)

- Αυξημένη επιλεκτικότητα
- Επαναληψιμότητα της μεθόδου ανεξαρτήτως της ποικιλομορφίας του δείγματος
- Μεγάλη ευαισθησία
- Εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από σύνθετα φυτικά υποστρώματα

Οι μη συμβατικές μέθοδοι έχουν μειωμένο συνολικό χρόνο εκχύλισης, καλύτερη απόδοση και ποιότητα στο τελικό εκχύλισμα. Είναι φιλικές προς το περιβάλλον λόγω μειωμένης ποσότητας σε κατανάλωση συνθετικών και οργανικών χημικών ουσιών.

Όλες οι τεχνικές εκχύλισης αυτής της κατηγορίας χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκχύλιση και παραλαβή βιοδραστικών ενώσεων.

Η εκχύλιση αποτελεί γενικά μια αρκετά ισχυρή και εστιασμένη δράση η οποία μπορεί να δώσει στοιχεία τα οποία χρειάζονται για την ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος.

2.5.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ (ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION – UAE)

Η μέθοδος εκχύλισης με υπερήχους, συμπεριλαμβάνεται στις μη συμβατικές τεχνικές εκχύλισης και λειτουργεί σε συνθήκες της τάξεως των 20

kHz έως 100 MHz στις εφαρμογές χημικών διεργασιών. Η κατηγοριοποίηση της μεθόδου εξαρτάται από την ισχύ (sound power, watt), την ένταση (W/m^2) και την ενεργειακή πυκνότητα (W/m^3) (Pico, 2013).

Η αρχή λειτουργίας στηρίζεται στη μετάδοση υπερηχητικών κυμάτων τα οποία διαπερνούν ένα μέσο και δημιουργούν συνθήκες συμπίεσης και εκτόνωσης. Το φαινόμενο αυτό, γνωστό ως *σπηλαιώση* (cavitation), συμβάλλει στη δημιουργία, ανάπτυξη και διάσπαση φυσαλίδων, εντός των οποίων, παρατηρείται αύξηση της θερμοκρασίας. Η αύξηση αυτή οφείλεται στη μετατροπή της κινητικής ενέργειας σε θερμότητα. (Azmir et al., 2013).

Η εκχύλιση των επιθυμητών συστατικών μέσω υπερήχων βασίζεται σε δύο φυσικά φαινόμενα: α) τη διείσδυση εντός του κυττάρου καθιστώντας το κυτταρικό τοίχωμα προσπελάσιμο (διάχυση) και β) την θραύση του κυτταρικού τοιχώματος με στόχο την εκχύλιση του εσωτερικού του κυττάρου. Η θερμοκρασία, η πίεση, η συχνότητα και ο χρόνος έκθεσης αποτελούν κρίσιμους παράγοντες για την εφαρμογή και αποτελεσματικότητα της μεθόδου (Azmir et al., 2013).

Η μέθοδος προσφέρει το πλεονέκτημα καλύτερης εισχώρησης του διαλύτη και αποδοτικότερη επαφή μεταξύ στερεού και διαλύτη λόγω της αύξησης της πίεσης και της θερμοκρασίας. Πιο συγκεκριμένα, η αυξημένη τιμή πίεσης επιδρά στην εισχώρηση στο κύτταρο και στη μεταφορά μάζας, ενώ αντίστοιχα η αύξηση της θερμοκρασίας επιτυγχάνει καλύτερη διαλυτότητα και διάχυση (Pico, 2013).

Ποιο συγκεκριμένα παρουσιάζει πλεονεκτήματα συγκριτικά με τις άλλες τεχνικές εκχύλισης με υπερήχους ως προς (Teixeira et al. 2014 , Azmir et al. 2013):

- Μικρότερη ποσότητα κατανάλωσης διαλύτη
- Εκλεκτικότητα
- Διατήρηση σχετικά χαμηλής θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της εκχύλισης
- Ταχύτερη μεταφορά ενέργειας

- Μειωμένος χρόνος εκχύλισης
- Απλή μέθοδος εκχύλισης
- Αποδοτικότερη ανάμειξη φυτικού δείγματος στο διαλύτη λόγω της μεγαλύτερης επιφάνειας επαφής που αναπτύσσεται.

Στο σύνολό τους οι εφαρμογές που χρησιμοποιούν μέθοδο υπερήχων έχουν καταδείξει ότι πρόκειται για μία αξιόπιστη και βιώσιμη εναλλακτική πρόταση έναντι των συμβατικών μεθόδων για την εξαγωγή ποικίλων συστατικών: ανόργανες ενώσεις, αιθέρια έλαια, λιπαρά οξέα, ισοφλαβονοειδή κ.ά. από πλήθος ειδών όπως φυτικούς και ζωικούς ιστούς και ιζήματα (Pico, 2013).

Στα αρνητικά χαρακτηριστικά της μεθόδου περιλαμβάνεται η ανάγκη επαναπροσδιορισμού της ανά περίπτωση εφαρμογής (Solia et al., 2010).

Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί μειονεκτήματα που σχετίζονται με την σταθερότητα των εξαγόμενων ενώσεων και συστατικών, και πρέπει να εξεταστούν περαιτέρω από την επιστημονική κοινότητα (Solia et al., 2010). Για παράδειγμα, ο Wang και συνεργάτες του κατά τη διάρκεια των μελετών τους, συνέστησαν προσοχή κατά τη χρήση των υπερήχων καθώς αυτού του είδους τα κύματα, δύναται να επιδρούν στο φυτικό υπόστρωμα προκαλώντας ανεπιθύμητες αλλοιώσεις (Wang et al., 2006).

2.5.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION – PLE)

Η μέθοδος εκχύλισης με χρήση υγρού υπό πίεση, αποτελεί ουσιαστικά μία «πράσινη» μέθοδο εξαγωγής φυτικών προϊόντων από καρπούς και βότανα. Η συγκεκριμένη μέθοδος παρέχει τη δυνατότητα ανέπαφης εξαγωγής βιοδραστικών ενώσεων από τρόφιμα και φυτά, χαρακτηριστικό των οποίων είναι η ευαισθησία στην επεξεργασία και τις θερμοκρασιακές μεταβολές. Ως εκ τούτου υπερέχουν σημαντικά έναντι των συμβατικών μεθόδων (Mustafa et al., 2011).

Η εκχύλιση υγρού υπό πίεση είναι μία νέα μέθοδος εκχύλισης στην οποία χρησιμοποιούνται υγροί διαλύτες σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις για την προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση είτε με αέριο χρωματογραφία είτε με υγρή χρωματογραφία. Η εκχύλιση υγρού υπό πίεση είναι παρόμοια με την εκχύλιση Soxhlet, εκτός από το ότι κατά την διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης η κατάσταση των διαλυτών μέσα στη κυψελίδα της εκχύλισης υγρού υπό πίεση προσεγγίζει την υπερκρίσιμη περιοχή και έχει ως αποτέλεσμα πιο αποτελεσματικές εκχυλίσεις. Η αυξημένη θερμοκρασία επιτρέπει στο δείγμα να καθίσταται πιο διαλυτό και να επιτυγχάνεται υψηλότερος ρυθμός διάχυσης, ενώ η αυξημένη πίεση διατηρεί τον διαλύτη κάτω από το σημείο βρασμού του (Pics, 2017).

Σε αυξημένες πιέσεις και θερμοκρασίες οι διαλύτες μπορούν να διεισδύσουν πιο αποτελεσματικά στα στερεά δείγματα γεγονός που μειώνει την χρήση του διαλύτη. Οι υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται αυξάνουν την επαφή του διαλύτη με το δείγμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μια πιο αποδοτικότερη εκχύλιση.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου υποβοηθούμενης υπό πίεση είναι τα ακόλουθα (Carabias-Martinez et al. 2005):

- Επιλεκτικότητα ανάλογα με τις βιοδραστικές ενώσεις – στόχους
- Μεγάλη απόδοση
- Μειωμένος χρόνος εκχύλισης
- Αυτοματοποιημένη μέθοδος
- Μικρή ποσότητα διαλύτη

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται σε κύκλους δυναμικής και στατικής φάσης με σκοπό τη βελτίωση της αποδοτικότητας της εκχύλισης (Carabias-Martinez et al. 2005).

2.6 ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης είναι οι ακόλουθοι:

- 1 Παραλαβή εκχυλισμάτων από τα φύλλα του φυτού *Salvia triloba* με εφαρμογή μη συμβατικών τεχνικών εκχύλισης υψηλής ενέργειας και χρήση διαφορετικών διαλυτών.
- 2 Σύγκριση εκχυλισμάτων ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση.
- 3 Μέτρηση των ολικών φαινολικών, флаβονοειδών, αντιριζικής και αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων.
- 4 Έλεγχος σταθερότητας εκχυλισμάτων που έχουν προέλθει μέσω εκχύλισης υποβοηθούμενος υπό πίεση (PLE).
- 5 Προκαταρκτική μελέτη σκοπιμότητας για τη χρήση των βέλτιστων εκχυλισμάτων σε νέα καινοτόμα καλλυντικά προϊόντα φυτικής προέλευσης.

Πειραματικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1.ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ-ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των εκχυλισμάτων και την απομόνωση των ουσιών είναι τα εξής:

1. Φυτικό Υλικό: *Salvia triloba* L. f (*Salvia fruticosa* Mill.) Αλμυρός Μαγνησίας, αποξήρανση σε σκιερό και καλά αεριζόμενο μέρος.

2. Υλικά: Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

- Φίλτρα διήθησης MCE, 0,45 μm pores size (Sartorius, Germany)
- Φίλτρα διήθησης : Ashless hardened fine crystalline, circles 70 mm (1-2 μm, 3-5 μm, 8-12 μm, pores size) (K&R, Germany)
- Μεθανόλη- MeOH (HPLC grade, Fisher Chemical, Loughborough, UK)
- Σακούλα φιλτραρίσματος μεγέθους πόρων 50 microns (TecnoLab, Italy)
- Γλυκερίνη (Organique Glycerin, Laboratoires Prod' Hyd)
- Κιτρικό οξύ (Citric acid, Jungbunzauer, Austria)
- Συντηρητικό Micro care SB (μείγμα βενζοϊκού νατρίου και σορβικού καλίου, Thor Personal Care SAS)
- Trolox- C₁₈H₁₂N₅O₆ Υδατοδιαλυτό ισοδύναμο Βιταμίνης E (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Aluminum chloride, 99% extra pure, anhydrous, granules (ACROS Organics TM)
- Quercetrin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Folin Ciocalteu's Phenol reagent (Merck) (FCPr)
- Διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃ 20% w/v)
- Γαλλικό οξύ (98% καθαρότητα, 3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ), (Afla Aesar)
- Αιθανόλη (Fisher Chemical, Loughborough, UK)
- DPPH -1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

3. Οργανολογία: Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

- Συσκευή εκχύλισης με υπερήχους Vibra-Cell VCX 750 20 kHz 750 W (Sonics and Materials Inc, Newtown, USA)
- Συσκευή εκχύλισης Timatic (TecnoLab, Italy)
- Συσκευή λυοφιλίωσης LABCONCO Freeze Dryer (Thermo Electro Corporation, Thermo Fischer, USA)
- pH-μετρο SevenCompact™ pH/Ion S220 (Mettler Toledo Inc, Switzerland)
- Διαθλασίμετρο (Refractometer) RX-5000⁰ (ATAGO CO Ltd, Japan)
- Συσκευή μέτρησης πυκνότητας DMA 38 (ANTON PAAR GmbH, Austria)
- Φασματοφωτόμετρο UV-VIS διπλής δέσμης τύπου UV-1800 (Shimadzu Europa)
- Συσκευή Infinite® 200 PRO NanoQuant Multimode Microplate Reader (Tecan Trading AG)
- Ζυγός ακριβείας (KERN 770)
- Αναδευτήρας (Vortex, VELD Scientifica)

3.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ (UAE)

Φυτικό υλικό: Αποξηραμένα και αλεσμένα φύλλα (φυτικό υπόστρωμα) δείγματος *Salvia triloba*. Η αναλογία στερεού δείγματος προς διαλύτη ήταν 1:10

Διαλύτης: Στην εκχύλιση με υπέρηχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν απιονισμένο νερό και μεθανόλη σε πέντε αναλογίες.

Οι αναλογίες των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση με υπερήχους ήταν οι εξής:

- 100% H₂O
- 80% H₂O – 20% MeOH
- 50% H₂O – 50% MeOH

- 20% H₂O – 80% MeOH
- 100% MeOH

Για τη λειτουργία της συσκευής εκχύλισης με υπερήχους εφαρμόστηκαν οι ρυθμίσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1:

Πίνακας 3.1 Πειραματικές συνθήκες για τη λειτουργία της συσκευής εκχύλισης με υπερήχους

Χρόνος εκχύλισης (timer)	: 15 minutes
Ένταση παλμού (amplitude)	: 80%
Διάρκεια παλμού (pulser) on time	: 10 seconds
Διάρκεια παλμού (pulser) off time	: 5 seconds
Θερμοκρασία	: 25-30°C



Εικόνα 3.1 Συσκευή εκχύλισης με υπερήχους

Η επιλογή “off time” ασυνεχούς λειτουργίας ενδείκνυται για θερμοευσίσθητα δείγματα, με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται η πιθανή αύξηση της θερμοκρασίας. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία επιλέχθηκαν οι παραπάνω παράμετροι της εκχύλισης (Πίνακας 3.1) για μέγιστη απόδοση σε φλαβονοειδή

και φαινολικά συστατικά. (Da Porto et. al. 2013, Carrera et. al. 2012, Casazza et. al. 2010, Ghafoor et. al. 2009, Novak et. al. 2008).

Η ίδια πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε και για τις τέσσερις αναλογίες διαλυτών.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε άλεση του δείγματος (φυτικό υλικό) εκ των οποίων 3 g τοποθετήθηκαν σε γυάλινη σφαιρική φιάλη. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη διαλύτη 100% H₂O συνολικού όγκου 30 mL. Έπειτα εφαρμόστηκε η κεφαλή της συσκευής μέσα στη σφαιρική φιάλη χωρίς να έρχεται σε επαφή με τη γυάλινη επιφάνεια της. Παράλληλα έγινε τοποθέτηση θερμομέτρου σε ειδική υποδοχή της φιάλης για έλεγχο καθώς και εμφύσηση αυτής σε πάγο για διατήρηση της θερμοκρασίας στους 25-35°C. Αφού ολοκληρώθηκε η παραπάνω διαδικασία ρυθμίστηκαν οι βασικοί παράμετροι της εκχύλισης διάρκειας 15 λεπτών. Ακολούθως τα δείγματα διηθήθηκαν υπό κενό μέσω φίλτρου Whatman. Τέλος, τα δείγματα συλλέχθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες τύπου falcon και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 4 °C στο σκοτάδι.

3.3 ΛΥΟΦΙΛΙΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η διαδικασία της ξήρανσης προϊόντων με λυοφιλίωση, αναφέρεται στη κατάψυξη των υπό ξήρανση υλικών και κατόπιν στην εξάχνωση του πάγου, προκειμένου να παραχθεί ένα αφυδατωμένο προϊόν. Η παρούσα πλεονεκτεί έναντι άλλων μεθόδων αφυδάτωσης μια και έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα: α) δεν καταστρέφει τα θρεπτικά συστατικά του προϊόντος, β) συντηρεί καλύτερα τη δομή και εμφάνιση καθώς μιας και η έκταση της συρρίκνωσης είναι αμελητέα, γ) τα δείγματα δεν αφρίζουν και δεν σκληραίνουν και δ) δεν υφίστανται μεταβολές στη μικροχλωρίδα (Miclaus, 2015).

