



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΦΥΤΑ ΤΗΣ
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ ΜΕ ΔΡΑΣΗ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ
ΑΠΛΟΥ ΕΡΠΗΤΑ 1, HSV-1, ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑΣ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΙΑΤΡΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ»**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Β', ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ
ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ**

ΑΡΙΣΤΕΙΑ ΣΙΛΙΑΧΛΗ

A.M. 00049

ΑΘΗΝΑ, 2019



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION

INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES

IN

BIOENTREPRENEURSHIP



MASTER THESIS

“DEVELOPMENT OF EXTRACTIONS FROM GREEK PLANTS WITH ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS 1, HSV-1, AND FEASIBILITY STUDY FOR THE DEVELOPMENT OF A NEW MEDICAL DEVICE ”

SUPERVISOR: RESEARCHER B', ZOUMPOULAKIS PANAGIOTIS

ARISTEIA SILIACHLI

A.M. 00049

ATHENS, 2019

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

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

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

Εγκρίθηκε την από την τριμελή
εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΒΑΘΜΙΔΑ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

Ζουμπουλάκης
Παναγιώτης

Ερευνητής Β'

Ζωγράφος Σπυρίδων

Ερευνητής Β'

Ζερβού Μαρία

Ερευνήτρια Β'

Ευχαριστίες

Ως την ελάχιστη δυνατή μνεία, με την παρούσα παράγραφο οφείλω να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της και ιδιαίτερα:

- ❖ Όσους ενεπλάκησαν ενεργά, από την APIVITA και το «Βιοεπιχειρείν», για την πρωτοβουλία του διαγωνισμού «Life Innovation» καθώς μέσω αυτού μου δόθηκε η ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα θέμα ιδιαίτερου ενδιαφέροντος και να συνεργαστώ με εξαιρετικούς ανθρώπους και επιστήμονες. Ευχαριστώ επίσης θερμά την APIVITA S.A. για την φιλοξενία στα εργαστήριά της προκειμένου να πραγματοποιηθούν τα πειράματα της παρούσας εργασίας.
- ❖ Τον επιβλέποντά μου κ. Ζουμπουλάκη Παναγιώτη, ερευνητή Β' του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, για την εμπιστοσύνη και την εκτίμηση που μου έδειξε και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της Διπλωματικής Εργασίας. Τον Διευθυντή του τμήματος Έρευνας και Ανάπτυξης Δρ. Κ. Γαρδίκη για τις γνώσεις και την καθοδήγησή του καθώς και τον Head of Global HR & Sustainability Α. Τσουκαλά για το συνεχές ενδιαφέρον του. Δεν θα ήθελα να παραλείψω τις ευχαριστίες μου στα άλλα δύο μέλη της επιτροπής της διπλωματικής εργασίας, τον κ. Σ. Ζωγράφο, Ερευνητή Β', και την κ. Μ. Ζερβού, Ερευνήτρια Γ', του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.
- ❖ Την Phytolab Scientist Βασιλική-Ιωάννα Μπόκα, για την καθημερινή καθοδήγηση και βοήθεια, την υπομονή, τις γνώσεις της και τις παραγωγικές υποδείξεις για το περιεχόμενο της παρούσας εργασίας καθώς συνέβαλλε τα μέγιστα για την ολοκλήρωσή της. Την Extracts Development Scientist Ελένη Σπανίδη για την στήριξη, την καθοδήγηση και την ανεκτίμητη βοήθειά της στην μελέτη σκοπιμότητας, την εύρεση οικονομικών στοιχείων, την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων μα πάνω από όλα για το ειλικρινές ενδιαφέρον και τη θετική της ενέργεια.
- ❖ Την BIO Lab Manager Δρ. Σοφία Λέτσιου και την Ναυσικά Καραμασιώτη για την βοήθεια τους στις μελέτες κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων και του προϊόντος.
- ❖ Τον Financial Analyst Νίκο Ουρανό και τον Production Controller Θοδωρή Καραμέρο για την βοήθεια και τις πληροφορίες που παρείχαν ώστε να ολοκληρωθεί η μελέτη σκοπιμότητας.
- ❖ Την Δρ. Βιολογίας, Συστηματικό Βοτανικό-Φυτοκοινωνιολόγο Ε. Βαλλιανάτου για την αναγνώριση και συλλογή του φυτού *Prunella vulgaris*.
- ❖ Όλα τα μέλη των εργαστηρίων της APIVITA και πιο συγκεκριμένα την Δρ. Ε. Κούρτογλου, την Κ. Παπαδάκη, την Δ. Παπαδάκη, την Α. Καταλειφού, την Μ.Τσαμπούκα, την Ε. Σαλμά, την Γ. Ντέντε, τον Δ. Μήλια και τον Γ. Ζορζοβίλη για την βοήθεια που μου προσέφεραν καθημερινά, το ευχάριστο περιβάλλον αλλά κυρίως για την αίσθηση ότι ανήκω στη εργαστηριακή αυτή οικογένεια από την πρώτη στιγμή, δουλεύοντας και συζητώντας μαζί τους τον χειμώνα και την άνοιξη του 2018-2019.
- ❖ Τους γονείς και την αδερφή μου για την συμπαράσταση και την υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια.
- ❖ Τον Γιάννη για την υπομονή, την αγάπη του αλλά και την δύναμη που μου δίνει να συνεχίζω να εκπληρώνω τους στόχους μου.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ΣΚΟΠΟΣ.....	2
1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	3
1.1 Χείλη.....	3
1.2 Ιός του επιχείλιου έρπητα (HSV-1).....	4
1.2.1 Τρόποι μετάδοσης του HSV-1	4
1.2.2 Κύκλος ζωής του HSV-1	5
1.2.3 Λυτική λοίμωξη.....	5
1.3 Από την παράδοση στη σύγχρονη θεραπευτική.....	6
1.3.1 Η <i>Melissa officinalis</i> L. και ο μηχανισμός αντι-HSV-1 δράσης των βιοδραστικών ουσιών της	7
1.3.2 Η <i>Prunella vulgaris</i> L. και ο μηχανισμός αντι-HSV-1 δράσης των βιοδραστικών ουσιών της	9
1.3.3 Το <i>Thymus vulgaris</i> L. και ο μηχανισμός αντι-HSV-1 δράσης των βιοδραστικών ουσιών του.....	12
1.3.4 Η <i>Mentha x piperita</i> L. και ο μηχανισμός αντι-HSV-1 δράσης των βιοδραστικών ουσιών της	12
1.3.5 Η Πρόπολη και ο μηχανισμός αντι-HSV-1 δράσης των βιοδραστικών ουσιών της	13
1.3.6 Χιτοζάνη	15
1.4 Φαρμακομορφή προϊόντος	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
2.1 Φυτοχημική Μελέτη.....	19
2.1.1 Συλλογή και ξήρανση των φυτών	19
2.1.2 Προετοιμασία φυτικού υλικού για εκχύλιση	19
2.1.3 Εκχύλιση με Διαβροχή (Maceration).....	19
2.1.4 Εκχύλιση με Υπερήχους.....	20
2.1.5 Έλεγχος σταθερότητας υδατο-γλυκερινικών εκχυλισμάτων	20
2.1.6 Φωτομετρικοί προσδιορισμοί υδατο-γλυκερινικών εκχυλισμάτων	21
2.1.7 Απομάκρυνση της γλυκερόλης με τη μέθοδο της Εκχύλισης Στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE).....	22
2.1.8 Ποιοτικός και ποσοτικός φυτοχημικός προσδιορισμός των φυτικών υποστρωμάτων με τη Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Λεπτής Στιβάδας (HPTLC).....	23
2.1.9 Προσδιορισμός συνολικού περιεχομένου υδατανθράκων του φυτού <i>Prunella vulgaris</i> με τη μέθοδο της Φαινόλης και του Θεικού οξέος (Phenol-sulfuric acid assay).....	25