Στα εκχυλίσματα που προήλθαν από υπερήχους εφαρμόστηκε η μέθοδος της λυοφιλίωσης. Αναλυτικότερα (Εικόνα 3.2) :



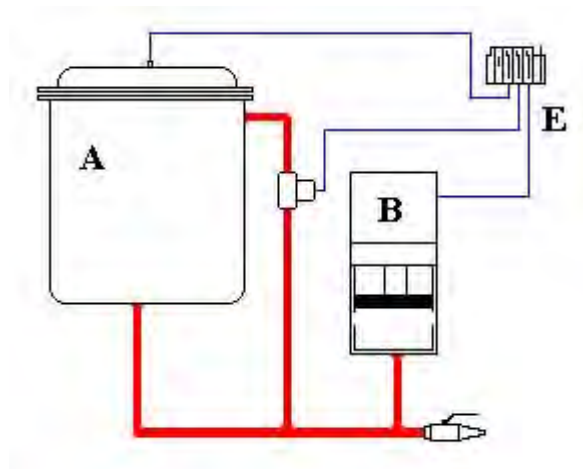
Εικόνα 3.2 Συσκευή λυοφιλίωσης

- Έγινε ζύγιση του απόβαρου κάθε άδειου σωλήνα 1 mL τύπου erpendorf και καταγράφηκε το αρχικό βάρος
- Σε κάθε ένα σωλήνα erpendorf του 1 mL τοποθετήθηκαν 500 μ L από κάθε εκχύλισμα. Η διαδικασία αυτή εκτελέστηκε συνολικά 4 φορές έτσι ώστε κάθε εκχύλισμα να συγκεντρωθεί σε τέσσερις σωλήνες erpendorf
- Στη συνέχεια όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή λυοφιλίωσης LABCONCO Freeze Dryer (Thermo Electro Corporation, Thermo Fischer, USA) για μία νύχτα (overnight)
- Ολοκληρώνοντας τη διαδικασία της λυοφιλίωσης, ζυγίστηκε το τελικό βάρος από κάθε σωλήνα erpendorf

Η μάζα των βιοδραστικών ενώσεων που υπάρχει σε κάθε σωλήνα erpendorf είναι μείζονος σημασίας για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που ακολουθούν.

3.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΠΙΕΣΗ (PLE)

Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ημιαυτόματης συσκευής εκχύλισης τύπου Timatic mini (TecnoLab, Italy) που λειτουργεί υπό πίεση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι εκχυλίσεις έλαβαν χώρα στις εργαστηριακές εγκαταστάσεις της εταιρίας Arivita. Η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται στο παρακάτω διάγραμμα.



Εικόνα 3.3 Εκχυλιστήρας τύπου Timatic mini. A: Θάλαμος εκχύλισης B: Έμβολο πίεσης E: Πνευματική βαλβίδα

1. Αρχικό στάδιο προετοιμασίας εκχύλισης του διαλύτη: Ο διαλύτης αποτελείται από μείγμα νερό και γλυκερόλης όπου περιέχονται 0,40% w/w κιτρικού οξέος για τη ρύθμιση του pH του διαλύματος και 1,00% w/w μείγματος βενζοϊκού νατρίου και σορβικού καλίου (Microcare SB) που δρα ως συντηρητικό στις εξής πέντε αναλογίες:

- 100% H₂O
- 80%H₂O – 20% Γλυκερόλη
- 60% H₂O - 40% Γλυκερόλη
- 50% H₂O - 50% Γλυκερόλη
- 40% H₂O - 60% Γλυκερόλη

Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 4,8 g κιτρικού οξέος για τη ρύθμιση του pH του διαλύματος και 12 g μείγματος βενζοϊκού νατρίου και σορβικού καλίου (Microcare SB) που δρα ως συντηρητικό. Στο τέλος προστέθηκε η απαιτούμενη ποσότητα γλυκερόλης κάνοντας ανάδευση μέχρι να ομογενοποιηθεί το μείγμα του διαλύτη.

2. Φυτικό υλικό: Τοποθετήθηκαν τα φύλλα (φυτικό υπόστρωμα) με προσοχή ώστε να αποφευχθεί ο θρυμματισμός σε σακούλα φίλτραρίσματος με μέγεθος

πόρων 50 microns, και εμβαπτίστηκαν σε διαλύτη αναλογίας 30 g υπόστρωμα /1200 g διαλύτη.

3. Παράμετροι εκχύλισης: Τέθηκε σε λειτουργία πρόγραμμα εκχύλισης 8 κύκλων με συνολικό χρόνο διαδικασίας 88 λεπτά, εκ των οποίων 5 δευτερόλεπτα υφίσταται πίεση και 6 δευτερόλεπτα αποσυμπίεσης. Η διπλή επίδραση της πίεσης/αποσυμπίεσης ενισχύει τη διεισδυτικότητα του διαλύτη στο φυτικό υπόστρωμα και βοηθά την εκχύλιση των βιοδραστικών του συστατιών. Η πίεση της συσκευής κυμαίνεται από 4 bar η ελάχιστη έως 9 bar η μέγιστη. Τέλος, μετά την παραλαβή των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε διήθηση με φίλτρα whatman, τοποθέτηση αυτών σε γυάλινα βάζα και αποθήκευση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

3.5 ΈΛΕΓΧΟΣ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ

Οι εταιρείες προβαίνουν στον έλεγχο σταθερότητας, στην προσπάθεια τους να εξασφαλίσουν ότι ένα νέο προϊόν τους ή ένα τροποποιημένο προϊόν τους πληρεί όλες τις φυσικοχημικές και μικροβιολογικές προδιαγραφές, καθώς και τη λειτουργικότητα και την εμφάνιση όταν αποθηκεύεται υπό συγκεκριμένες και κατάλληλες συνθήκες. Κατά τη διάρκεια Ελέγχου Σταθερότητας η οποία μπορεί να διαρκέσει 2 με 6 μήνες, εξετάζονται διάφορες παράμετροι. Στην περίπτωση που το νέο προϊόν είναι καλλυντικό, οι έλεγχοι αναφέρονται στη μελέτη φυσικοχημικών παραμέτρων.

Ουσιαστικά ελέγχεται το πόσο καλά τα καλλυντικά αντιστέκονται σε συνθήκες στρεσαρίσματος, όπως είναι οι ακραίες θερμοκρασίες και το φως. Παράλληλα, έλεγχος γίνεται και για τη συσκευασία των προϊόντων. Οι δοκιμές γίνονται με γυάλινο περιέκτη ο οποίος αποτελείται από ένα αδρανές υλικό, το οποίο δεν αντιδρά με τα καλλυντικά. Επίσης γίνεται έλεγχος για τυχόν απώλεια βάρους και διαφοροποίηση της σύστασης του προϊόντος κατά την αποθήκευσή του (Kanetis et al., 2017).

3.6 ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΥΔΡΟ-ΓΛΥΚΕΡΙΝΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ

Τα εκχυλίσματα από τα φύλλα του φυτού *Salvia triloba*, που προήλθαν από εκχύλιση υποβοηθούμενη υπό πίεση, χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου, την αντιοξειδωτική τους ικανότητα και του περιεχομένου των φλαβονοειδών. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε με χρήση φάσματος φωτόμετρου UV-VIS διπλής δέσμης τύπου UV-1800 (Shimadzu Europa) στις εγκαταστάσεις της εταιρίας Arivita.

3.6.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEU

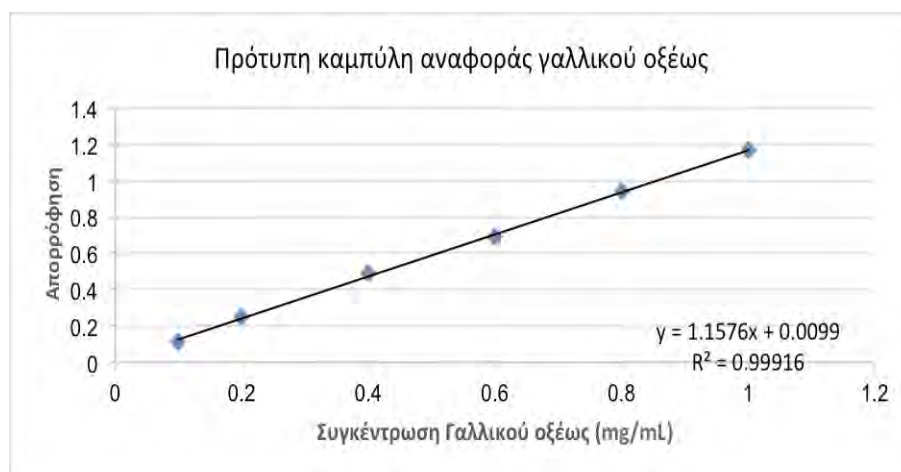
Η μέθοδος Folin-Ciocalteu χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του φαινολικού περιεχομένου.

Ακολουθεί η περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας των δειγμάτων. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου.

- Σε ένα σωλήνα τύπου erpendorf των 2 mL, τοποθετήθηκαν 1580 μL αποσταγμένου H_2O , 20 μL φυτικού εκχυλίσματος και 100 μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu
- Έγινε ανάδευση και ακολούθησε αναμονή για 1 λεπτό
- Προστέθηκαν 300 μL κορεσμένου διαλύματος Na_2CO_3 20% w/v και έγινε ανάδευση σε συσκευή Vortex
- Ακολούθησε αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 120 λεπτά απουσία φωτός
- Τέλος, το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρήθηκε στα 750 nm

Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε παράλληλα με δύο δείγματα ελέγχου, με αντικατάσταση του φυτικού εκχυλίσματος με 20 μL MeOH . Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του φαινολικού περιεχομένου στα φυτικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκε

πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γαλλικού οξέος και εκφράστηκε ως ισοδύναμο γαλλικού οξέος (GA) ανά L. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς δημιουργήθηκε με τη φωτομέτρηση γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος. Αναλυτικότερα, ζυγίστηκαν 0,08 g γαλλικού οξέος και στη συνέχεια διαλύθηκαν σε 50 mL EtOH, δημιουργώντας αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 1,6 mg/mL. Από το αρχικό διάλυμα και με διαδοχικές αραιώσεις δημιουργήθηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 1,0, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 και 0,1 mg/mL. Από τη πρότυπη καμπύλη προέκυψε η συνάρτηση (1) $y = 1,1576 x + 0,0099$ με $R^2 = 0,9992$. Οι απορροφήσεις ανάγονται σε συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος, όπου η τιμή εκφράζει το φαινολικό περιεχόμενο. Ακολούθησε φωτομέτρηση όλων των παραγόμενων αραιωμένων διαλυμάτων συν του αρχικού διαλύματος γαλλικού οξέος (GA) στα 750 nm.



Σχήμα 3.1 Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή Folin–Ciocalteu.

3.6.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ $AlCl_3$

Στη παρούσα ενότητα παρουσιάζεται η πειραματική πορεία:

- Σε ένα σωλήνα τύπου erpendorf των 2 mL, τοποθετήθηκαν 2 mL, 1 mL φυτικού εκχυλίσματος, 0.5 mL $AlCl_3$ και 0.5 mL αποσταγμένου H_2O
- Στη συνέχεια έγινε ανάδευση σε συσκευή Vortex
- Τα δείγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

απουσία φωτός

- Τέλος, το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρήθηκε στα 425 nm

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, στη συγκεκριμένη μέθοδο, για κάθε φυτικό δείγμα χρησιμοποιείται ξεχωριστό δείγμα ελέγχου όπου το αντιδραστήριο έχει αντικατασταθεί με 0,5 mL απεσταγμένου H₂O. Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με χρήση δείγματος που περιείχε μόνο MeOH. Συνολικά κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

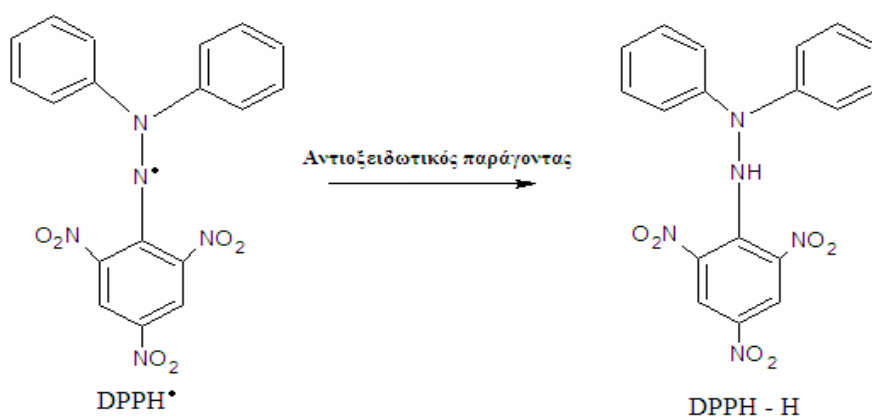
Παρασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς κερκετίνης (μM) η οποία ανήκει στην υποκατηγορία των φαινολών. Αναλυτικότερα, 0,0169 g άνυδρης κερκετίνης διαλύθηκαν σε 100 mL MeOH σχηματίζοντας το αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 500 μM. Με χρήση του αρχικού διαλύματος και με διαδοχικές αραιώσεις δημιουργήθηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 62,5, 50, 32, 25, 12,5 και 6,25 μM. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την καμπύλη αναφοράς (ή πρότυπη καμπύλη) που περιγράφεται από την εξίσωση (3) $y=0,0131x- 0,0272$ και $R^2 =0,9991$. Βάσει αυτής, οι απορροφήσεις ανάγονται σε (μM) κερκετίνης. Τέλος, τα αποτελέσματα του ολικού φαινολικού περιεχομένου φλαβονοειδών παρουσιάστηκαν ως ισοδύναμα κερκετίνης.



Σχήμα 3.2 Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή AlCl₃.

3.6.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗΣ ΣΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΗΣ 1,1-ΔΙΦΑΙΝΟΛΟ-2-ΠΙΚΡΥΛΟ-ΥΔΡΑΖΥΛΟ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην απορρόφηση της ελεύθερης ρίζας 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH). Πρόκειται για μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδο για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων.



Σχήμα 3.3 Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) καθώς και της ανοιγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).

Πειραματική διαδικασία για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας:

- Σε ένα σωλήνα erpendorf των 2 mL, τοποθετήθηκαν 50 μ L φυτικού εκχυλίσματος και 1950 μ L διαλύματος DPPH (100 μ M)
- Έγινε ανάδευση με συσκευή Vortex
- Στη συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά απουσία φωτός
- Τέλος, το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρήθηκε στα 515 nm

Πραγματοποιήθηκε παράλληλα προετοιμασία δείγματος ελέγχου, όπου έγινε αντικατάσταση του φυτικού εκχυλίσματος με MeOH. Ο μηδενισμός του οργάνου έγινε με χρήση δείγματος που περιείχε μόνο MeOH. Συνολικά κάθε μέτρηση

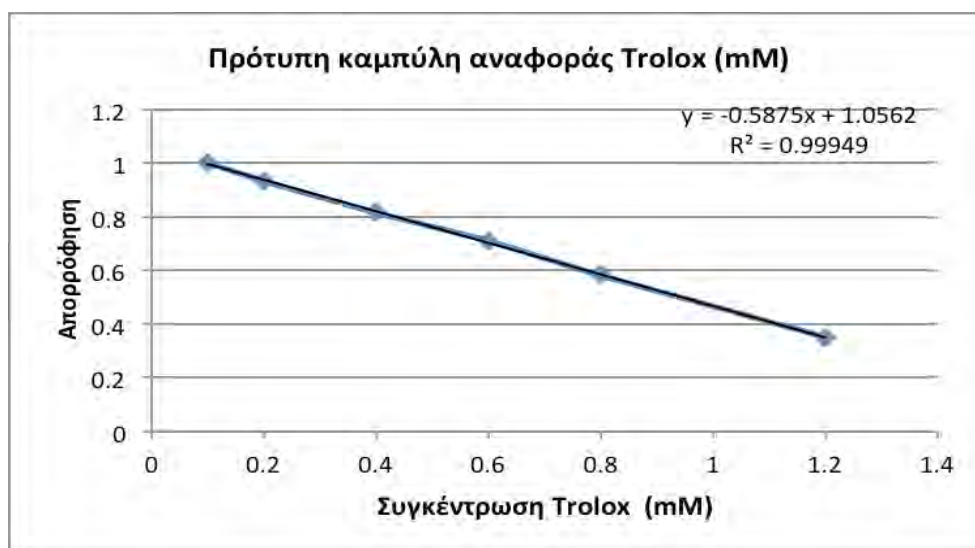
εκτελέστηκε σε τριπλή επανάληψη. Ο υπολογισμός της ποσοστιαίας αναστολής (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH έγινε βάσει του παρακάτω τύπου:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_\delta) / A_0 \times 100, \text{ όπου}$$

A_0 : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517nm

A_δ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm

Κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας Trolox mM το οποίο είναι ισοδύναμο υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E με ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH. Με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας θα εκφράζεται ως ισοδύναμο Trolox σε mM. Αναλυτικότερα, 0,04 g Trolox διαλύθηκαν σε 100 mL MeOH σχηματίζοντας το αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 1,6 mM. Από το αρχικό διάλυμα και με διαδοχικές αραιώσεις δημιουργήθηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 1,2, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 και 0,1 mM. Ακολούθησε φωτομέτρηση όλων των παραγόμενων αραιωμένων διαλυμάτων συν του αρχικού διαλύματος Trolox (GA) στα 515 nm. Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει η συνάρτηση (2) $y = -0,5875x + 1,0562x$ και $R^2 = 0,9995$. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της συνάρτησης ανάγονται σε συγκεντρώσεις Trolox (mg/mL).