2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΡΦΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΝΤΙΕΡΠΗΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ	25
2.2.1 Δοκιμές διάλυσης της χιτοζάνης σε ασκορβικό, οξικό και γαλακτικό οξύ ..	25
2.2.2 Δοκιμές μορφοποίησης του αντιερπητικού προϊόντος και έλεγχος σταθερότητας των προϊόντων μορφοποίησης	26
2.3 Στατιστική ανάλυση και άντληση οικονομικών δεδομένων.....	29
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	30
3.1 Φυτοχημική μελέτη.....	30
3.1.1 Εκτίμηση σταθερότητας των υδατο-γλυκερινικών εκχυλισμάτων της <i>Melissa officinalis</i> και της <i>Prunella vulgaris</i> που προήλθαν από εκχύλιση με διαβροχή	30
3.1.2 Εκτίμηση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των υδατο-γλυκερινικών εκχυλισμάτων της <i>Melissa officinalis</i> και της <i>Prunella vulgaris</i> που προήλθαν από εκχύλιση με διαβροχή	33
3.1.3 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών των υδατο-γλυκερινικών εκχυλισμάτων της <i>Melissa officinalis</i> και της <i>Prunella vulgaris</i> που προήλθαν από εκχύλιση με διαβροχή	35
3.1.4 Εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των υδατο-γλυκερινικών εκχυλισμάτων της <i>Melissa officinalis</i> και της <i>Prunella vulgaris</i> που προήλθαν από εκχύλιση με διαβροχή και με υπέρηχους.....	37
3.1.5 Εκτίμηση ποσοτικού προσδιορισμού του ροσμαρινικού οξέος, του καφεϊκού οξέος και του ρ-κουμαρικού οξέος για το εκχύλισμα της <i>Melissa officinalis</i> με τη χρήση της HPTLC.....	39
3.1.6 Εκτίμηση ποιοτικού προσδιορισμού συγκεκριμένων βιοδραστικών ουσιών του εκχυλίσματος της <i>Prunella vulgaris</i> με τη βοήθεια της HPTLC.....	47
3.1.7 Εκτίμηση ποσοτικού προσδιορισμού του συνολικού περιεχομένου των υδατανθράκων του εκχυλίσματος της <i>Prunella vulgaris</i> με τη μέθοδο Phenol-Sulfuric acid	48
3.2 Μελέτη μορφοποίησης του αντιερπητικού προϊόντος	50
3.2.1 Δοκιμές διάλυσης της χιτοζάνης σε ασκορβικό, οξικό και γαλακτικό οξύ	50
3.2.2 Έλεγχος σταθερότητας των προϊόντων μορφοποίησης	51
4. ΜΕΛΕΤΗ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΕΡΠΗΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ	58
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	61
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1	70
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.....	76
2.1 Εισαγωγή.....	76
2.2 Επισκόπηση Επιχείρησης - Εσωτερικό περιβάλλον.....	76
2.3 Παρουσίαση προϊόντος.....	77

2.3.1 Το πρόβλημα και η λύση	77
5.3.2 SWOT Ανάλυση αντιερπητικού προϊόντος.....	80
2.3.3 Ανταγωνισμός	81
2.4 Ανάλυση αγοράς.....	89
2.4.1 Προφίλ καταναλωτή.....	89
2.4.2 Ανάλυση αγοράς και κλάδου – Εξωτερικό περιβάλλον	91
2.5 Κανάλια διανομής	94
2.6 Οικονομικά στοιχεία	95
2.6.1 Πηγές χρηματοδότησης και κεφαλαιακές ανάγκες	95
2.6.2 Ανάλυση κόστους προϊόντος και περιθώριο κέρδους	95
2.6.3 Νεκρό σημείο.....	99
2.7 Νομικό πλαίσιο προϊόντος	100
2.7.1 Ορισμός ιατροτεχνολογικού προϊόντος.....	100
2.7.2 Κατάταξη του αντιερπητικού προϊόντος σε κλάση.....	101
2.7.3 Υποχρεώσεις κατασκευαστών	101
2.7.4 Δυο σημαντικά νέα χαρακτηριστικά	103
2.7.5 Διαδικτυακές πωλήσεις ιατροτεχνολογικών προϊόντων.....	103