Σχήμα 3.3 Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή DPPH

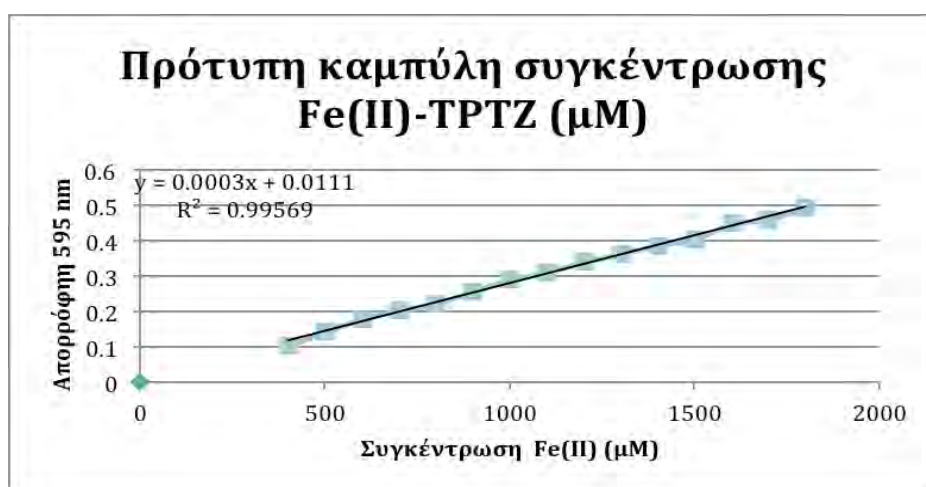
3.6.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ FRAP

Η μέθοδος προσδιορισμού FRAP βασίζεται στην ικανότητα των δειγμάτων για αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου προς δισθενή, η οποία σχετίζεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα (Benzie & Strain 1996). Η αντίδραση μετρά την αναγωγή του συμπλοκου τριχλωριούχου σιδήρου – TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) προς ένα έγχρωμο προϊόν. Η αναγωγή πραγματοποιείται σε όξινο περιβάλλον ώστε να διατηρηθεί η διαλυτότητα του σιδήρου (Benzie & Strain 1996). Με αυτό τον τρόπο εκφράζεται η αναγωγική/αντιοξειδωτική ισχύς των πολυφαινολικών ενώσεων. Το προϊόν της αντίδρασης προσδιορίζεται με φωτομέτρηση στα 593-595 nm. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ισχύος είναι η εξής

- Τοποθετήθηκαν 7 μL δείγματος σε μια κυψελίδα
- Στη συνέχεια προστέθηκαν 2000 μL αποσταγμένου H₂O και 900 μL διαλύματος FRAP
- Ακολούθησε προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 500 μL και ανάδευση
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C απουσία φωτός για 90 λεπτά, λαμβάνοντας τη μέγιστη απορρόφηση
- Τέλος, η απορρόφηση του έγχρωμου συμπλόκου του δισθενούς σιδήρου [Fe(II)(TPTZ)₂]²⁺ φωτομετρήθηκε στα 595 nm

Σε κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε τριπλή επανάληψη. Για την παρασκευή δείγματος ελέγχου τοποθετήθηκαν όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια και στη θέση του δείγματος ίση ποσότητα διαλύτη. Η προετοιμασία των φυτικών δειγμάτων και των αντίστοιχων δειγμάτων ελέγχου έγινε παράλληλα. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν την μέρα που πραγματοποιήθηκε και η πειραματική διαδικασία. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα δείγματα που προήλθαν από εκχύλιση με υπερήχους.

Δημιουργείται παράλληλα η πρότυπη καμπύλη αναφοράς του σύμπλοκου Fe (II) TPTZ. Η συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ισχύς, με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης, εκφράζεται ως μM παραγόμενου συμπλόκου Fe (II)-TPTZ. Με χρήση του αρχικού διαλύματος και πραγματοποιώντας διαδοχικές αραιώσεις δημιουργήθηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 400, 500, 600, 700 και 1800 μM . Από την πρότυπη καμπύλη προέκυψε η συνάρτηση (4) $y=0,0003x-0,0111$ και $R^2=0,9957$. Τέλος, έγινε επώαση όλων των δειγμάτων για 90 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 37°C . Η φωτομέτρηση των αραιωμένων διαλυμάτων έγινε στα 595 nm.



Σχήμα 3.4 Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης Fe(III) – TPTZ (μM).

3.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ MICROPLATE READER

Ο καθορισμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή Infinite® 200 PRO NanoQuant Multimode Microplate Reader (Tecan Trading).

3.7.1 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEAU

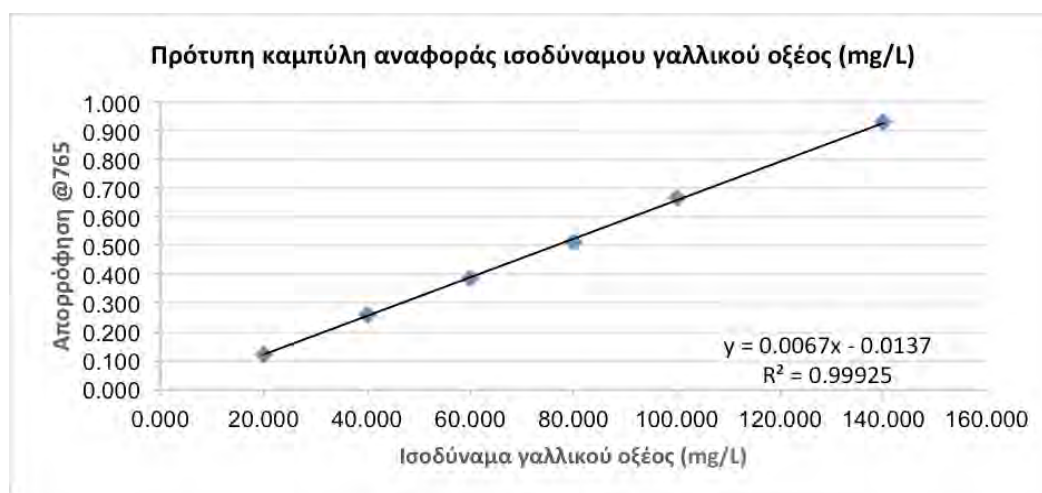
Στην πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου χρησιμοποιήθηκε αραιωμένο διάλυμα Folin-Ciocalteu 10 v/v που παρασκευάστηκε φρέσκο πριν την εκτέλεση των πειραμάτων, καθώς και

διάλυμα Na_2CO_3 7.5% w/v. Η διαδικασία περιλάμβανε τα παρακάτω στάδια:

- Τοποθετήθηκαν 25 μL δείγματος σε 96 well-plate, 125 μL διαλύματος Folin-Ciocalteu 10 v/v και 100 μL υδατικού διαλύματος Na_2CO_3
- Ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός. Απαραίτητη προϋπόθεση ήταν η κάλυψη των well-plate με parafilm.
- Τέλος, το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρήθηκε στα 765 nm με συσκευή Infinite M200 pro TECAN

Για την παρασκευή δείγματος ελέγχου τοποθετήθηκε MeOH στη θέση του δείγματος.

Η συγκέντρωση των πολυφαινολών εκφράζεται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέως. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο όπως στην ενότητα (3.6.1). Από την πρότυπη καμπύλη προέκυψε η συνάρτηση (5) $y = 0,0067x - 0,0137$ και $R^2 = 0,9993$. Βάσει αυτής της καμπύλης ανάγονται οι απορροφήσεις προς συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος.



Σχήμα 3.5 Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή Folin–Ciocalteu

3.7.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΗ ΣΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH·

Η πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας είναι η εξής:

- Τοποθετήθηκαν 10 μL δείγματος σε 96 well-plate και 190 μL διαλύτη DPPH
- Έγινε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός. Απαραίτητη προϋπόθεση ήταν η κάλυψη των well-plate με parafilm.
- Τέλος, το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρήθηκε στα 517 nm με συσκευή Infinite M200 pro TECAN

Παράλληλα με την παραπάνω διαδικασία παρασκευαζόταν το δείγμα ελέγχου, το οποίο αντί για φυτικό δείγμα περιείχε MeOH .

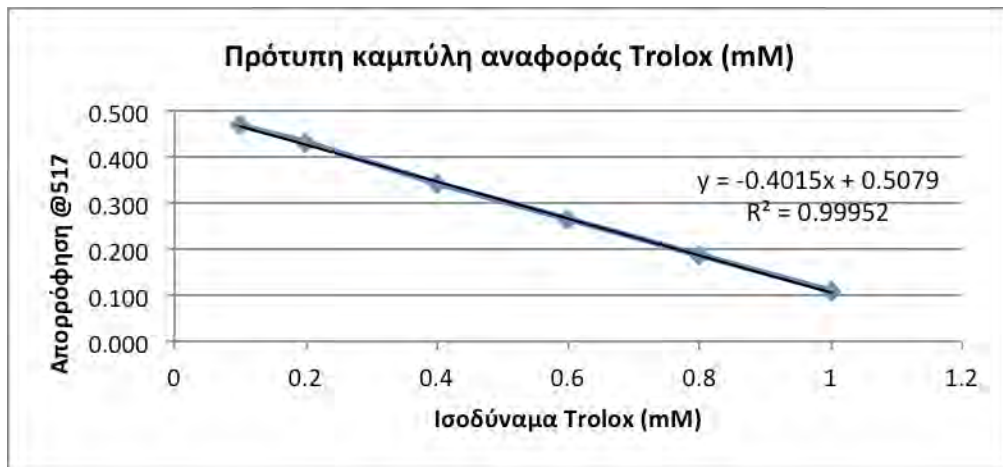
Η ποσοστιαία αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίζεται από τον τύπο :

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_\delta) / A_0 \times 100, \text{ όπου}$$

A_0 : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517nm

A_δ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm

Σχεδιάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox mM, ισοδύναμο βιταμίνης E με την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Η πρότυπη καμπύλη Trolox παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο όπως αναφέρεται στην ενότητα (3.6.3). Η συνάρτηση που προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη είναι (6) $y = -0,4015x + 0,5079$ και $R^2 = 0,9995$. Οι απορροφήσεις ανάγονται σε συγκεντρώσεις Trolox (mg/mL).



Σχήμα 3.6 Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή DPPH.

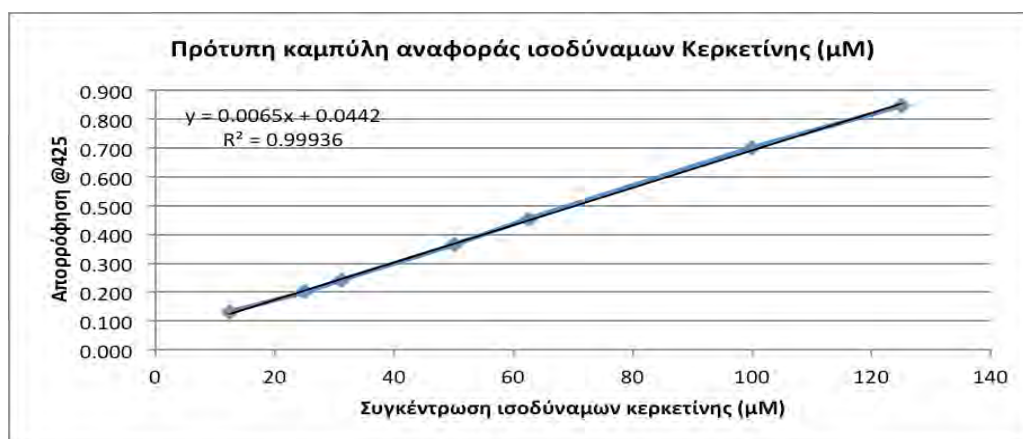
3.7.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ $AlCl_3$ (TFC)

Η πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου φλαβονοειδών είναι η εξής:

- Τοποθετήθηκαν 100 μ L δείγματος σε 96 well-plate και 100 μ L διαλύματος $AlCl_3$
- Ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός. Απαραίτητη προϋπόθεση ήταν η κάλυψη των well-plate με parafilm.
- Τέλος, το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρήθηκε στα 425 nm με συσκευή Infinite M200 pro TECAN

Σε κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε τριπλή επανάληψη. Για την παρασκευή δείγματος ελέγχου τοποθετήθηκαν 100 μ L αποσταγμένου H_2O στη θέση του αντιδραστήριου. Για κάθε φυτικό δείγμα παρασκευάστηκε αντίστοιχο δείγμα ελέγχου. Ο μηδενισμός του φωτόμετρου έγινε με καθαρή $MeOH$. Παράλληλα σχεδιάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς κερκετίνης με τον ίδιο τρόπο, όπως στην ενότητα (3.6.3). Τα αποτελέσματα του ολικού φαινολικού παρουσιάζονται ως ισοδύναμα κερκετίνης. Από την πρότυπη καμπύλη προέκυψε η συνάρτηση (7) $y = 0,0065 - 0,0442$ και $R^2 = 0,9994$. Οι απορροφήσεις ανάγονται σε μ M

κερκετίνης.



Σχήμα 3.7 Καμπύλη αναφοράς της πρότυπης ουσίας του γαλλικού οξέος (GA) για τη δοκιμή $AlCl_3$

3.8 ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Η παρούσα μελέτη παρήγαγε πέντε διαφορετικά εκχυλίσματα με υπερήχους. Για λόγους σύγκρισης τα αποτελέσματα για κάθε εκχύλισμα εκφράστηκαν ανά μονάδα όγκου. Για κάθε δείγμα βρέθηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (standard deviation – SD) των μετρήσεων. Η επεξεργασία των τιμών έγινε με στατιστικό τρόπο (έλεγχος t) στο στατιστικό πρόγραμμα SPSS v.10.0.

Για να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων της *Salvia triloba* σε φαινολικές ουσίες εφαρμόστηκε η φασματοφωτομετρία Folin–Ciocalteu. Για να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδή εφαρμόστηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος $AlCl_3$. Τέλος για να προσδιοριστεί η αντιοξειδωτική-αναγωγική ισχύς εφαρμόστηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος DPPH και FRAP. Οι τιμές προσδιορίστηκαν βάσει πρότυπης καμπύλης αναφοράς για κάθε πείραμα. Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R) κάθε καμπύλης θεωρήθηκε ικανοποιητική ($R > 0,95$). Τέλος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις δοκιμές σταθερότητας των εκχυλισμάτων που προσδιορίστηκε με την τεχνική εκχύλισης PLE.

Πίνακας 3.2 Προσδιορισμός απόδοσης των εκχυλισμάτων UAE

Εκχυλίσματα UAE	% w/w απόδοση της εκχύλισης (g εκχυλισθέντων ουσιών ανά 100 g δείγματος)
H ₂ O	13,5 ± 5,5
H ₂ O-MeOH 4:1 (v/v)	24,7 ± 3,0
H ₂ O-MeOH 1:1 (v/v)	25,6 ± 7,0
H ₂ O-MeOH 1:4 (v/v)	26,8 ± 5,8
MeOH	12,8 ± 3,3

Στην παρούσα μελέτη παρασκευάστηκαν πέντε διαφορετικά εκχυλίσματα με υπερήχους. Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζεται, η απόδοση της τεχνικής με υπερήχους για κάθε διαλύτη.

Στον Πίνακα 3.2, τα εκχυλίσματα H₂O-MeOH 1:4 (v/v) και H₂O- MeOH 1:1 (v/v) (26,8 ± 5,8 και 25 ± 7,0 αντίστοιχα) παρουσιάζουν μεγαλύτερη απόδοση. Τα εκχυλίσματα H₂O και MeOH (13,5 ± 5,5 και 12,8 ± 3,3 αντίστοιχα) εμφανίζουν συγκριτικά την χαμηλότερη απόδοση. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα η ανάμιξη των διαλυτών H₂O και MeOH σε αναλογίες 1:1 (v/v) 1:4 (v/v) έχουν την μεγαλύτερη απόδοση. Χρησιμοποιώντας τη τεχνική της εκχύλισης με υπερήχους και τις προαναφερθείσες αναλογίες επιτυγχάνεται η επιθυμητή παραλαβή συστατικών από εκχυλίσματα των φύλλων *Salvia triloba*.

3.8.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ (TPC) ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (UAE) ΚΑΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PLE).