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο επιχείλιος έρπητας ταλαιπωρεί μεγάλη μερίδα ανθρώπων. Το 67% του πληθυσμού σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) έχει μολυνθεί από τον HSV-1 ενώ το ένα τρίτο των μολυσμένων υποφέρει από επαναλαμβανόμενα επεισόδια. Τα συμπτώματά του είναι ενοχλητικά και το προκαλούμενο αισθητικό πρόβλημα συνοδεύεται από ψυχολογική δυσφορία, στιγματίζοντας το παθόν άτομο. Έπειτα από ενδελεχή ανασκόπηση στην αγορά, εντοπίστηκε η ανάγκη για επαρκή συνδυαστική και πολλαπλή αποτελεσματικότητα για την αντιμετώπιση του επιχείλιου έρπητα από ένα φυσικό προϊόν, εταιρείας με ισχυρή εμπιστοσύνη των καταναλωτών, του οποίου η παρουσία θα είναι γνωστή λόγω του brand και θα διατίθεται μέσω πολλών και εξειδικευμένων καναλιών διανομής. Κατά την πειραματική μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τη δημιουργία ενός νέου αντιερπητικού προϊόντος δοκιμάστηκαν φυσικά συστατικά της ελληνικής γης, εκχυλίσματα *Melissa officinalis* και *Prunella vulgaris*, πρόπολη και αιθέρια ελαία του φυτού *Thymus vulgaris* (θυμαριού) και *Mentha piperita* (μέντας) σε συνδυασμό με το πολυμερές χιτοζάνη. Οι πρώτες ύλες μελετήθηκαν όσον αφορά τα αντιερπητικά συστατικά τους. Έγινε ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο της Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης Λεπτής Στιβάδας (HPTLC) του ροσμαρινικού, καφεϊκού και p-κουμαρικού οξέος στην *Melissa officinalis*. καθώς επίσης και του ολικού περιεχομένου υδατανθράκων της *Prunella vulgaris* με τη μέθοδο της φαινόλης-θειικού οξέος με σκοπό την αρχική ανίχνευση του αντιερπητικού πολυσακχαρίτη. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανίχνευση συγκεκριμένων βιοδραστικών ουσιών για την *P. vulgaris* με τη χρήση της HPTLC. Μελετήθηκαν η σταθερότητα και η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων. Πραγματοποιήθηκε μελέτη εύρεσης του καταλληλότερου διαλύτη της χιτοζάνης για την δημιουργία του αντιερπητικού προϊόντος με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Έγιναν δοκιμές έξι συνταγών με μικρές διαφοροποιήσεις στις ποσότητες των συστατικών οι οποίες ελέγχθηκαν ως προς την σταθερότητά τους, τα χαρακτηριστικά τους, το ολικό φαινολικό περιεχόμενο και την αντιρριζική ικανότητά τους. Τέλος πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική μελέτη σκοπιμότητας του τελικού προϊόντος.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: HSV-1, φιλμ χιτοζάνης, *Melissa officinalis*, *Prunella vulgaris*, πρόπολη

ΣΚΟΠΟΣ

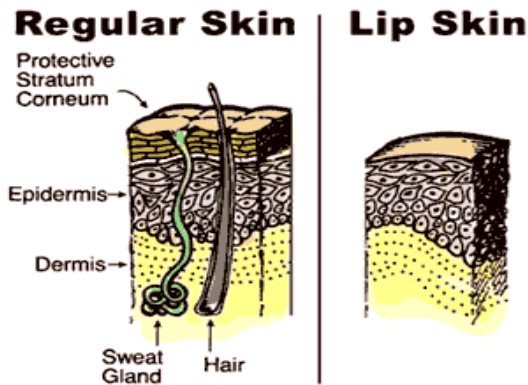
- I. Ανάπτυξη εκχυλίσματος από εναέρια τμήματα του φυτού *Melissa officinalis* και ποσοτικοποίηση των περιεχόμενων αντιερπητικών δραστικών ουσιών, ροσμαρινικού, καφεϊκού και p-κουμαρικού οξέος, με την τεχνική της HPTLC.
- II. Ανάπτυξη εκχυλίσματος από τα υπέργεια τμήματα και τις ρίζες του φυτού *Prunella vulgaris*, διερεύνηση ύπαρξης και προσεγγιστική ποσοτικοποίηση του αντιερπητικού πολυσακχαρίτη του φυτού, καθώς και προσπάθεια ποιοτικής ανίχνευσης άλλων βιοδραστικών ουσιών.
- III. Έλεγχος σταθερότητας των παραπάνω εκχυλισμάτων, μέτρηση ολικού φαινολικού περιεχομένου, αντιρριζικής ικανότητας και προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας αυτών.
- IV. Μελέτη για την αποτελεσματικότερη διάλυση της χιτοζάνης σε διάφορους διαλύτες και ανάπτυξη συνταγής που θα συνδυάζει τη χιτοζάνη ως φορέα των παραπάνω εκχυλισμάτων, της πρόπολης και των αιθέριων ελαίων θυμαριού και μέντας για την παραγωγή νέου προϊόντος με ικανότητα σχηματισμού φιλμ.
- V. Μελέτη σταθερότητας των νέων προϊόντων, μέτρηση ολικού φαινολικού περιεχομένου, αντιρριζικής ικανότητας, παρατήρηση των δομών των φιλμ και προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας της επιτυχημένης συνταγής.
- VI. Προκαταρκτική μελέτη σκοπιμότητας για την εισαγωγή του νέου προϊόντος στην αγορά ώστε να αποκαλυφθούν τα δυνατά και τα αδύνατα σημεία της πιθανής επένδυσης της εταιρείας σε αυτό.

1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Χείλη

Τα χείλη είναι τοποθετημένα σε προεξέχουσα θέση στο πρόσωπο (Patil *et al.*, 2016) και αποτελούν εύκαμπτες, κινητές, μυϊκές πτυχές που περιβάλλουν το άνοιγμα της στοματικής κοιλότητας και καλύπτονται εξωτερικά από δέρμα και εσωτερικά από βλεννογόνο (Foutsizoglou, 2017). Τα χείλη χρησιμοποιούνται στην πρόσληψη τροφής, τη μάσηση και την άρθρωση ενώ αποτελούν ένα σημαντικό τμήμα της αίσθησης της αφής λόγω των νευρικών απολήξεων και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκφραση του προσώπου. Η “vermillion zone” ή αλλιώς η περιοχή των χειλιών με το κοκκινωπό χρώμα, ομοίως με το υπόλοιπο δέρμα, αποτελείται από έξω προς τα μέσα από την προστατευτική κεράτινη στιβάδα, την επιδερμίδα και τη δερμίδα ή αλλιώς χόριο. Το δέρμα των χειλιών είναι στρωματοποιημένο πλακώδες επιθήλιο. Αυτό που διαφοροποιεί τα χείλη από το υπόλοιπο δέρμα είναι ότι η κεράτινη στιβάδα είναι πολύ λεπτότερη από οποιοδήποτε άλλο μέρος του σώματος. Η διαφοροποίηση αυτή διακρίνεται στην Εικόνα 1. Επιπλέον τα χείλη δεν έχουν αδένες ούτε και τρίχες. Λόγω έλλειψης αδένων η περιοχή δεν καλύπτεται από το στρώμα ιδρωτοποιών ή άλλων εκκρίσεων με αποτέλεσμα να μη προστατεύεται από τα παθογόνα και να μην επιτυγχάνεται ρύθμιση της θερμοκρασίας. Για αυτό το λόγο λοιπόν τα χείλη ξηραίνονται ευκολότερα και είναι πιο εύθραυστα. Η διατήρηση της υγρασίας τους επιτυγχάνεται από τις εκκρίσεις των σιελογόνων αδένων. Επιπλέον τα κύτταρα αυτής της περιοχής δεν διαθέτουν μελανίνη με αποτέλεσμα να είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στην ηλιακή ακτινοβολία ενώ το κοκκινωπό χρώμα τους οφείλεται στα τριχοειδή αιμοφόρα αγγεία που βρίσκονται κάτω από το λεπτό δέρμα που τα περιβάλλει. Η νεύρωση των χειλιών επιτυγχάνεται μέσω του τριδιδυμικού νεύρου (Foutsizoglou, 2017). Είναι ευάλωτα από πολλούς παράγοντες, όπως κατά την επαφή με διάφορα συστατικά αλλά και λόγω τραυμάτων, μόλυνσεων και ασθενειών οι οποίες μπορεί να αντιμετωπίζονται εύκολα χωρίς τη δημιουργία λειτουργικών προβλημάτων μπορεί όμως να είναι πολύπλοκες και ανησυχητικές. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τα χείλη είναι ο αέρας, ο ήλιος, το κάπνισμα και οι ακραίες θερμοκρασίες εξαιτίας του φτωχού προστατευτικού φραγμού που διαθέτουν και της χαμηλής συγκράτησης του νερού (Bansal *et al.*, 2017).