Στα εκχυλίσματα εφαρμόστηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος Folin-

Ciocaluteau για την εκτίμηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς Γαλλικού οξέος (GAE). Τα αποτελέσματα που συνοψίζονται αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα είναι εκφρασμένα ως ισοδύναμα Γαλλικού οξέως (GAE).

Πίνακας 3.3 Συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων εκφρασμένη σε μg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική PLE των φύλλων *Salvia triloba* L (Μέσος όρος \pm SD)

Εκχυλίσματα		GAE ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
PLE	H ₂ O	710,4 \pm 6,2
	H ₂ O-Glyc 4:1 (v/v)	279,1 \pm 1,8
	H ₂ O-Glyc 3:2 (v/v)	200,3 \pm 8,9
	H ₂ O-Glyc 1:1 (v/v)	162,0 \pm 8,0
	H ₂ O-Glyc 2:3 (v/v)	145,9 \pm 1,2

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.3, παρατηρείται ότι σε σύγκριση με όλα τα υδρο-γλυκερινικά εκχυλίσματα που προήλθαν από τη τεχνική εκχύλισης υποβοηθούμενη υπό πίεση, το υδατικό εκχύλισμα H₂O είναι πλουσιότερο σε φαινολικές ενώσεις. Η απόδοση του H₂O αντιστοιχεί σε 719,4 \pm 6,2 μg (GAE/mL). Η μεγάλη απόδοση του, μπορεί να οφείλεται στην πολικότητα που εμφανίζει το νερό ως διαλύτης έχοντας την δυνατότητα να συμπαρασύρει πολικές ενώσεις όπως είναι στην παρούσα μελέτη αναφερόμαστε στα φαινολικά μόρια.

Τα εκχυλίσματα που ακολουθούν με αυξημένη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις των φύλλων *Salvia triloba* είναι H₂O-Glyc 4:1 (v/v) και H₂O-

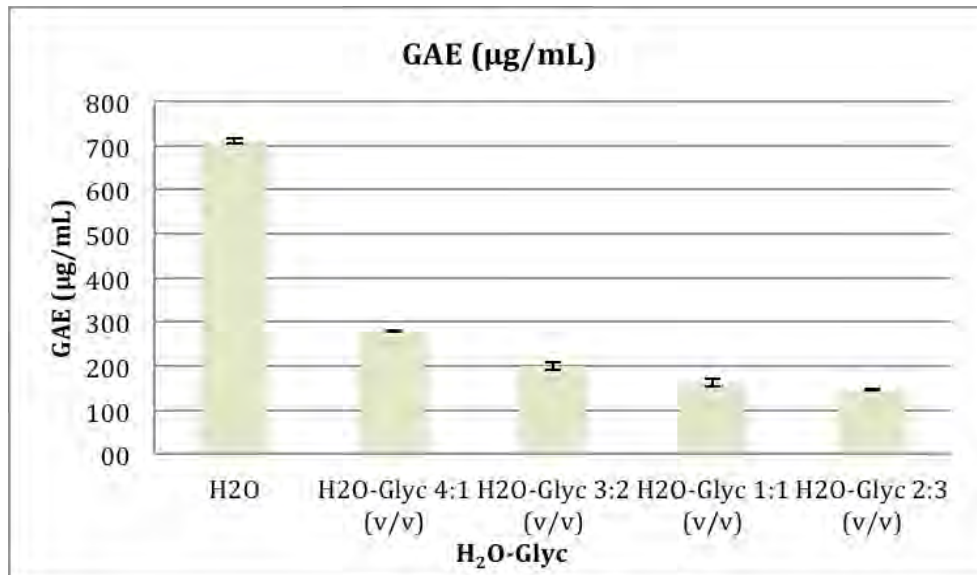
Glyc 3:2 (v/v) με αντίστοιχες συγκεντρώσεις $279,1 \pm 1,8$ και $200,3 \pm 8,9$ $\mu\text{g GAE/mL}$ εκχυλίσματος, αντιστοίχως. Τέλος, χαμηλή απόδοση σε φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν τα εκχυλίσματα H_2O -Glyc 1:1 (v/v) με τιμή $162,0 \pm 8,0$ και H_2O -Glyc 2:3 (v/v) με τιμή $145,9 \pm 1,2$ εμφανίζουν χαμηλή απόδοση σε φαινολικές ενώσεις. Ακόμα, παρατηρείται ότι, όσο αυξάνεται ποσότητα της γλυκερόλης και μειώνεται η ποσότητα νερού στο συνολικό όγκο του διαλύτη τόσο μειώνεται η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις.

Πίνακας 3.4 Συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων εκφρασμένη σε μg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική UAE των φύλλων *Salvia triloba* L (Μέσος όρος \pm SD)

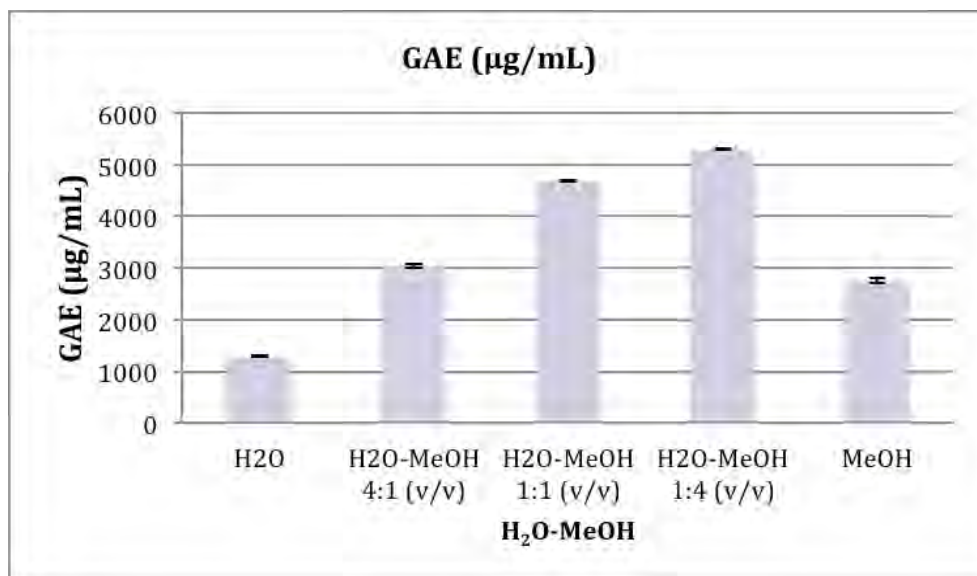
Εκχυλίσματα		GAE ($\mu\text{g/mL}$)
UAE	H_2O	1285 ± 16
	H_2O -MeOH 4:1 (v/v)	3044 ± 40
	H_2O -MeOH 1:1 (v/v)	4692 ± 12
	H_2O -MeOH 1:4 (v/v)	5294 ± 17
	MeOH	2760 ± 50

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.4, μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα της τεχνικής UAE (H_2O , H_2O -MeOH 4:1 (v/v), H_2O -MeOH 1:1 (v/v), H_2O -MeOH 1:4 (v/v), MeOH). Τα εκχυλίσματα με τη μεγαλύτερη αυξημένη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις των φύλλων *Salvia triloba* είναι H_2O -MeOH 1:4 (v/v) και H_2O -MeOH 1:1 (v/v) με αντίστοιχες τιμές 5294 ± 17 και 4692 ± 12 $\mu\text{g GAE}$ ανά 1 /mL εκχυλίσματος. Η παραλαβή των εκχυλισμάτων προήλθε από εκχύλιση με υπερήχους. Ακολουθούν σε απόδοση τα εκχυλίσματα H_2O -MeOH 4:1 (v/v) και MeOH με αντίστοιχες τιμές 3044 ± 40 και 2760 ± 50 $\mu\text{g GAE/mL}$ εκχυλίσματος. Συγκριτικά με τα όλα τα εκχυλίσματα

των υπερήχων, την χαμηλότερη απόδοση σε περιεκτικότητα ολικών φαινολικών μορίων την είχε το υδατικό διάλυμα του H₂O με συγκέντρωση 1285 ± 16 μg GAE/mL εκχυλίσματος.



Γράφημα 3.1 Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών που εκχυλίστηκαν με την τεχνική PLE από φύλλα *Salvia triloba*, εκφρασμένη σε μg ισοδύναμων του γαλλικού οξέως ανά mL εκχυλίσματος



Γράφημα 3.2 Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών που εκχυλίστηκαν με την τεχνική UAE από φύλλα *Salvia triloba*, εκφρασμένη σε μg ισοδύναμων γαλλικού οξέως ανά mL εκχυλίσματος.

3.8.2 Η ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ (TFC) ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (UAE) ΚΑΙ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ (PLE).

Στα εκχυλίσματα εφαρμόστηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος του χλωριούχου αργιλίου (AlCl_3). Τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς της κερκετίνης. Τα αποτελέσματα που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα 3.5 είναι εκφρασμένα ως ισοδύναμα κερκετίνης (QE).

Πίνακας 3.5. Συγκέντρωση των φλαβονοειδών εκφρασμένη σε μg ισοδύναμων της κερκετίνης (Quercetin Equivalents, QE) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική PLE των φύλλων *Salvia triloba* (Μέσος όρος \pm SD)

Εκχυλίσματα		QE ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
PLE	H_2O	$8,64 \pm 0,63$
	H_2O -Glyc 4:1 (v/v)	$6,60 \pm 0,11$
	H_2O -Glyc 3:2 (v/v)	$4,13 \pm 0,15$
	H_2O -Glyc 1:1 (v/v)	$2,99 \pm 0,10$
	H_2O -Glyc 2:3 (v/v)	$2,30 \pm 0,41$

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.5, στα εκχυλίσματα με την τεχνική PLE, παρουσιάζεται πτώση της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών όσο αυξάνεται η ποσότητα της γλυκερίνης στο μείγμα των διαλυτών. Το υδατικό διάλυμα του H_2O παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση με τιμή $8,64 \pm 0,63 \mu\text{g}$ QE /mL εκχυλίσματος. Τέλος, τα εκχυλίσματα με H_2O – Glyc 1:1 (v/v) ($2,99 \pm 0,10 \mu\text{g}$

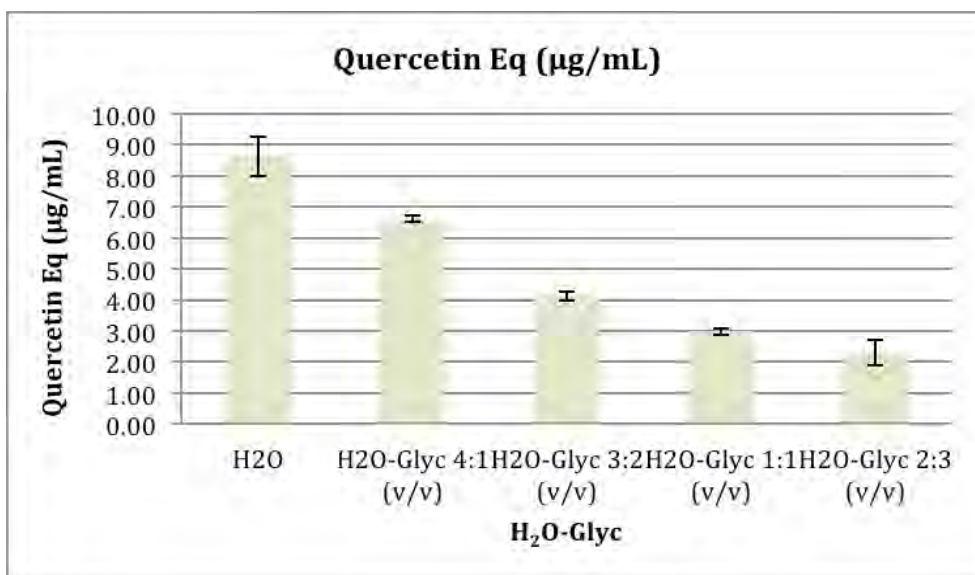
QE/ml) και H₂O – Glyc 2:3 (v/v) (2,30 ± 0,41 µg QE/ml) εμφανίζουν παρόμοια περιεκτικότητα σε συγκεντρώσεις φλαβονοειδών. Όσο αναφορά τα εκχυλίσματα της τεχνικής PLE, παρουσιάζεται πτώση της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών όσο αυξάνεται η ποσότητα της γλυκερόλης στο μείγμα των διαλυτών.

Πίνακας 3.6 Συγκέντρωση των φλαβονοειδών εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων της κερκετίνης (Quercetin Equivalents, QE) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική UAE των φύλλων *Salvia triloba* L (Μέσος όρος ± SD)

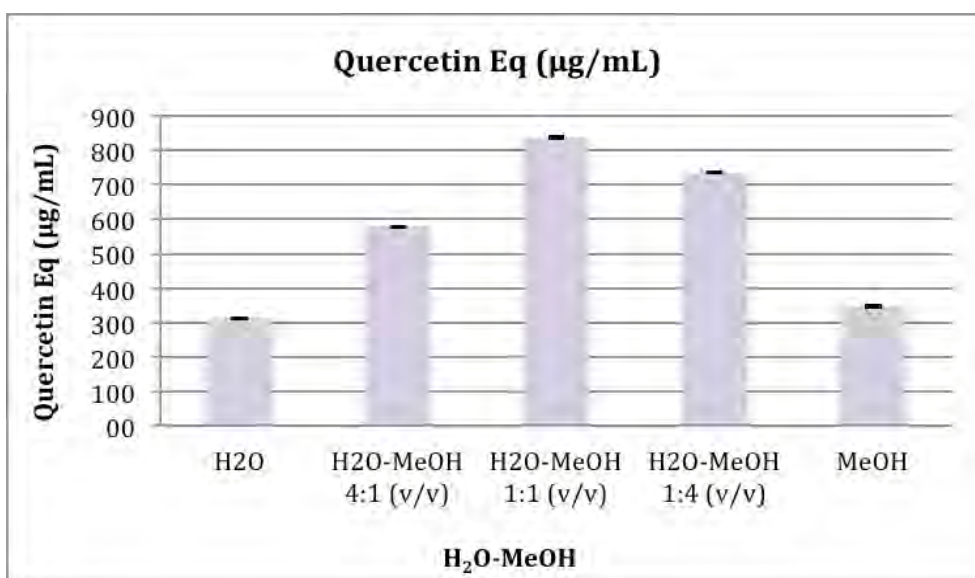
Εκχυλίσματα		QE (µg/mL)
UAE	H ₂ O	313,3 ± 1,1
	H ₂ O-MeOH 4:1 (v/v)	578,4 ± 1,7
	H ₂ O-MeOH 1:1 (v/v)	837,0 ± 2,8
	H ₂ O-MeOH 1:4 (v/v)	734,3 ± 2,3
	MeOH	347,7 ± 4,1

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.6, τα εκχυλίσματα H₂O – MeOH 1:1 (v/v) και H₂O – MeOH 1:4 (v/v) έχουν την μεγαλύτερη συγκέντρωση φλαβονοειδών με αντίστοιχες συγκεντρώσεις 837,0 ± 2,8 και 734,3 ± 2,3 µg QE /mL εκχυλίσματος. Στη συνέχεια ακολουθεί το εκχύλισμα H₂O-MeOH 4:1 (v/v) με τιμή 578,4 ± 1,7 µg QE/mL εκχυλίσματος. Από την τεχνική UAE, τα εκχυλίσματα με τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή, χωρίς να έχουν μεγάλη διαφορά μεταξύ τους είναι MeOH και H₂O συγκεντρώσεις 347,7 ± 4,1 και 313,3 ± 1,1 µg QE/mL εκχυλίσματος, αντιστοίχως.

Στα γραφήματα 3.3 και 3.4 παρουσιάζεται η σύγκριση της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με την τεχνική PLE από φύλλα *Salvia triloba* και η σύγκριση της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών που λήφθηκαν με την τεχνική UAE από φύλλα *Salvia triloba* αντίστοιχα.



Γράφημα 3.3 Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών που εκχυλίστηκαν με την τεχνική PLE από φύλλα *Salvia triloba* εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων κερκετίνης ανά mL εκχυλίσματος.



Γράφημα 3.4 Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών που εκχυλίστηκαν με την τεχνική UAE από φύλλα *Salvia triloba* εκφρασμένη σε µg κερκετίνης ανά mL εκχυλίσματος.

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

Στα εκχυλίσματα εφαρμόστηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος DPPH για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Ο προσδιορισμός των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς της ένωσης Trolox (Βιταμίνη E). Τα αποτελέσματα που αναγράφονται στον Πίνακα 3.7 είναι εκφρασμένα ως ισοδύναμα Trolox (TE).