Η διάγνωση προβλήματος των χειλιών και η θεραπεία του είναι υψίστης σημασίας όχι μόνο για την πρόληψη της νοσηρότητας αλλά και την αποκατάσταση της κοινωνικής αποδοχής και του αισθήματος αμηχανίας (Patil *et al.*, 2016). Μελέτη μεγάλης κλίμακας έδειξε ότι οι κακώσεις που συμβαίνουν στα χείλη είναι οι πιο συχνά απαντώμενες μεταξύ των κακώσεων του στοματικού βλεννογόνου. Ανάμεσα στις πιο συχνές αιτίες κακώσεων ήταν ο επιχείλιος έρπητας με ποσοστό εμφάνισης 33,7% στον μελετώμενο πληθυσμό της έρευνας (495 περιστατικά) ενώ το ποσοστό των γυναικών είναι το υψηλότερο αγγίζοντας το 53,9% του συνόλου (Bansal *et al.*, 2017).



Εικόνα 1. Διαγραμματική σύγκριση των στιβάδων του δέρματος στο σώμα και τα χείλη (<https://www.blistex.com/lip-tips/what-are-lips/>).

1.2 Ιός του επιχείλιου έρπητα (HSV-1)

Οι ιοί του έρπητα αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια ιών και το όνομα «έρπητας» προέρχεται από την ελληνική λέξη «έρπω» (λατινικά serpo) που χρησιμοποιήθηκε από τον Ιπποκράτη για να περιγράψει τον ιό καθώς είναι σαν να «σέρνεται» στις διάφορες περιοχές του σώματος δημιουργώντας τα αντίστοιχα έλκη. Οι ερπητοϊοί είναι ομάδα ιών με μεγάλο μέγεθος και σημαντικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι το γενετικό υλικό τους αποτελείται από γραμμικό δίκλωνο DNA. Το ισωμάτιο του Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) έχει διάμετρο 300 nm περίπου και αποτελείται από μέσα προς τα έξω από τα εξής συστατικά: 1) το γενετικό υλικό, 2) το νουκλεοκαψίδιο, 3) το περικάλυμα και 4) το λιπιδικό φάκελο. Το μέγεθος του γενετικού υλικού του HSV-1 είναι 120-230 kb και βρίσκεται στο κέντρο του ιικού σωματιδίου όπου απαντάται ο πυρήνας. Ο πυρήνας περιβάλλεται από ένα εικοσαεδρικό νουκλεοκαψίδιο το οποίο με τη σειρά του περιβάλλεται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα στην οποία ενσωματώνεται πληθώρα γλυκοπρωτεϊνών και καλείται έλυτρο ή φάκελος. Τουλάχιστον οχτώ από τις έντεκα διαφορετικές ιικές γλυκοπρωτεΐνες gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL και gN ενσωματώνονται στο φάκελο και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην πρόσδεση και στη σύντηξη με τα κύτταρα-στόχους του ξενιστή αλλά και στην αποφυγή του ανοσιακού ελέγχου. Στο χώρο ανάμεσα στο φάκελο και το νουκλεοκαψίδιο υπάρχει μια άμορφη μάζα, όπου απαντώνται αρκετές ιικές πρωτεΐνες και ένζυμα απαραίτητα για την ιική επιβίωση και αναπαραγωγή, που καλείται περικάλυμα (Murray *et al.*, 2008).

1.2.1 Τρόποι μετάδοσης του HSV-1

Η μετάδοση του HSV-1 επιτυγχάνεται μέσω του συσσωρευμένου στα φυσαλιδώδη εξανθήματα υγρού καθώς επίσης και από τις κολπικές εκκρίσεις. Οι πιο συνηθισμένοι τρόποι μετάδοσης είναι η στοματική επαφή, η χρήση των μολυσμένων σκευών και αντικειμένων, από το σάλιο του παθόντος και τέλος κατά την επαφή του στόματος με το δέρμα άλλης περιοχής του σώματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, ο ιός να διαπερνά και να μολύνει εκείνο το σημείο μέσω λύσης της συνέχειας του δέρματος. Δημιουργούνται έτσι επιμολύνσεις των γύρω περιοχών. Το κύριο κλινικό σύνδρομο είναι η εμφάνιση ψυχρών ελκών (cold sores) στα χείλη (Murray *et al.*, 2008).

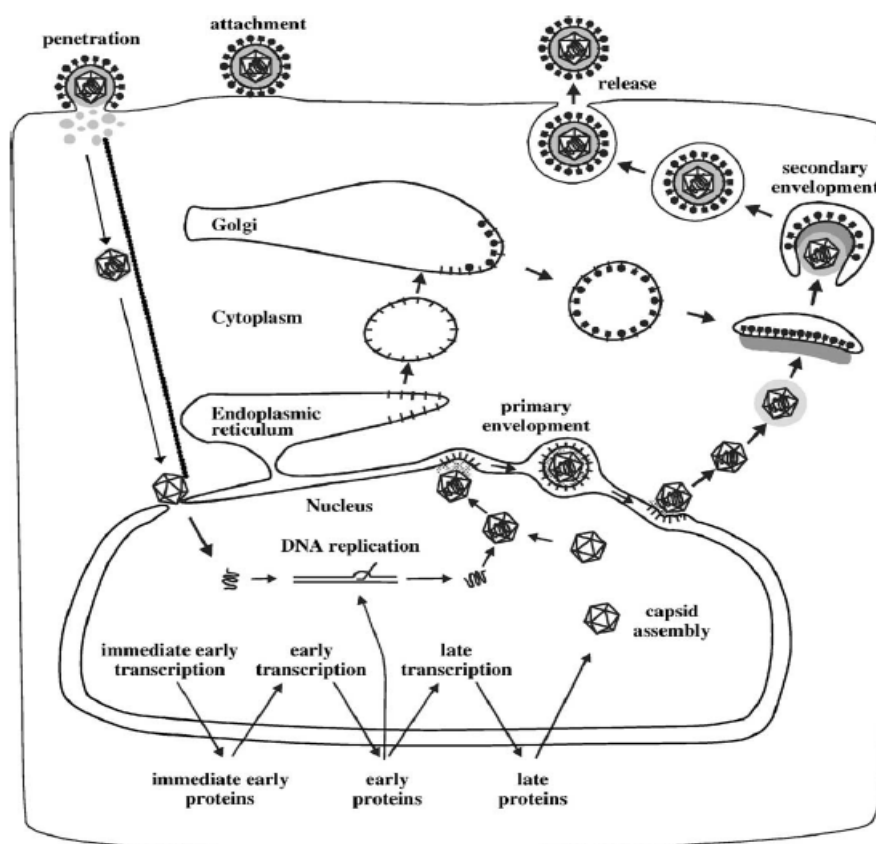
1.2.2 Κύκλος ζωής του HSV-1

Γενικότερα ο ιός προκαλεί λυτικές λοιμώξεις των ινοβλαστών και των επιθηλιακών κυττάρων καθώς επίσης και λανθάνουσες λοιμώξεις των νευρώνων. Κατά την πρωταρχική μόλυνση η οποία συνήθως συμβαίνει σε κάποιο βλεννοεπιθηλιακό κύτταρο του στόματος ή των χειλιών, ο HSV-1 αρχίζει και αναπαράγεται καταστρέφοντας τα επιθηλιακά κύτταρα και δημιουργώντας τα χαρακτηριστικά φυσαλιδώδη εξανθήματα. Αυτό έχει ως συνέπεια τη λύση της συνέχειας του δέρματος σε εκείνο το σημείο και κατά επέκταση την κυτταρόλυση. Στη συνέχεια ο ιός μολύνει τον αισθητικό νευρώνα της περιοχής της νεύρωσης και μετακινείται μέσω παλίνδρομης μεταφοράς συνήθως στο γάγγλιο του τριδύμου, όπου υπάρχει καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ατόμου σε λανθάνουσα κατάσταση αδράνειας, χωρίς την εκδήλωση συμπτωμάτων (Singh *et al.*, 2005). Ενεργοποιείται εκ νέου υπό την επίδραση συγκεκριμένων συνθηκών (ηλιακή ακτινοβολία, εκδορές στα χείλη, πυρετός, στρες, κόπωση, έμμηνος ρύση κ.ά.) και επιστρέφει στο αρχικό σημείο της λοίμωξης μέσω ορθόδρομης μεταφοράς όπου εγκαθιστά νέα λοίμωξη στα επιθηλιακά κύτταρα και κατά επέκταση νέα έλκη (Gaby *et al.*, 2006)(Murray *et al.*, 2008).

1.2.3 Λυτική λοίμωξη

Είναι χρήσιμη η αναφορά στα στάδια της λυτικής μόλυνσης του ιού για την κατανόηση της δράσης του. Αρχικώς να σημειωθεί πως υπάρχουν δύο τρόποι εισόδου του HSV-1 στο κύτταρο: 1) μέσω σύντηξης του ιικού φακέλου με την πλασματική μεμβράνη, η οποία είναι ανεξάρτητη του pH και 2) μέσω μιας εσωτερικής ενδοσωματικής μεμβράνης, όπου εξαρτάται από το pH. Ο τρόπος εισόδου εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου (Nicola *et al.*, 2003). Ο HSV-1 αρχικά αλληλοεπιδρά μέσω των γλυκοπρωτεϊνών gB και gC με την επιφάνεια του κυττάρου του ξενιστή και συνδέεται με αλυσίδες της θειικής ηπαράνης, μίας πρωτεογλυκάνης που εντοπίζεται στην επιφάνεια πολλών κυτταρικών τύπων του ξενιστή. Έπειτα μέσω πρόσθετων αλληλεπιδράσεων της ιικής γλυκοπρωτεΐνης gD με τους υποδοχείς HVEM, νεκτίνη 1 ή 2 και μερικές περιοχές της θειικής ηπαράνης ευνοείται η σύντηξη του ιού και τελικά διεισδύει μέσα στο κύτταρο (Spear, 2004). Κατά τη σύντηξη, ο λιπιδικός φάκελος του ιού συσσωματώνεται με την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται εντός του κυτταροπλάσματος το νουκλεοκαψίδιο και το περικάλυμμα του. Το νουκλεοκαψίδιο και κάποιες πρωτεΐνες του περικαλύμματος μετακινούνται προς τους πυρηνικούς πόρους όπου πλέον το DNA απελευθερώνεται από το υπόλοιπο καψίδιο και εισέρχεται εντός του πυρήνα μαζί με ορισμένες πρωτεΐνες του ιού. Εκεί συντελείται ο διπλασιασμός του DNA ενώ ταυτόχρονα γίνεται η σταδιακή έκφραση των γονιδίων του HSV-1 για την παραγωγή των απαραίτητων πρωτεϊνών που υποβοηθούν τον διπλασιασμό και αργότερα την κατασκευή του καψιδίου. Η έκφραση συντελείται σε τρεις διακριτές φάσεις: την άμεσα πρώιμη (IE, Immediate Early ή α), την πρώιμη (E, Early ή β) και την όψιμη (L, Late ή γ). Στη συνέχεια συναρμολογούνται τα διάφορα τμήματα ώστε να προκύψουν οι νέοι HSV-1 ιοί όπου και πάλι έπειτα από αρκετά στάδια θα σχηματιστεί το τελικό ώριμο νουκλεοκαψίδιο. Το νουκλεοκαψίδιο κατά την έξοδό του από τον πυρήνα διέρχεται από τις μεμβράνες του συμπλέγματος Golgi με σκοπό να αποκτήσει τις γλυκοπρωτεΐνες του εξωτερικού του φακέλου. Τελικό βήμα είναι η απελευθέρωση των σχηματισμένων ιοσωματίων με εξωκυττάρωση ή κυτταρόλυση (Mettenleiter, 2004). Να σημειωθεί πως από έναν HSV-1 ιό προκύπτουν 1.000 νέα μολυσματικά ιοσωμάτια ενώ ταυτόχρονα παράγονται και

μη μολυσματικά, τα λεγόμενα “L particles”, τα οποία δεν φέρουν στο εσωτερικό τους γενετικό υλικό ή νουκλεοκαψίδιο λόγω λανθασμένης παραγωγής (Homa & Brown, 1997)(Szilagyi & Cunningham, 1991)(Murray *et al.*, 2008).



Εικόνα 2. Διαγραμματική απεικόνιση της λυτικής λοίμωξης του HSV-1 (Mettenleiter, 2004).