Πίνακας 3.7. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικής- ικανότητας εκφρασμένη σε µg Trolox (Trolox Equivalents, TE) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική PLE των φύλλων *Salvia triloba* L (Μέσος όρος \pm SD)

Εκχυλίσματα		Trolox Equiv.(µg/mL)
PLE	H ₂ O	1432 \pm 10
	H ₂ O-Glyc 4:1 (v/v)	1125 \pm 10
	H ₂ O-Glyc 3:2 (v/v)	1002 \pm 11
	H ₂ O-Glyc 1:1 (v/v)	824 \pm 11
	H ₂ O-Glyc 2:3 (v/v)	705 \pm 12

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.7, για τα εκχυλίσματα που προήλθαν από την εκχύλιση PLE παρατηρείται ότι οι τιμές της συγκέντρωσης έχουν φθίνουσα σειρά. Το υδατικό εκχύλισμα έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε αντιοξειδωτικές ενώσεις με συγκέντρωση 1432 \pm 10 µg TE /mL εκχυλίσματος. Στη συνέχεια ακολουθούν H₂O-Glyc 4:1 (v/v), H₂O-Glyc 3:2 (v/v), H₂O-Glyc 1:1 (v/v) με αντίστοιχες συγκεντρώσεις (1125 \pm 10, 1002 \pm 11, 824 \pm 11). Τέλος, το εκχύλισμα H₂O-Glyc 2:3 (v/v) έχει τη μικρότερη συγκέντρωση 705 \pm 12 µg TE /mL εκχυλίσματος. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα οι συγκεντρώσεις

των φλαβονοειδών εμφανίζουν μια θετική συσχέτιση με τις συγκεντρώσεις των ολικών φαινολικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των φλαβονοειδών αυξάνεται και η αντιοξειδωτική ικανότητα των αντιστοιχών εκχυλισμάτων. Αντίστοιχα αυτό συμβαίνει και στα εκχυλίσματα που προήλθαν από την τεχνική PLE. Επικρατεί η επιστημονική άποψη πως όσο περισσότερα φαινολικά μόρια υπάρχουν σε ένα δείγμα τόσο αυξάνεται και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Χία et al. 2013). Ωστόσο, αυτό δεν ισχύει γενικά διότι κάποιες φορές η αντιοξειδωτική δράση οφείλεται σε αντιδράσεις με άλλα χημικά μόρια που υπάρχουν στα εκχυλίσματα (Fernandes et al. 2013).

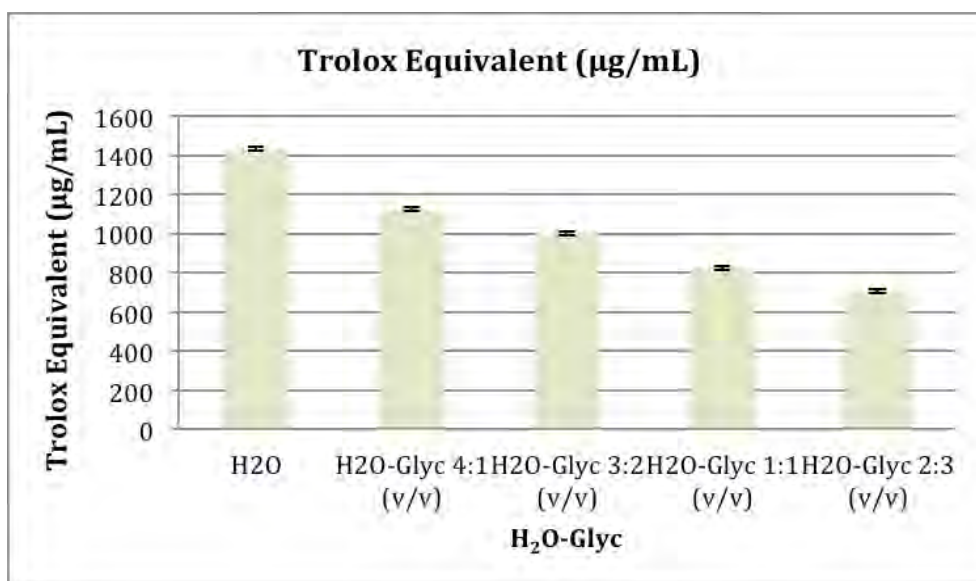
Πίνακας 3.8 Συγκέντρωση αντιοξειδωτικής-αντιριζικής ικανότητας εκφρασμένη σε µg Trolox (Trolox Equivalents, TE) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική UAE των φύλλων *Salvia triloba* L (Μέσος όρος ±SD)

Εκχυλίσματα		Trolox Equiv.(µg/mL)
UAE	H ₂ O	7731 ± 370
	H ₂ O-MeOH 4:1 (v/v)	10902 ± 480
	H ₂ O-MeOH 1:1 (v/v)	13739 ± 480
	H ₂ O-MeOH 1:4 (v/v)	16672 ± 931
	MeOH	9344 ± 732

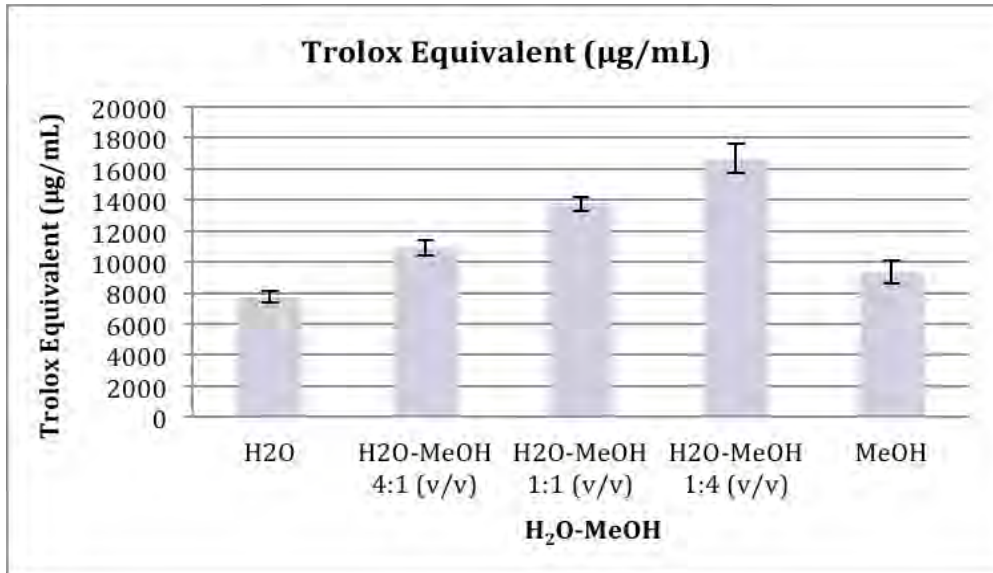
Σύμφωνα με τον παραπάνω Πίνακα 3.8, παρατηρείται σταδιακή αύξηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των δραστικών ελευθέρων ριζών όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των ισοδύναμων του Trolox. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αντιοξειδωτικής ισχύς των εκχυλισμάτων. Στα εκχυλίσματα που προήλθαν από την τεχνική εκχύλισης με υπερήχους, η συγκέντρωση των ισοδύναμων ενώσεων του Trolox είναι αρκετά αυξημένη. Το εκχύλισμα H₂O-MeOH 1:4 (v/v) με συγκέντρωση 16672 ± 931 µg TE /mL εκχυλίσματος, έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ισοδύναμα αντιοξειδωτικών ενώσεων. Στη συνέχεια ακολουθούν τα εκχυλίσματα H₂O-MeOH 1:1 (v/v) και H₂O-MeOH 4:1

(v/v) με διαφορά στη συγκέντρωση, 13739 ± 480 και 10902 ± 480 , αντίστοιχα. Τέλος, τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις, τις εμφανίζουν τα εκχυλίσματα MeOH με τιμή 9344 ± 732 $\mu\text{g TE /mL}$ εκχυλίσματος και το H₂O με χαμηλότερη συγκέντρωση απ' όλα τα εκχυλίσματα και τιμή 7731 ± 370 $\mu\text{g TE /mL}$ εκχυλίσματος.

Στα διαγράμματα 3.5 και 3.6, παρουσιάζονται η σύγκριση της αντιοξειδωτικής / ισχύος των εκχυλισμάτων με την τεχνική PLE από τα φύλλα *Salvia triloba* και η σύγκριση της αντιοξειδωτικής/ ισχύος των εκχυλισμάτων με την τεχνική UAE από τα φύλλα *Salvia triloba*.



Γράφημα 3.5 Συγκριτικό γράφημα της αντιοξειδωτικής ισχύος των εκχυλισμάτων με την τεχνική PLE από τα φύλλα *Salvia triloba*, εκφρασμένη σε μg ισοδύναμων Trolox ανά mL εκχυλίσματος.



Γράφημα 3.6 Συγκριτικό γράφημα της αντιοξειδωτικής/ ισχύος των εκχυλισμάτων με την τεχνική UAE από τα φύλλα *Salvia triloba* , εκφρασμένη σε µg ισοδύναμων Trolox ανά mL εκχυλίσματος.

3.8.4 Η ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ/ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΣΧΥΟΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΜΕΣΩ ΥΠΕΡΗΧΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟ ΠΙΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ FRAP.

Στα εκχυλίσματα εφαρμόστηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος FRAP για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ικανότητας των εκχυλισμάτων. Η λήψη των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς συγκεντρώσεων Fe (II) µg mL εκχυλίσματος. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η μέθοδος FRAP μπορεί να είναι συμπληρωματική της μεθόδου DPPH.

Πίνακας 3.9. Συγκέντρωση αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ικανότητας εκφρασμένη σε µg Fe (II) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική PLE των φύλλων *Salvia triloba* L (Μέσος όρος ± SD)

Εκχυλίσματα		Fe (II) µg/mL
PLE	H ₂ O	220,9 ± 9,2
	H ₂ O-Glyc 4:1 (v/v)	200,6 ± 7,0
	H ₂ O-Glyc 3:2 (v/v)	179,9 ± 5,0
	H ₂ O-Glyc 1:1 (v/v)	163,2 ± 3,5
	H ₂ O-Glyc 2:3 (v/v)	141,7 ± 2,1

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.9, το υδατικό εκχύλισμα (H₂O) που έχει παραχθεί από εκχύλιση υποβοηθούμενη υπό πίεση έχει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική/αναγωγική ικανότητα, κάτι που παρατηρείται και στα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των φλαβονοειδών, ολικών φαινολικών και αντιοξειδωτικής/ ικανότητας. Το H₂O ως διαλύτης έχει τη μεγαλύτερη απόδοση, με συγκέντρωση 220,9 ± 9,2 ενώ η απόδοση των υπόλοιπων διαλυτών ακολουθεί φθίνουσα πορεία. Ακολουθεί με διαφορά το εκχύλισμα H₂O-Glyc 4:1 (v/v) με τιμή 200,6 ± 7,0. Τα επόμενα δύο εκχυλίσματα με παρόμοιες τιμές είναι αυτά των H₂O-Glyc 3:2 (v/v) και H₂O-Glyc 1:1 (v/v) με συγκεντρώσεις 179,9 ± 5,0 και 163,2 ± 3,5, αντίστοιχα. Τέλος, τη χαμηλότερη απόδοση την είχε το εκχύλισμα H₂O-Glyc 2:3 (v/v) με τιμή 141,7 ± 2,1. Παρατηρείται ότι, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση γλυκερόλης, τόσο μειώνεται η αντιοξειδωτική/αναγωγική ικανότητα αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ικανότητας του εκχυλίσματος.

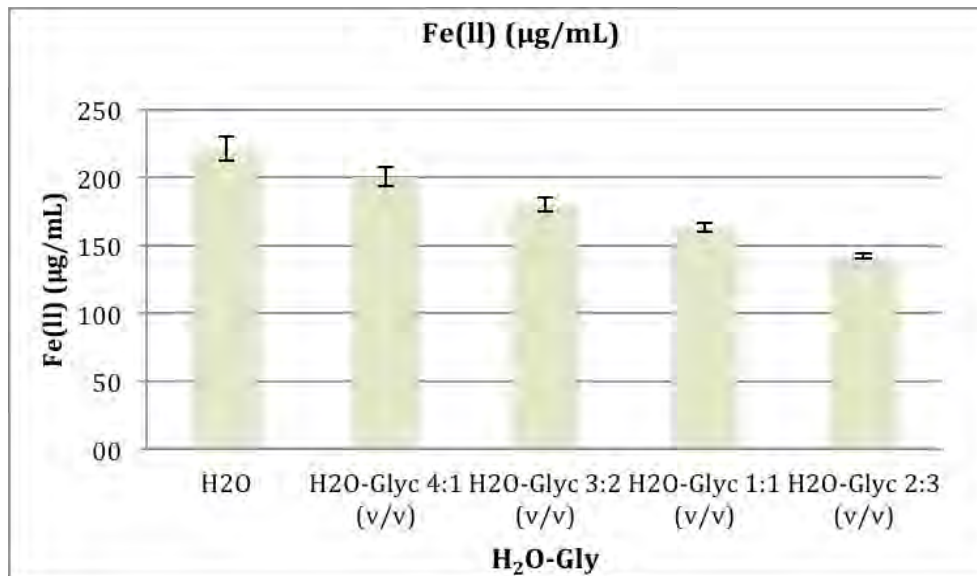
Πίνακας 3.10 Συγκέντρωση αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ικανότητας εκφρασμένη σε µg Fe (II) ανά mL εκχυλίσματος που προήλθαν από την τεχνική UAE φύλλων *Salvia triloba* L (Μέσος όρος ±SD)

Εκχυλίσματα	Fe (II) µg/mL
-------------	---------------

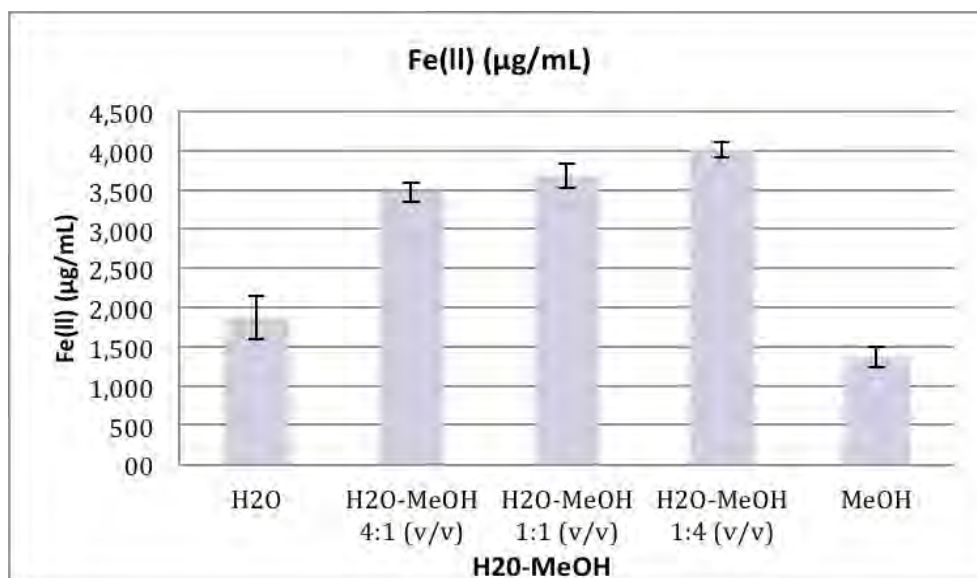
UAE	H ₂ O	1864,8±280,0
	H ₂ O-MeOH 4:1 (v/v)	3470,8±118,0
	H ₂ O-MeOH 1:1 (v/v)	3690,7±156,0
	H ₂ O-MeOH 1:4 (v/v)	4011,6±97,4
	MeOH	1371,1±126,0

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 3.10, τα εκχυλίσματα με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική/αναγωγική ικανότητα είναι τα H₂O-MeOH 1:4 (v/v), H₂O-MeOH 1:1 (v/v) και H₂O-MeOH 4:1 (v/v) με αντίστοιχες τιμές 4011,6 ± 97,4, 3690,7 ± 156,0 και 3470,8 ± 118,0. Αξιοσημείωτη είναι η μεγαλύτερη απόδοση του H₂O-MeOH 1:4 (v/v) με συγκέντρωση 4011,6 ± 97,4. Η αντιοξειδωτική/αναγωγική ισχύς των φυτικών εκχυλισμάτων από φύλλα *Salvia triloba* αποδίδεται στις αυξημένες συγκεντρώσεις φλαβονοειδών καθώς και ολικών φαινολικών. Αυξημένες συγκεντρώσεις επίσης παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα H₂O-MeOH 1:1 (v/v) και H₂O-MeOH 4:1 (v/v) με αντίστοιχες συγκεντρώσεις 3690,7 ± 156,0 και 3470,8 ± 118,0. Τέλος, το μεθανολικό και το υδατικό με συγκεντρώσεις 1371,1 ± 126,0 και 1864,8 ± 280,0 αντίστοιχα, εμφανίζουν τη χαμηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία πιθανόν να οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών.