1.3 Από την παράδοση στη σύγχρονη θεραπευτική

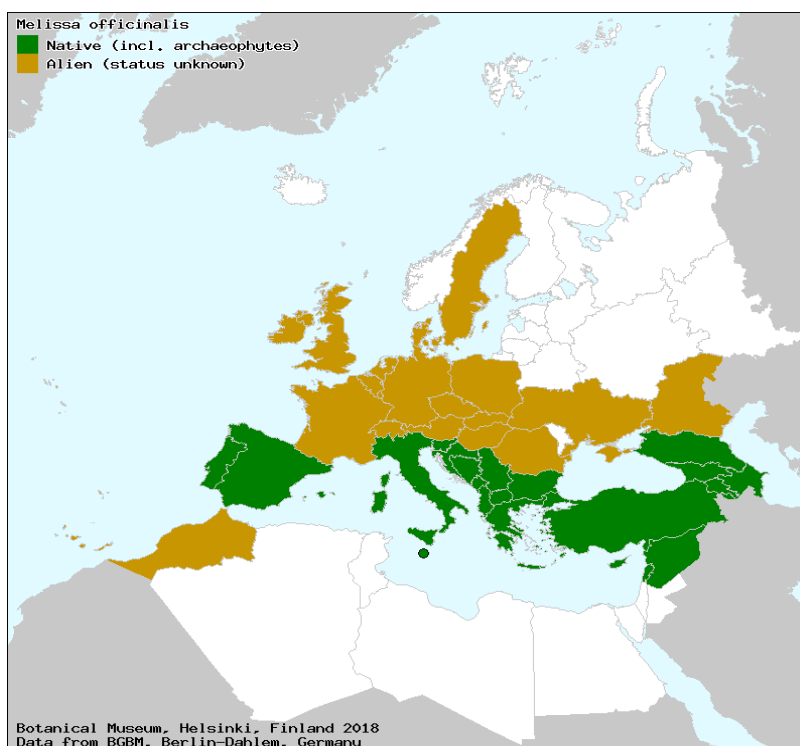
Από αρχαιότατων χρόνων τα φαρμακευτικά φυτά χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία πολλών μολυσματικών ασθενειών και μάλιστα στις περισσότερες περιπτώσεις δεν υπήρχε αξιόλογο επιστημονικό υπόβαθρο που να ενισχύει αυτή τους τη χρήση. Πλέον υπάρχει αυξημένη τάση στη χρήση τους καθώς η επιστημονική τεκμηρίωσή τους εντείνεται. Έχουν αναπτυχθεί ολόκληρες μέθοδοι ανίχνευσης των πιο πολλά υποσχόμενων φυτικών υποστρωμάτων για πολλές ασθένειες και συγκεκριμένα για τον HSV-1 (Khan *et al.*, 2005). Η ανάπτυξη μάλιστα της αντίστασης του συγκεκριμένου ιού σε ήδη χρησιμοποιούμενους αντιικούς παράγοντες ενίσχυσε την ανάγκη εύρεσης νέων αποτελεσματικών ενώσεων έναντι των ιικών μολύνσεων. Τα φαρμακευτικά φυτά παράγουν ποικίλες χημικές ενώσεις με δυναμικό αναστολής του ιικού πολλαπλασιασμού. Έτσι τα φυτά και άλλα φυσικά προϊόντα αποτελούν μια άφθονη πηγή νέων βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών (Astani *et al.*, 2012).

Έπειτα από έρευνα των φυσικών προϊόντων που θα μπορούσαν να δράσουν έναντι του ιού επιλέχθηκαν: τα φυτά *Melissa officinalis* και *Prunella vulgaris*, το βάμμα πρόπολης και τα αιθέρια έλαια των φυτών *Thymus vulgaris* και *Mentha piperita* τόσο για την αποτελεσματικότητα που τεκμηριωμένα παρουσιάζεται σε πληθώρα

βιβλιογραφίας όσο και για την αφθονία τους στην ελληνική γη και την επιδιωκόμενη προώθηση της εγχώριας επιχειρηματικότητας. Ο λόγος επιλογής του πολυμερούς της χιτοζάνης είναι διττός: αφενός υποστηρίζει τη σύνθεση του σκευάσματος για τη δημιουργία του επιδιωκόμενου φιλμ και αφετέρου βοηθά στην ταχύτερη επούλωση του, δημιουργούμενου από τον HSV-1, τραύματος. Παρακάτω αναλύεται η συμβολή των συστατικών του κάθε φυτού και του πολυμερούς στην αντιμετώπιση του επιχείλιου έρπητα.

1.3.1 Η *Melissa officinalis* L. και ο μηχανισμός αντι-HSV-1 δράσης των βιοδραστικών ουσιών της

Η *Melissa officinalis* L. (lemon balm) με κοινή ονομασία μελισσόχορτο ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και φύεται ευρέως στην περιοχή της κεντρικής και νότιας Ευρώπης. Έχει σύνθετη χημική σύσταση που αποτελείται κατά κύριο λόγο από φαινυλπροπανοειδή συμπεριλαμβανομένων των υδροξυκινναμικών οξέων (ροσμαρινικό οξύ μέχρι 6%, ρ-κουμαρικό και καφεϊκό οξύ, χλωρογενικό και φερούλικό οξύ), флаβονοειδή, όπως οι γλυκοσίδες της λουτεολίνης, της κερσετίνης, της απιγενίνης και της καμφερόλης καθώς επίσης και ταννίνες και όξινα τριτερπένια (Arceusz & Wesolowski, 2013), γλυκοσίδες μονοτερπενίων και παράγωγα σεσκιτερπενίων. Το αιθέριο έλαιο του φυτού αποτελείται κυρίως από μονοτερπενικές αλδεύδες (EMA/HPMC, 2013). Τα φυτά της οικογένειας αυτής είναι γνωστά για τις αντιικές τους ιδιότητες ενώ εκχυλίσματα αυτών έχουν χαρακτηριστεί για την αντιριζική και την αντιβακτηριακή τους δράση η οποία συνδέεται και οφείλεται στο φαινολικό τους περιεχόμενο (Astani *et al.*, 2012).



Εικόνα 3. Χάρτης κατανομής της *Melissa officinalis*. Με πράσινο χρώμα διακρίνονται οι περιοχές στις οποίες αυτοφύεται μεταξύ αυτών και η Ελλάδα (Euro+Med (2006-): Euro+Med PlantBase - the information

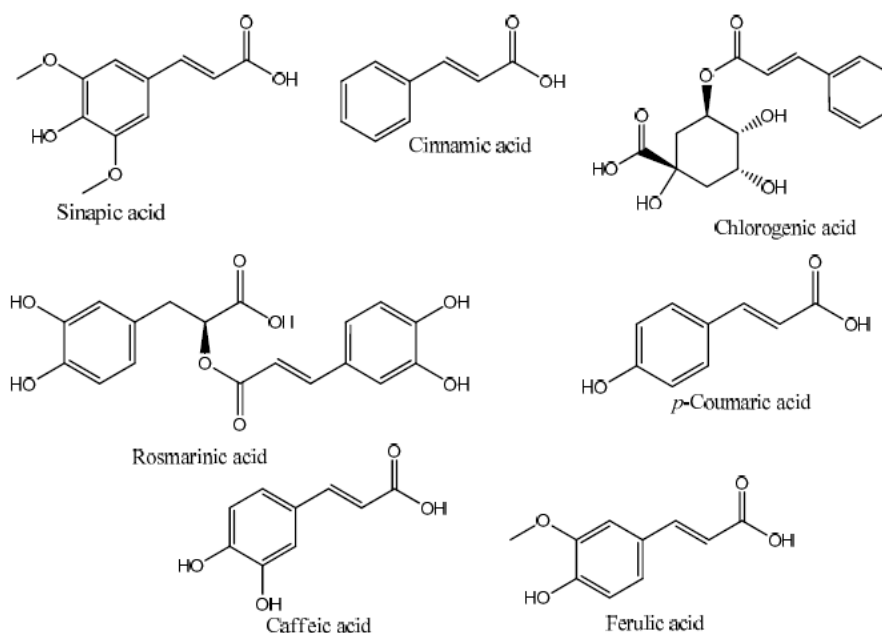
Η αντι-HSV-1 δράση των υδατικών εκχυλισμάτων των φύλλων του συγκεκριμένου φυτού οφείλεται στη συνεργιστική δράση του ροσμαρινικού, καφεϊκού και ρ-κουμαρικού οξέος. Μάλιστα φαίνεται να υπάρχουν πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ όλων των φυτοχημικών ουσιών που περιέχονται στο εκχύλισμα στοχεύοντας σε πολλούς θεραπευτικούς στόχους ταυτόχρονα. Το παραπάνω έχει ως αποτέλεσμα το εκχύλισμα να εμφανίζει αυξημένη δραστηριότητα έναντι του HSV-1 σε σύγκριση με τα μεμονωμένα συστατικά καθώς και αυξημένη εκλεκτικότητα, ενώ έχει χαμηλότερη τοξικότητα. Μελέτη μάλιστα αναφέρει ότι το εκχύλισμα της *M. officinalis* αναστέλλει τον ιό σε ποσοστό μεγαλύτερο του 99% σε συγκέντρωση 15 μg/mL, η οποία είναι πολύ μικρότερη από τη μέγιστη μη τοξική συγκέντρωση ενώ η τιμή του SI (Selective Index) του εκχυλίσματος, η οποία εκφράζει την εκλεκτικότητα, είναι 875 καθιστώντας το πολλά υποσχόμενο (Astani *et al.*, 2012).

Όσον αφορά τον μηχανισμό της αντιικής δράσης, φαίνεται πως το υψηλό θεραπευτικό αποτέλεσμα του εκχυλίσματος οφείλεται στην αναστολή της προσκόλλησης και του σταδίου της διείσδυσης του ιού στα κύτταρα κατά τα πρώτα στάδια της ιικής μόλυνσης, όταν αρχίζουν να εμφανίζονται τα πρώτα συμπτώματα. Έτσι αδρανοποιούνται οι εξωκυτταριοί ιοί και πλέον δεν είναι ικανοί να μολύνουν περαιτέρω τα κύτταρα με αποτέλεσμα η μόλυνση να σταματά στα πρώιμα στάδια. Ρόλο-κλειδί για την ιική προσκόλληση και διείσδυση παίζουν διάφορες ιικές γλυκοπρωτεΐνες για παράδειγμα οι gB και gD, οι οποίες μεσολαβούν στα αρχικά στάδια εισόδου του ιού στα κύτταρα. Το εκχύλισμα της *M. officinalis* αλληλοεπιδρά απευθείας με τις ιικές γλυκοπρωτεΐνες και γενικά ο στόχος της αλληλεπίδρασης προσδέτη-υποδοχέα παραμένει πολλά υποσχόμενος στην αντιική θεραπεία (Astani *et al.*, 2014). Το εκχύλισμα της *M. officinalis* αποτελεί έναν καλό προφυλακτικό και θεραπευτικό παράγοντα στις μολύνσεις από HSV-1 και κατά επέκταση είναι ένα χρήσιμο όπλο στην τοπική θεραπεία των επαναλαμβανόμενων ιικών μολύνσεων (Astani *et al.*, 2014) (Astani *et al.*, 2012).

Υδροξυκινναμικά οξέα και αντιική δράση

Τα φαινολικά συστατικά είναι μια ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών από μύκητες και φυτά, τα οποία δεν είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή τους. Εκκρίνονται για την προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, κατά την διάρκεια του αγώνα επιβίωσης εναντίον άλλων φυτών, εντόμων, ιών και βακτηρίων, ενώ είναι επίσης υπεύθυνα για τη μυρωδιά των φυτών, το χρώμα και τη γεύση τους (Taofiq *et al.*, 2017). Τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι ευρέως καταμελημένα στο φυτικό βασίλειο και βρίσκονται στις περισσότερες οικογένειες φυτών συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που χρησιμοποιούνται στη μαγειρική, στα αφεψήματα, στα φρούτα, στα λαχανικά και στα δημητριακά καθώς επίσης και στα φαρμακευτικά φυτά. Η κυριότερη χρήση τους στα φυτά είναι η υποστήριξη της αμυντικής στρατηγικής αυτών τόσο από δομικής άποψης όσο και από χημικής. Υπάρχουν τόσο ελεύθερα όσο και σαν συστατικά πολυμερών των φυτών (El-Seedi *et al.*, 2012). Μπορούν επίσης να βρεθούν με τη μορφή των παραγώγων, όπως αμιδία (συνδυασμός με αμινοξέα ή πεπτιδία) και εστέρες (συνδυασμός με υδροξυλ- οξέα ή γλυκοσίδες). Κατέχουν ποικίλες δράσεις