Στη συνέχεια στα γραφήματα 3.7 και 3.8 παρουσιάζεται η σύγκριση της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ισχύος των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με την τεχνική PLE από φύλλα *Salvia triloba* και η σύγκριση της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ισχύος των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με την τεχνική UAE από φύλλα *Salvia triloba* αντίστοιχα.



Γράφημα 3.7 Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ισχύος των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με την τεχνική PLE από φύλλα *Salvia triloba*, εκφρασμένη σε Fe (II) µg ανά mL εκχυλίσματος.



Γράφημα 3.8 Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης αντιοξειδωτικής/αναγωγικής ισχύος των εκχυλισμάτων που λήφθηκαν με την τεχνική UAE από φύλλα *Salvia triloba*, εκφρασμένη σε Fe (II) µg ανά mL εκχυλίσματος.

3.8.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΦΑΣΜΑΤΟ-ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ FOLIN-CIOCALTEU (TPC), DPPH (TAC), FRAP ΚΑΙ $AlCl_3$ (TFC).

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

Πίνακας 3.11 Οι συντελεστές συσχέτισης κατά Pearson όπως υπολογίστηκαν από τα αποτελέσματα της μεθόδου UAE

Pearson's Correlations	TPC	TFC	DPPH	FRAP
% Yield				
TPC	1,000			
TFC	0,905	1,000		
DPPH	0,974	0,880	1,000	
FRAP	0,804	0,918	0,854	1,000

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που συνοψίζονται στον Πίνακα 3.11, φαίνεται ότι υπάρχει μεγάλη συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των μεθόδων Folin-Ciocalteu (TPC), DPPH (TAC), FRAP ΚΑΙ $AlCl_3$ (TFC). Η μεγάλη αντιοξειδωτική/αναγωγική ικανότητα, καθώς και η μεγάλη περιεκτικότητα σε φλανονοειδή, οφείλεται στη μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις των εκχυλισμάτων. Τα αποτελέσματα των μεθόδων $AlCl_3$ (TFC) και DPPH σε μεγάλο βαθμό συσχετίζονται μεταξύ τους, πράγμα που αιτιολογεί τη μεγάλη αντιοξειδωτική/αντιριζική ικανότητα των εκχυλισμάτων. Η κατάσταση αυτή οφείλεται στη δραστηριότητα των φλανοειδών ενώσεων οι οποίες έχουν εκχειλιστεί. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου FRAP, παρατηρείται

χαμηλή συσχέτιση των αποτελεσμάτων των αντίστοιχων μεθόδων $AlCl_3$ (TFC) και DPPH (TAC). Μια πιθανή αιτιολογία για τη χαμηλή συσχέτιση είναι ότι η αναγωγική ισχύς των εκχυλισμάτων μπορεί να οφείλεται και σε άλλες φαινολικές ενώσεις εκτός των φλαβονοειδών, όπως φαινολικά οξέα ή σπιλβένια (Katalinic et al. 2013, Dresch et al. 2014, Monagas et al.2006).

Πίνακας 3.12 Οι συντελεστές συσχέτισης κατά Pearson όπως υπολογίστηκαν μέσω των αποτελεσμάτων της μεθόδου PLE

Pearson's Correlations	TPC	TFC	DPPH	FRAP
F-C	1,000			
TFC	0,902	1,000		
DPPH	0,919	0,982	1,000	
FRAP	0,843	0,977	0,983	1,000

Στον Πίνακα 3.12 ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων και των φλαβονοειδών εμφανίζει θετική συσχέτιση. Σε ένα μεγάλο ποσοστό η αντιοξειδωτική ισχύς των εκχυλισμάτων PLE οφείλεται στα φλαβονοειδή. Βάσει των αποτελεσμάτων συνάγεται το συμπέρασμα ότι όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις τόσο αυξάνεται και η περιεκτικότητα φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή συστατικά υπερτερούν των φαινολικών, κάτι που εντοπίζεται μέσω του προσδιορισμού της αντιριζικής ικανότητας (DPPH) παρουσιάζοντας μεγαλύτερη συσχέτιση με την περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή. Όσον αφορά την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας της μεθόδου FRAP παρουσιάζει μεγαλύτερη συσχέτιση με τα αποτελέσματα της περιεκτικότητας των φλαβονοειδών ενώσεων.

3.8.6 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΗΛΘΑΝ

ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΡΛΕ

Η σταθερότητα των εκχυλισμάτων είναι ιδιαίτερα σημαντική για το τελικό προϊόν. Χαρακτηρίζεται από την διατήρηση της ποιότητας από άποψη εμφάνισης, οσμής, χρώματος και άλλων φυσικοχημικών ιδιοτήτων. Ο έλεγχος σταθερότητας των δειγμάτων διήρκησε τέσσερις εβδομάδες και αφορούσε μόνο τα υδρο-γλυκερινικά εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν μέσω της συσκευής Timatic. Η μελέτη διεξήχθη σε τέσσερα γυάλινα βαζάκια χωρητικότητας 30 mL τοποθετείται δείγμα από πέντε εκχυλίσματα πέντε διαφορετικών αναλογιών σε H₂O-Glyc

Στη συνέχεια δίνονται οι αναλογίες του εκχυλίσματος:

- H₂O
- 80% H₂O - 20% Glyc
- 60% H₂O - 40% Glyc
- 50% H₂O - 50% Glyc
- 40% H₂O - 60% Glyc

Η μελέτη διεξήχθη σε διάστημα μίας, δύο, τριών και τεσσάρων εβδομάδων, σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4 Εβδομαδιαίες μετρήσεις αποθήκευσης

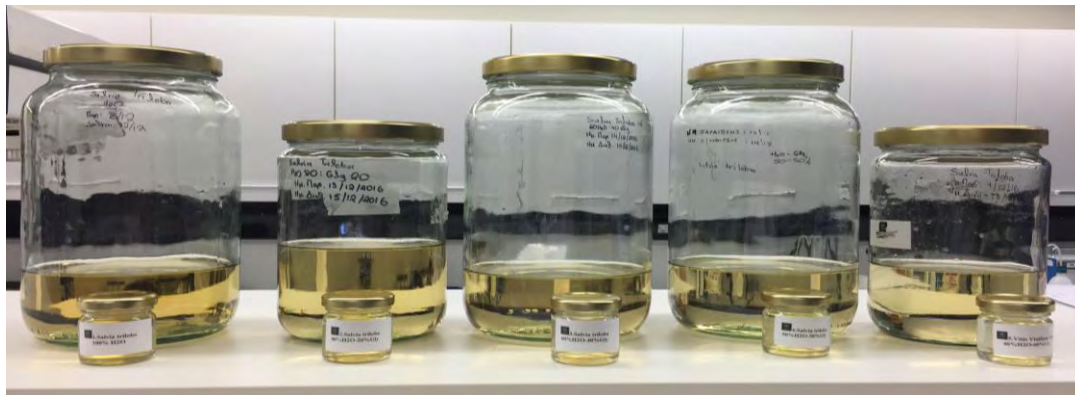
Τα εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν σε τέσσερα βαζάκια επειδή έπρεπε να

αποθηκευτούν σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, οι συνθήκες αποθήκευσης ήταν οι εξής:

Συνθήκες αποθήκευσης	<ul style="list-style-type: none">• 5-7 °C• 25°C• 38°C• UV ακτινοβολία
----------------------	---

Η διαδικασία ελέγχου της σταθερότητας των εκχυλισμάτων που προήλθαν από την τεχνική εκχύλισης PLE πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις της εταιρίας Arivita.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα πέντε εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών.



Εικόνα 3. 5 Ελεγκτική διαδικασία εκχυλισμάτων

Έπειτα ελέγχθηκαν τα παρακάτω φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όλων των εκχυλισμάτων σε πέντε διαφορετικούς χρόνους ($t=0$, 1η εβδομάδα, 2η εβδομάδα, 3η εβδομάδα και 4η εβδομάδα).

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	<ul style="list-style-type: none">• Πυκνότητα,• Βαθμός διάθλασης,• pH,• Χρώμα-όψη,• Οσμή
-----------------------------	--

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της πυκνότητας, του δείκτη διάθλασης (IR), των εκχυλισμάτων, καθώς και του pH. Ακόμα πραγματοποιήθηκε οπτική και οσφρητική αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και συγκεκριμένα του χρώματος, της οσμής και της όψης και στα πέντε εκχυλίσματα. Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα στην 1^η 2^η 3^η και 8^η εβδομάδα, από την ημέρα παραγωγής του κάθε εκχυλίσματος. Για την αξιολόγηση και καταγραφή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια όλων των εβδομάδων, έγινε χρήση μίας κλίμακας από 1-9. Το 9 αντιστοιχεί στην άριστη κατάσταση του εκχυλίσματος και ουσιαστικά σε μηδενική μεταβολή στο χρόνο. Αντίθετα, η χαμηλότερη διαβάθμιση της κλίμακας (το 1), υποδήλωνε μεγάλη μεταβλητότητα, και κατ' επέκταση αλλοίωση των αρχικών χαρακτηριστικών των εκχυλισμάτων με το πέρασμα του χρόνου.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα που αφορούν τους δείκτες διάθλασης, της πυκνότητας και του pH παρατηρήθηκε πολύ μικρή μεταβολή κατά τη διάρκεια του ελέγχου. Τα πέντε εκχυλίσματα εμφάνισαν μια σχετική σταθερότητα σε αυτές τις μετρήσεις σε όλες τις συνθήκες.

Δεν μπορεί να ειπωθεί το ίδιο και για το κομμάτι που αφορά το χρώμα, την όψη και την οσμή. Σε κάποια από τα εκχυλίσματα, και από την πρώτη κιόλας εβδομάδα αξιολόγησης, παρουσιάστηκαν μεταβολές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ήταν το εκχύλισμα με αναλογίες 60% H₂O και 40% γλυκερόλη.

Συμπερασματικά, το πιο σταθερό εκχύλισμα σε σχέση με το χρόνο, συγκριτικά με τα υπόλοιπα που προήλθαν από την ίδια μέθοδο PLE, είναι το εκχύλισμα *Salvia triloba* με διαλύτη 100% H₂O. Το εκχύλισμα αυτό παρουσίασε σταθερότητα καθ' όλη τη διάρκεια του ελέγχου σε όλες τις συνθήκες, 5-7°C, 25°C και UV εκτός από τους 38°C που από την πρώτη εβδομάδα υπήρξε αλλαγή χρωματισμού και δυσάρεστη οσμή. Αξίζει να σημειωθεί πως όλα τα δείγματα ήταν ευπαθή στους 38°C από τα πρώτα στάδια ελέγχου.

**ΜΕΛΕΤΗ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΠΤΗΞΗΣ ΝΕΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ
ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΛΛΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ
*Salvia triloba***

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΜΕΛΕΤΗ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑΣ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της μελέτης σκοπιμότητας είναι η παρουσίαση και ανάλυση των συνθηκών που επικρατούν στην αγορά των βοτάνων σήμερα καθώς και η εξέταση της εισχώρησης στην αγορά του τελικού προϊόντος. Ο εντοπισμός των πιθανών προβλημάτων, η αξιολόγηση των ευκαιριών, η εύρεση λύσεων σε περιπτώσεις εμφάνισης εμποδίων και η προετοιμασία εναλλακτικών μεθόδων αντιμετώπισής τους, συμπεριλαμβάνονται στην παρουσίαση της μελέτης.

Στόχος της μελέτης σκοπιμότητας είναι να εξεταστεί το τελικό προϊόν, που στη συγκεκριμένη περίπτωση αφορά προϊόν προσωπικής φροντίδας (νέα οδοντόκρεμα), ως προς τη θέση που μπορεί να καλύψει στην αγορά, καθιστώντας τελικά την ιδέα ως βιώσιμη ή μη. Ο απολογισμός από τη μελέτη σκοπιμότητας, καθορίζει την υλοποίηση ή απόρριψη της ιδέας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, εξετάζονται οι παραδοχές το τελικό προϊόν να διατεθεί ως φυσικό εκχύλισμα ή ως προϊόν προσωπικής φροντίδας.

Η παγκόσμια τάση των καταναλωτών να αναζητούν φυσικά προϊόντα για έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής έχει αυξήσει τη χρήση βιοδραστικών ενώσεων φυσικής προέλευσης σε τρόφιμα, καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα. Η προώθηση αυτών των προϊόντων συμβάλλει στην αύξηση της κατανάλωσης τους και τα φυσικά οδοντιατρικά προϊόντα αποτελούν τέτοιου είδους στόχο. Ο καταναλωτής συχνά προκαλείται να αγοράσει αυτά τα προϊόντα χωρίς να γνωρίζει σε βάθος στοιχεία που αφορούν τη δραστικότητα των συστατικών που περιλαμβάνονται στο προϊόν και την αποτελεσματικότητά τους.

4.2 ΑΝΑΓΚΕΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗ-ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Σήμερα οι καταναλωτές προσπαθούν να αλλάξουν τις αγοραστικές συνήθειες του παρελθόντος και να γίνουν πιο συνειδητοποιημένοι σε σχέση με τις αγορές τους για αυτό και υπάρχει ένας νέος προσανατολισμός προς τα οικολογικά, φυτικά και άλλου τέτοιου είδους προϊόντα.

Στη νέα αυτή τάση παίζει ρόλο η έξαρση διάφορων ασθενειών, η έξαρση

των παθήσεων της καρδιάς, η έξαρση του καρκίνου κ.λπ. που γενικά έχουν να κάνουν με τη διατροφή, την έλλειψη άσκησης, τους γρήγορους ρυθμούς ζωής, το άγχος κ.λ.π (deFreitas,2017). Η επιθυμία για αλλαγή στον τρόπο ζωής με την ανάπτυξη οικολογικής συνείδησης η οποία έχει σηματοδοτήσει μια ευρύτερη διαφοροποίηση στη συμπεριφορά των καταναλωτών, οι οποίοι ελέγχουν τι τρώνε, προσπαθούν να ασκηθούν, ενώ χρησιμοποιούν όποτε μπορούν προϊόντα φυτικά τα οποία θεωρούνται πιο ασφαλή. Η αλλαγή στο τρόπο ζωής έχει οδηγήσει στη χρήση φυτικών προϊόντων που σχετίζονται με τη φροντίδα προσώπου και σώματος που αφορούν την υγιεινή του ανθρώπου.

Το προϊόν αυτής της μελέτης, προέρχεται από φυτική πηγή και θα είναι εύκολα αποδεκτό για καθημερινή χρήση, ενώ σύγχρονος θα θεωρείται λιγότερο επικίνδυνο από τα υφιστάμενα.

Στη παρούσα μελέτη το βασικό προϊόν ανάλυσης είναι η οδοντόκρεμα, η οποία αποτελεί ένα προϊόν καθημερινής ανάγκης και είναι σημαντικό για τη στοματική υγιεινή. Υπάρχουν πολλά είδη οδοντόκρεμας, με διάφορα συστατικά, τα οποία ορίζουν ένα περιβάλλον ανταγωνιστικό και δύσκολο προς αντιμετώπιση. Το νέο προϊόν βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη αντιξειδωτική και αντιμικροβιακή του ικανότητα του εκχυλίσματος. Λόγω των ιδιοτήτων του φυτού *Salvia triloba* και της στυπτικής του δράσης, θα χρησιμοποιηθεί ως δραστικό συστατικό στο οδοντικό σκεύασμα.

Η δράση της οδοντόκρεμας σχετίζεται με ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων που αφορά την υγιεινή της στοματικής κοιλότητας, έχοντας σαν αποτέλεσμα την :

- Μείωση της ανάπτυξη της πλάκας,
- Αναστολή της φλεγμονής των ούλων και
- Προφύλαξη από την τερηδόνα.

Παράλληλα θα προσφέρει σταδιακή λεύκανση στα δόντια και δροσερή αναπνοή.

Σύμφωνα με την επιστημονική βιβλιογραφία, η σύνθεση μιας οδοντόκρεμας περιλαμβάνει συνήθως: ανθρακικό ασβέστιο, κόκκινο οξειδίο του σιδήρου και ένα βότανο ή εκχύλισμα αυτού (Kamath, 2010). Το εκχύλισμα του

που θα χρησιμοποιηθεί ως βασικό συστατικό για την παρασκευή οδοντοκρέμας, έχει πολλαπλούς ρόλους. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι στο οδοντικό σκεύασμα δεν θα περιέχονται χημικά συστατικά που έχουν κατηγορηθεί για αρνητικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου ή στο περιβάλλον, όπως Preservatives, Parabens, SLES & SLS, Colorants, Propylene glycol. Ακόμα, δεν περιέχει ουτε φθόριο, κάτι που το καθιστά αυτόματα κατάλληλο προϊόν στοματικής φροντίδας για όσους ακολουθούν ομοιοπαθητική.

Στη παρούσα μελέτη το φασκόμηλο προσφέρει ένα ιδιαίτερο άρωμα ενώ τα υψηλά ποσοστά αντιοξειδωτικών προσφέρουν προοδευτική λευκαντική δράση, επαναφέροντας το φυσικό λευκό των δοντιών. Με τις στυπτικές, και αντιμικροβιακές ιδιότητές του προσφέρει προστασία στα ούλα και τα δόντια. Η συνολική ποσότητα του φυτικού συστατικού στο τελικό προϊόν είναι σημαντική για την προαγωγή της στοματικής υγιεινής. Βάσει όλων των παραπάνω, το φυτικό εκχυλίσμα από φύλλα του φυτού *Salvia triloba* μπορεί να χρησιμοποιηθεί δυνητικά σε προϊόν οδοντόκρεμας.

Σύμφωνα με τις πειραματικές μελέτες που διεξήχθησαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, φαίνεται ότι τα εκχυλίσματα από φύλλα *Salvia triloba* είναι πλούσια σε φαινολικές ουσίες και αντιοξειδωτικά. Τα υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών εξεδετερώνουν τη σχηματιζόμενη πλάκα των δοντιών (Priscila et al, 2015). Τα φυτικά εκχυλίσματα του φυτού *Salvia triloba* εκτός από την μεγάλη αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζουν, έχουν και αντιμικροβιακή, η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί εξίσου στη νέα επιχειρηματική ιδέα (Narayanan & Thangavelu, 2015).

4.3 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΣ

Σήμερα στην εγχώρια και στη διεθνή αγορά υπάρχουν προϊόντα προσωπικής φροντίδας τα οποία βασίζονται σε κάποιο φυτό, έχουν δηλαδή ως βασικό συστατικό το εκχύλισμα που προέρχεται από τα φύλλα ή άλλα μέρη ενός φυτού. Στο παρόν προϊόν εμπεριέχονται εκχυλίσματα βιοδραστικών συστατικών από το φυτό *Salvia triloba*. Στη παρούσα φάση είναι λίγα φυτικά προϊόντα που κινούνται ανταγωνιστικά, τα οποία ωστόσο δεν έχουν μεγάλο

μερίδιο στην αγορά.

Πίνακας 4.3 Προϊόντα στοματικής φροντίδας (οδοντόκρεμες) που περιέχουν το φυτικό εκχύλισμα από φύλλα *Salvia triloba*.

Brand	Προϊόν	Χρήση
ebio	Φασκόμηλο και μέντα	Προστατεύει τα ούλα και τα δόντια ενώ χαρίζει παράλληλα δροσερή αναπνοή
eco	Μαύρο κύμινο	Βοηθά στην καταπολέμηση της περιοδόντωσης και των προβλημάτων των ούλων καθώς και στο σχηματισμό πέτρας.
Golgate	Herbal	Προστατεύει από την τερηδόνα και περιποιείται τα δόντια και τα ούλα
neobio	Φασκόμηλο & Μέντα	Προστασία των ούλων και δροσερή αναπνοή

Σύμφωνα με τον Πίνακα 4.3 είναι ελάχιστα τα προϊόντα τα οποία έχουν σαν συστατικό το φασκόμηλο, παρ' όλο που συνίσταται για τη στοματική υγιεινή και ημερήσια φροντίδα της στοματικής κοιλότητας. Τα παραπάνω, έχοντας το ίδιο φυτικό υπόστρωμα και υψηλά ποσοστά σε φλαβονοειδή αποτελούν μια απειλή για το παρόν προϊόν. Στον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι το φασκόμηλο χρησιμοποιείται συνδιαστικά και με άλλα φυτικά συστατικά.

Το προτεινόμενο προϊόν (οδοντόκρεμα) θα μπορούσε να αποτελείται μόνο από το φυτικό εκχύλισμα του βοτάνου *Salvia triloba*. Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, τα επίπεδα των φλαβονοειδών είναι αρκετά υψηλά, πράγμα το οποίο σημαίνει πως προσδίνουν μια αυτονομία στο

προϊόν, αξιοποιώντας μια από τις βασικότερες ιδιότητες των εκχυλισμάτων από τα φύλλα *Salvia triloba*. Τα υψηλά επίπεδα σε αντιοξειδωτικά βοηθούν στην αποφυγή σχηματισμού πέτρας στα δόντια προφέροντας λευκαντική δράση.

Τονίζοντας ακόμα μια βασική του ιδιότητα, την αντιμικροβιακή και στυπτική δράση προστατεύοντας τα ούλα και τα δόντια από βακτηρίδια που προκαλούν τερηδόνα. Ουσιαστικά θα αποτελεί ένα προϊόν στοματικής φροντίδας που από ένα βότανο (*Salvia triloba*) και μόνο θα προσφέρει ότι προσφέρουν τα υπόλοιπα προϊόντα στοματικής φροντίδας συνδιαστικά.

Πίνακας 4.3.1 Προϊόντα στοματικής φροντίδας (οδοντόκρεμες) που περιέχουν φυτικά εκχύλισματα

Brand	Προϊόν	Χρήση
Golgate	Golgate Herbal	Προστατεύει από την τερηδόνα και περιποιείται τα δόντια και τα ούλα
RIZES	Οδοντόκρεμα whitening	Λεύκανση και αίσθηση φυσικής φρεσκαδας στο στόμα
WELEDA	Planet Gel toothpaste	Πρόσληψη στην εμφάνιση τερηδόνας
AIM	White	Βοηθά στην επαναφορά του φυσικού λευκού των δοντιών. Προστατεύει από την τερηδόνα ενώ παράλληλα δυναμώνει το σμάλτο των δοντιών
KORRES	Δυόσμος & Lime	Ολικής προστασία

KORRES	Γλυκάνισος & Ευκάλυπτος	Λευκαντική
neobio	Δενδρολίβανο και χαμομήλι	
Yalia	Μέντα	Προστασία από τερηδόνα
Urtekram	Teatree	Ολική προστασία
A.Vogel	Echinacea	Προστατεύει από ουλίτιδες, ατροφία και ευαισθησία ούλων. Αιμορραγία
Kaloe	Αλόη βέρα & μαστίχα Χίου	Δρά κατά των λεκέδων, της πέτρας των δοντίων και τις κακοσμίας του στόματος
Cattier	DENTARGILE Άργυρο & δενδρολίβανο	Λεύκανση

Με βάση τον πιο πάνω πίνακα, είναι φανερό ότι τόσο στη διεθνή όσο και στην εγχώρια αγορά, υπάρχουν και άλλα προϊόντα στοματικής φροντίδας που περιέχουν φυτικά εκχυλίσματα συνδυαστικά με άλλα βότανα εντείνοντας τον ανταγωνισμό.

Ο βασικός όμως ανταγωνισμός αναφέρεται σε μεγάλες εταιρείες όπως η J&J οι οποίες πωλούν στην αγορά προϊόντα τα οποία έχουν ισχυρό brand, καλή τιμή και είναι πιστοποιημένα από τον ΕΟΦ αλλά και από διεθνείς οργανισμούς υγείας. Συγχρόνως ακολουθούν συγκεκριμένα πρότυπα ποιότητας. Κατά συνέπεια, το προτεινόμενο προϊόν έχει ανταγωνιστικό περιβάλλον να προσεγγίσει καθώς και να αντιμετωπίσει, γνωστές παγιωμένες μάρκες.

Το προϊόν για να προσεγγίσει την αγορά θα πρέπει να τονίσει μέσα από αποτελεσματικές προωθητικές κινήσεις τη φυτική του σύσταση, τη πολλαπλή του δράση ώστε να κατανοήσουν οι καταναλωτές τη σημασία χρήσης αυτής της

οδοντόκρεμας.

4.4 ΑΝΑΛΥΣΗ SWOT

Στη παρούσα μελέτη σκοπιμότητας, παρουσιάζονται τα δυνατά, τα αδύνατα σημεία και οι ευκαιρίες και απειλές της ένταξης του παρόντος προϊόντος της οδοντόκρεμας στην αγοράς. Στο Πίνακα 4.4 , παρουσιάζονται οι δυνάμεις και αδυναμίες, απειλές και ευκαιρίες του εξεταζόμενου προϊόντος

Πίνακας 4.5 Ανάλυση SWOT

	Δυνατά σημεία	Αδύνατα σημεία
Εσωτερικοί παράγοντες	<ul style="list-style-type: none">• Η συγκεκριμένη οδοντόκρεμα θα έχει αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή ενυσχίοντας τη στοματική υγιεινή• Η αντιοξειδωτική της ικανότητα προσφέρει ένα έξτρα αισθητικό αποτέλεσμα που αφορά τη λεύκανση των δοντιών.• Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως κύριο συστατικό ή και σε συνεργασία με άλλα φυτικά εκχυλίσματα.• Η εταιρεία έχει τη γνώση για να προωθήσει το προϊόν και τα κατάλληλα κανάλια προώθησης, πράγμα που της δίνει ισχύ στην αγορά σε σχέση με το παρόν προϊόν.• Προώθηση νέας σειράς που θα αφορά τη στοματική φροντίδα. π.χ οδοντικό διάλυμα και οδοντικό νήμα.• Η παραγωγή των εκχυλισμάτων και νέων προϊόντων μπορεί να γίνει στις εγκαταστάσεις (εργαστήρια, ανθρώπινο δυναμικό, παραγωγή κλπ.) της υφιστάμενης εταιρείας APIVITA	<ul style="list-style-type: none">• Η κρίση έχει καταστήσει τους καταναλωτές αρνητικούς σε προϊόντα με υψηλή τιμή όπως το παρόν προϊόν. Η εταιρεία θα βασιστεί στην ποιότητα για να καλύψει αυτή την αδυναμία.• Κορεσμός της αγοράς.Υπάρχει μεγάλος αριθμός τοπικών και εθνικών οργανισμών που ανταγωνίζονται στον τομέα της προσωπικής και στοματικής φροντίδας, με αποτέλεσμα να υπάρχουν στενά περοθώρια ανάπτυξης.• Υψηλό κόστος. Λόγω του υψηλού κόστους των εργασιών και των πρώτων υλών,τα προϊόντα της Arivita έχουν υψηλότερο κόστος από τα άλλα ανταγωνιστικά προϊόντα.
	Ευκαιρίες	Απειλές

Εξωτερικοί παράγοντες	<ul style="list-style-type: none"> • Η αγορά των φυτικών καλλυντικών εμφανίζει μεγάλη ανάπτυξη παγκοσμίως, πράγμα που σημαίνει ότι υπάρχει μεγάλο περιθώριο για την εταιρεία σε επίπεδο αγοράς και πωλήσεων • Η νέα τάση η οποία προαναφέρθηκε προς έναν υγιεινό τρόπο ζωής, σίγουρα δίνει περιθώριο ανάπτυξης για την εταιρεία, περιθώρια πωλήσεων και αύξησης μεριδίου αγοράς, • Υπάρχει περιορισμένος αριθμός προϊόντων στοματικής φροντίδας με βιοδραστικά συστατικά στη αγορά. Αυτό σημαίνει ότι η εταιρεία καινοτομεί και δεδομένης της υψηλής τιμής, θα εστιάσει στη διαφορετικότητα. Η διαφορετικότητα θα αποτελέσει το πλεονέκτημα της εταιρείας. • Η εταιρεία άρα και τα προϊόντα της έχουν ισχυρό brand στην αγορά. • Η σειρά μπορεί να επεκταθεί και σε άλλα προϊόντα προσωπικής φροντίδας. • Τα εκχυλίσματα μπορούν να ενσωματωθούν και σε άλλες σειρές προϊόντων της εταιρείας. 	<ul style="list-style-type: none"> • Η σύσταση της οδοντόκρεμα μπορεί εύκολα να αντιγραφεί από τον ανταγωνισμό • Στην αγορά υπάρχουν ήδη κάποια αντίστοιχα φυτικά προϊόντα τα οποία έχουν δυναμική σε σχέση με το παρόν στην αγορά. • Πολλοί καταναλωτές δεν έχουν σχετικές γνώσεις για τη δυναμική σε επίπεδο ποιότητας και σύστασης τέτοιου είδους προϊόντων. • Η πιθανή αύξηση της τιμής των πρώτων υλών θα οδηγήσει σε περαιτέρω αύξηση της τιμής της οδοντόκρεμας. Σε μια κορεσμένη αγορά, η δικαιολόγηση της υψηλής τιμής σε σύγκριση με τον ανταγωνισμό θα είναι δύσκολη Αυτό θα έχει σαν αποτέλεσμα, αύξηση της τιμής που θα οδηγήσει σε μείωση των πωλήσεων. • Στην καταναλωτική αγορά που αφορά την στοματική φροντίδα, υπάρχουν πολλές εταιρίες με διαφορετικές παροχές για τη στοματική υγιεινή. Για τους καταναλωτές είναι δύσκολο να παραμείνουν σε μια συγκεκριμένη εταιρία.
------------------------------	---	--

4.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΓΟΡΩΝ

4.5.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ-ΑΓΟΡΑ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Τα βότανα και τα εκχυλίσματά χρησιμοποιούνται από τις φαρμακοβιομηχανίες σε συμπληρώματα διατροφής, ενώ αναλόγως των ιδιοτήτων τους δύναται να χρησιμοποιηθούν επίσης σε καλλυντικά προϊόντα Σύμφωνα με την Global Industry Analysts, από το 2006 η διάθεση των συμπληρωμάτων που βασίζονται σε βότανα, παρουσιάζει συνεχιζόμενη ανάπτυξη σε παγκόσμιο επίπεδο.

Το μεγαλύτερο μερίδιο στην παγκόσμια αγορά όσον αφορά την χρήση των βοτάνων στον ιατρικό κλάδο κατέχει η Ευρώπη με 50,9%, ακολουθούμενη από την Κίνα με 34,6%, ενώ οι κλάδος της ομοιοπαθητικής και της Ayurveda με 8,2% και 6,3% αντίστοιχα, πλαισιώνουν την πύλα. Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο ότι η Ασιατική αγορά είναι η ταχύτερα αναπτυσσόμενη αυτή τη στιγμή με ετήσια αύξηση 9,1%. Σύμφωνα με εκτιμήσεις της Global Industry, το μερίδιο στην

αγορά αναμένεται να ξεπεράσει τα 115 δισεκατομμύρια δολάρια ως το 2020. Ο προσανατολισμός προς τον υγιεινό τρόπο ζωής, τα τελευταία χρόνια, έχει δημιουργήσει ένα εξαιρετικά πρόσφορο έδαφος για την περαιτέρω επέκταση της αγοράς σε παγκόσμιο επίπεδο.

Όσον αφορά τα καλλυντικά προϊόντα φυσικής προέλευσης, η συσχέτισή τους με τον φυσικό τρόπο ζωής, απαλλαγμένα από χημικές ουσίες, έχουν συμβάλει στην ταχεία ανάπτυξή τους τα τελευταία 20 χρόνια. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι το μερίδιο παραγωγής προϊόντων φυσικής προέλευσης βρισκόταν το 1999 σε επίπεδο της τάξης του 1%, ενώ σήμερα έχει αναρριχηθεί το 25% της παγκόσμιας αγοράς.

Μεγάλες ευρωπαϊκές χώρες κατέχουν την πρωτοκαθεδρία στην στροφή προς τα καλλυντικά φυσικής προέλευσης. Στη Γερμανία, το μερίδιο στην αγορά των καλλυντικών έχει ανέλθει στο εντυπωσιακό 40% ενώ στη Γαλλία, μία κατεξοχήν παραγωγό χώρα καλλυντικών προϊόντων, το αντίστοιχο ποσοστό είναι 29%. Στην Ελλάδα, τα έσοδα από την αγορά καλλυντικών ανέρχονται στα 85 εκατομμύρια ευρώ, εν μέσω βαθιάς οικονομικής κρίσης.

Την εντυπωσιακή άνοδο των καλλυντικών φυσικής προέλευσης αποτυπώνουν οι ισολογισμοί των επιχειρήσεων παραγωγής τους. Στον ελληνικό χώρο, η Arivita παρουσιάζει εντυπωσιακούς ισολογισμούς και υψηλά κέρδη σε μία εποχή που χαρακτηρίζεται από οικονομική στενότητα, δυσκολία συναλλαγών και διακινήσεων κεφαλαίων, καθώς και ελάχιστων επενδυτικών κινήσεων.

Η επέκτασή της μάλιστα στις μεγάλες αγορές της Ευρώπης και της Αμερικής, εκμεταλλεόμενη την παγκόσμια επαναφορά στον φυσικό τρόπο ζωής και κατά συνέπεια την αυξημένη ζήτηση φυσικών προϊόντων, έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά κερδοφόρες κινήσεις για την επιχείρηση αυτή. Η πλούσια ελληνική χλωρίδα συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη και προώθηση του εγχειρήματος όλα αυτά τα χρόνια.

4.5.2 ΑΓΟΡΑ-ΠΡΟΦΙΛ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΩΝ

Σε γενικές γραμμές και κατά γενική ομολογία, η αποτίμηση μιας

συνολικής εικόνας της αγοράς και του καταναλωτικού κοινού κρίνεται δύσκολη αν δεν τεθούν γεωγραφικά όρια. Τα πολιτισμικά στοιχεία και ο τρόπος ζωής του κάθε λαού, αποδίδει τελείως διαφορετικό τρόπο αντιμετώπισης ενός προϊόντος και κατ' επέκταση παίζει ρόλο στην επιτυχία ή αποτυχία του στη συγκεκριμένη αγορά. Η ανάγκη για εξέταση της κάθε περίπτωσης καταναλωτή είναι αδήριτη, καθώς οι ανάγκες, η ανταπόκριση και η αποδοχή του προϊόντος από κάθε άτομο ή ομάδα πληθυσμού, είναι διαφορετικές.

Πρέπει να ληφθούν υπόψη στοιχεία όπως τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και προτιμήσεις του καταναλωτή, τα οποία αν δεν αποτυπωθούν σωστά, η συνολική ανάπτυξη, προώθηση και διάθεση του προϊόντος θα είναι λανθασμένη. Αυτό θα έχει αποτέλεσμα την αποτυχία του εγχειρήματος. Για τις ανάγκες της μελέτης, το εξεταζόμενο προϊόν θα είναι μια φυτική οδοντόκρεμα, η οποία θα στοχεύει στην αγορά ανδρών – γυναικών

Λόγω της φύσης του προϊόντος και των ιδεών που αντιπροσωπεύει (επιστροφή στον φυσικό τρόπο ζωής, προώθηση της ευεξίας κτλ), η οδοντόκρεμα απευθύνεται σε ενηλικό καταναλωτικό κοινό. Είναι ευαισθητοποιημένοι πολίτες με κοινωνική αντίληψη, αναγνωρίζοντας το σπουδαίο ρόλο της φύσης. Η αρχική επιλογή και δημιουργία του target group περιλαμβάνει τη συγκεκριμένη ομάδα καταναλωτών, χωρίς αυτό να αποκλείει τη δυνατότητα επέκτασής του αργότερα. Οι καταναλωτές στους οποίους στοχεύει, επιθυμούν να συνδιάζουν τόσο το αισθητικό αποτέλεσμα μιας οδοντόκρεμας όσο και την φροντίδα της στοματικής υγιεινής, επιδιώκοντας άμεσα αποτελέσματα.

Οι καταναλωτές αυτοί στέφονται σε εναλλακτικές λύσεις, πέραν των συνηθισμένων κοινών προϊόντων στοματικής υγιεινής. Αναζητούν την ιδιαιτερότητα αλλά και την ξεχωριστή προστασία που παρέχει το προϊόν από φυτικά εκχυλίσματα. Το παραγόμενο προϊόν θα είναι κατάλληλο για όσους ακολουθούν χορτοφαγική διατροφή (vegan) και ομοιοπαθητική γιατί δεν περιέχει εκχυλίσματα μέντας.

Η δυναμική που προσλαμβάνει η τάση για χρησιμοποίηση ολοένα και περισσότερα φυσικά προϊόντα είναι πλέον μεγάλη. Στο συγκεκριμένο σημείο το προϊόν θα έχει το αναταγωνιστικό πλεονέκτημα διότι θα αποτελείται μόνο από

φυσικά και οικολογικά συστατικά.

Ο καθορισμός βοηθά όπως προαναφέρθηκε στην εξέταση και ανάλυση του προϊόντος ως προς την αποδοχή του σε κάθε ομάδα στόχο (target group). Πιο συγκεκριμένα, ως προϊόν φυτικό, και με γνώμονα την προώθηση των αντιοξειδωτικών και αντισηπτικών του δράσεων, το προϊόν δύναται να διατεθεί στην αγορά σε άνδρες και γυναίκες, καλύπτοντας μάλιστα μεγαλύτερο ηλικιακό εύρος καθώς θεωρείται φαρμακευτικό προϊόν ευρείας εφαρμογής.

4.5.3 ΚΑΝΑΛΙΑ ΔΙΑΝΟΜΗΣ-ΠΩΛΗΣΗΣ

Υπάρχουν πολλές εναλλακτικές λύσεις όσον αναφορά την επιλογή του κατάλληλου καναλιού πωλήσεων για το νέο προϊόν. Μερικές από αυτές τις επιλογές είναι οι αγορές χονδρικής πώλησης, τα σούπερ μάρκετ, τα φαρμακεία, οι απευθείας πωλήσεις και τα διαδικτυακά κανάλια πωλήσεων. Όσον αφορά το συγκεκριμένο προϊόν στοματικής φροντίδας (οδοντόκρεμα), ένας πελάτης θα μπορεί να το αγοράσει κυρίως από το ίδιο το κατάστημα της εταιρείας, online ή από ηλεκτρονικά καταστήματα φαρμακείων. Επίσης, θα μπορεί να το προμηθεύεται από επιλεγμένα φαρμακεία και καστήματα στα οποία η εταιρία θα διαθέτει το δικό της κατάστημα (shop in shop).

Οι μεγάλες εταιρείες καλλυντικών χρησιμοποιούν αυτά τα κανάλια πωλήσεων για να προσεγγίσουν τους πελάτες τους με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Το γεγονός ότι το προϊόν δεν θα βρίσκεται διαθέσιμο σε σημεία πώλησης ευρείας κατανάλωσης, δίνει μια ιδιάζουσα νότα για την ποιότητα του προϊόντος. Όσο καλύτερα δομημένο, προσβάσιμο και γνωστό είναι το δίκτυο διανομής ενός προϊόντος, τόσο καλύτερη «θέση εκκίνησης» μπορεί να λάβει αυτό, αποκτώντας πλεονέκτημα έναντι παρεμφερών προϊόντων εξ αρχής. Στην περίπτωση της οδοντόκρεμας, η διανομή θα πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο από τα καταστήματα της εταιρείας και τα φαρμακεία. Ο λόγος επιλογής των συγκεκριμένων καναλιών οφείλεται στις ιδιότητες του προϊόντος και την ανάγκη για ενημέρωση των καταναλωτών από φαρμακοποιούς που έχουν την επιστημονική γνώση να τους συμβολεύσουν και να τους προσφέρουν λύσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα φύλλα του φυτού *Salvia triloba* είναι γνωστά από την αρχαιότητα για τις θεραπευτικές και ευεργετικές τους ιδιότητες. Αξιοποιώντας τις περιεχόμενες στα φύλλα ουσίες και τις αποδεδιγμένες δράσεις δίνεται η προοπτική παρασκευής νέων φυσικών καλλυντικών ή φαρμακευτικών προϊόντων.

Τα εκχυλίσματα από φύλλα *Salvia triloba* με τα βέλτιστα αποτελέσματα είναι τα H₂O – MeOH 1:4 και H₂O – MeOH 1:1 που προήλθαν από τη μέθοδο εκχύλισης με υπερήχους (UAE) καθώς και το υδατικό που προήλθε από τη μέθοδο εκχύλισης υποβοηθούμενη υπό πίεση (PLE). Τα εκχυλίσματα αυτά εμφανίζουν υψηλά ποσοστά σε φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή και έχουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

Το αναταγωνιστικό πλεονέκτημα του καινοτόμου προϊόντος που στη παρούσα μελέτη είναι η οδοντόκρεμα, αποδίδεται στην αξιοποίηση του εκχυλίσματος από φύλλα *Salvia triloba* παράγοντας ένα φυσικό προϊόν με ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή ικανότητα. Η πολλαπλή δράση του στοχεύει τόσο στην υγιεινή της στοματικής κοιλότητας όσο και στην ενίσχυση της λεύκανσης των δοντίων προσφέροντας παράλληλα δροσερή αναπνοή.

Το προϊόν έχει όλες τις δυνατότητες να αναπτυχθεί και να επιτύχει τους στόχους του στις ευρύτερες αγορές της Ελλάδας και του εξωτερικού. Η παρούσα επιχειρηματική δράση έχει όλα τα εχέγγυα να είναι κερδοφόρα. Κάθε δράση που βασίζεται στη καινοτομία και στην ευρύτερη παραγωγή πρωτότυπων προϊόντων έχει πιθανότητες να στεφθεί με επιτυχία.

Η οδοντόκρεμα αποτελεί ένα προϊόν καθημερινής χρήσης, το οποίο καλύπτει βασικές ανάγκες υγιεινής στο μέσο άνθρωπο. Το παρόν προϊόν δεδομένης της φυσικής του σύστασης, θα καταστεί ακόμα πιο αποδεκτό από την αγορά, δεδομένου ότι θα αποτελέσει μια καινοτόμα, διαφοροποιημένη και φυσική πρόταση, σε σχέση με τον ανταγωνισμό. Η εταιρεία θα βρεθεί μπροστά από τον ανταγωνισμό, δεδομένου ότι θα κάνει μια εναλλακτική πρόταση σε επίπεδο ποιότητας, σύστασης ενώ και σε επίπεδο διανομής το προϊόν θα μπορεί να διατεθεί από πολλά και διαφορετικά σημεία πώλησης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Albano, S.M& Miguel, M.G.(2011) Biological Activities of extracts of plants growth in Portugal, *Industrial Crops and Products*, 33, pp. 338-343
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), pp.426-436.
- Bilia, S.R.(2011) Medicinal plants: from the tradition to nanomedicine. *Medicrops 11-Medicinal Crops*, International Conference, Nov.9-12,2011, Athens, Greece
- Brieskorn, C. H., & Kapadia, Z. (1979). Constituents of *Salvia officinalis*. *Planta medica*, 35(04), pp.376-378.
- Brooks, G., Heffner, A., & Henderson, D. (2014). A SWOT analysis of competitive knowledge from social media for a small start-up business. *The Review of Business Information Systems (Online)*, 18(1), p.23.
- Bull, J. W., Jobstvogt, N., Bøhnke-Henrichs, A., Mascarenhas, A., Sitas, N., Baulcomb, C., & Carter-Silk, E. (2016). Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats: A Swot Analysis of the Ecosystem Services Framework. *Ecosystem Services, Environmental Policy, Surveys*, 17, pp.129–140.
- 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.
- de Freitas, C. (2017). Public and patient participation in health policy, care and research. *Porto Biomedical Journal*, 2(2), pp.31-32.
- del Pilar Sanchez-Camargo, A., Ibañez, E., Cifuentes, A., & Herrero, M. (2017). Bioactive Obtained from Plants, Seaweeds, Micro algae and Food By-Products Using Pressurized Liquid Extraction and Supercritical Fluid Extraction. *Comprehensive Analytical Chemistry*.
- Delamare AP, Moschen-Pistorello IT, Artico L, Atti-Serafini L, Echeverrigaray S.

- Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem* 2007;100:603-8.
- Economou, G., Travlos, I., Kotoulas, V., Panagopoulos, G. (2011) the new uses of medicinal plant by their bioactive agents. *Medicrops 11-Medicinal Crops, International Conference, Nov.9-12, 2011, Athens, Greece*
- El-Sayed N.,Khalifa T., Ibrahim M., Mabry T. (2001), Constituents from *Salvia Triloba*, *Fitoterapia*, 72, (7), pp.850 – 853
- EL-Sayed N.H., Khalifa T.I., Constituets from *salvia triloba*, *Fitoterapia* 72 (2001) 850-853
- Farhat, M., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J., Landoulsi, A. and Jordán, M. (2014). Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. *Industrial Crops and Products*, 54, pp.78-85.
- Fernandez-Cruz, T., Martvnez-Carballo, E., & Simal-Gandara, J. (2017). Optimization of pressurized liquid extraction of organic pollutants in placenta to evaluate prenatal exposure. *Journal of Chromatography A*.
- Gali-Muhtasib, H., Roessner, A. and Schneider-Stock, R. (2006). Thymoquinone: A promising anti-cancer drug from natural sources. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(8), pp.1249-1253.
- Hedge IC *Salvia* L. In *Flora Europaea*,1972, Cambridge University Press, Vol.3, p.126, 188-192
- Helms, J. (1994). How multiculturalism obscures racial factors in the therapy process: Comment on Ridley et al. (1994), Sadowsky et al. (1994), Ottavi et al. (1994), and Thompson et al. (1994). *Journal of Counseling Psychology*, 41(2), pp.162-165.
- Hollensen, S. (2015). *Marketing management: A relationship approach*. Pearson Education.
- Kamatou, G., Makunga, N., Ramogola, W. and Viljoen, A. (2008). South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), pp.664-672.
- Kanetis, L., Exarchou, V., Charalambous, Z., & Goulas, V. (2017). Edible

coating composed of chitosan and *Salvia fruticosa* Mill. extract for the control of grey mould of table grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(2), pp.452-460.

Lu Y., Foo Y. Polyphenolics of *Salvia* – a review, *Phytochemistry*, 59, pp.117 – 140

Miclaus, A. (2015). "Freeze-drying kinetics for different types of food products". *Studia UBB Chemia*. 1, pp.147–156

Pico, Y. (2017). Pressurized Liquid Extraction of Organic Contaminants in Environmental and Food Samples. *Comprehensive Analytical Chemistry*.

Reddy, V. S., Gouroju, S., Suchitra, M. M., Suresh, V., Sachan, A., Rao, P. S., & Bitla, A. R. (2013). Antioxidant defense in overt and subclinical hypothyroidism. *Hormone and Metabolic Research*, 45(10), pp.754-758.

Sarrou, E., Martens, S., & Chatzopoulou, P. (2016). Metabolite profiling and antioxidative activity of Sage (*Salvia fruticosa* Mill.) under the influence of genotype and harvesting period. *Industrial Crops and Products*, 94, pp.240-250.

Sies, H. (2007). Total antioxidant capacity: appraisal of a concept. *The Journal of nutrition*, 137(6), pp.1493-1495.

Sigmon, B. S. (2014). Using a SWOT Analysis: Taking a Look at Your Organization.

Skoula M., Abbes J., and Johnson C. (2000) Genetic variation of volatiles and rosmarinic acid in populations of *Salvia fruticosa* mill growing in Crete. *Biochemical Systematic and Ecology* 28, pp.551-561

Tsivelikas, A.L., Chatzopoulos, P.S. (2011) Novel approaches on breeding Aromatic and Medicinal Plants. 11-Medicinal Crops, International Conference, Nov.9-12, 2011, Athens, Greece

Ulubelen A., Ozturk S., Isildatici S. (1968), A new flavones from *Salvia triloba* L. f (Labiatae), *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57(6), pp.1037 – 1038

Ulubelen, A., Öztürk, S., & Isildatici, S. (1968). A new flavone from *Salvia triloba* Lf (Labiatae). *Journal of pharmaceutical sciences*, 57(6), pp.1037-1038.

- Wang, Q., & Li, R. (2016). Impact of cheaper oil on economic system and climate change: A SWOT analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, pp.925-931.
- Wijngaard, H., Hossain, M. B., Rai, D. K., & Brunton, N. (2012). Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Research International*, 46(2), pp.505-513.
- Wright, T. W. (1989). Definitions in Biomaterials. *Journal of Biomechanics*, 22(1), 79.
- Xia, E. et al., 2013. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1, pp.47–58.
- Zupancic (2001) Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 75, pp.125-132

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

<https://el.wikipedia.org/wiki/Φασκόμηλο>