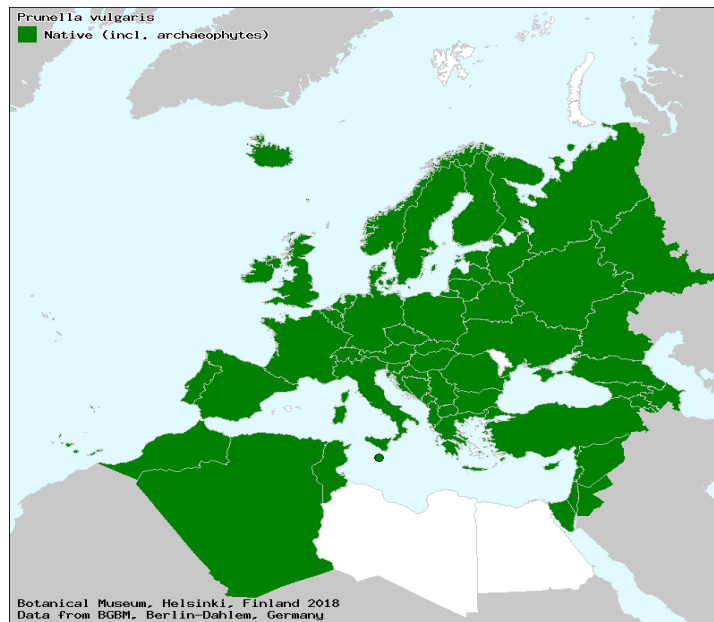
όπως η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης, η αντιμικροβιακή, η δράση έναντι του ενζύμου της κολλαγενάσης, καθώς και λευκαντικές ιδιότητες και αντιική δράση συμπεριλαμβανομένου και του HSV-1, οι οποίες παίζουν ρόλο κλειδί στη χρήση τους για τα προϊόντα καλλυντικής και θεραπευτικής φύσης. Η φαρμακευτική χρήση αυτών και των παραγώγων τους έχει αποδοθεί κατά μεγάλο ποσοστό στις πολλαπλές υδροξυλομάδες που υπάρχουν στη χημική δομή τους καθιστώντας τους καλούς σαρωτές ελευθέρων ριζών (Taofiq *et al.*, 2017).



Εικόνα 4. Οι δομές των υδροξυκινναμικών οξέων και των παραγώγων τους (Taofiq *et al.*, 2017).

1.3.2 Η *Prunella vulgaris* L. και ο μηχανισμός αντι-HSV-1 δράσης των βιοδραστικών ουσιών της

Η *Prunella vulgaris* L. ή “self-heal” είναι μέλος της οικογένειας Lamiaceae και χρησιμοποιήθηκε ευρέως κατά το 17^ο αιώνα στη λαϊκή θεραπευτική για την ταχεία επούλωση των πληγών και τη μείωση του πυρετού. Αναπτύσσεται ευρέως σε εύκρατες περιοχές και βουνά της Ευρώπης και της Ασίας καθώς και τη βορειοδυτική Αφρική και τη βόρεια Αμερική (Psotová *et al.*, 2003). Η *Prunella vulgaris* είναι πλούσια σε φαινολικά οξέα με κυρίαρχο το ροσμαρινικό οξύ (Psotová *et al.*, 2003) και σε εξαιρετικά μικρές ποσότητες το καφεϊκό και χλωρογενικό οξύ (Demir *et al.*, 2011), τριτερπένια με κυρίαρχα το ουρσολικό και το ολεανολικό οξύ, τριτερπενοειδή, φλαβονοειδή όπως η ρουτίνη (και πάλι σε εξαιρετικά μικρή ποσότητα) (Demir *et al.*, 2011), ταννίνες και αιθέριο έλαιο (Chen *et al.*, 2012). Περιέχει επίσης φενχόνη και πολυσακχαρίτες με αναγνωρισμένο την προυνελλίνη όμως έχουν ανιχνευτεί και άλλοι (Xu *et al.*, 1999) .



Εικόνα 5. Χάρτης κατανομής της *Prunella vulgaris*. Με πράσινο χρώμα διακρίνονται οι περιοχές στις οποίες αυτοφύεται μεταξύ αυτών και η Ελλάδα (Euro+Med (2006-): Euro+Med PlantBase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. Published on the Internet <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/> [accessed 15/5/2019].

Οι λεγόμενες «φυτικές αιχμές» σε πλήρη ανθοφορία ή αλλιώς “spikes” της *Prunella vulgaris* έχουν μελετηθεί και δείξει σημαντική δράση έναντι του HSV-1 και το κύριο δραστικό συστατικό είναι ένας πολυσακχαρίτης (Xu *et al.*, 1999). *In vitro* πειράματα έδειξαν ότι κλάσματα της *Prunella vulgaris* που περιείχαν τον υδατοδιαλυτό ανιονικό πολυσακχαρίτη μπορούσαν να αναστείλουν τον σχηματισμό πλάκας του HSV-1 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Ο πολυσακχαρίτης δεν έδειξε κάποια αντιπηκτική ή κυτταροτοξική δράση. Επίσης ένα άλλο σύμπλοκο λιγνινο-υδατάνθρακα μπορούσε να αναστείλει τον HSV-1. (Chiu *et al.*, 2004)(Bai *et al.*, 2016). Τέλος, άλλη έρευνα αναφέρει ότι η αντιική δράση της *Prunella vulgaris* οφείλεται και σε δύο τριτερπένια, το βετουλινικό οξύ και το 2α,3α-δι-υδροξυ-ουρσ-12-εν-28-οϊκό οξύ (Ryu *et al.*, 1992).

Η βιβλιογραφία μέχρι στιγμής αναφέρει τρεις πολυσακχαρίτες να έχουν απομονωθεί από την *Prunella vulgaris*, από τους οποίους οι δύο σχετίζονται με τη δράση έναντι του HSV-1. Παρακάτω αναφέρονται πιο αναλυτικά από τον πολυσακχαρίτη με το μεγαλύτερο μέγεθος σε αυτόν με το μικρότερο. Αρχικώς αναφέρεται η προουελλίνη, με μέγεθος 10000 Da, pH 7,4 σε υδατικό διάλυμα, η οποία περιέχει 0,14% θείο καθώς και γλυκόζη και γαλακτόζη σαν κύρια συστατικά σάκχαρα και ξυλόζη και γαλακτοσαμίνη σαν δευτερεύοντα σάκχαρα. Αυτός ο πολυσακχαρίτης εμφανίζει δράση έναντι του HIV και είναι ο μεγαλύτερος σε μέγεθος (Xu *et al.*, 1999). Επίσης έχει απομονωθεί ακόμη ένα σύμπλοκο λιγνινο-υδατανθράκων με μοριακό βάρος 8500 Da, 0,92% περιεχόμενο θείο, αναλογία άνθρακα: υδρογόνο: άζωτο: θείο 37,40:3,76:0,60:0,92 και δομικά σάκχαρα τη γλυκόζη, τη γαλακτόζη, τη ξυλόζη και το γαλακτουρονικό οξύ, με τη γλυκόζη να κυριαρχεί. Σε αυτόν τον πολυσακχαρίτη ανιχνεύτηκαν επίσης μαννόζη, ραμνόζη και αραβινόζη. Μπορεί να αποτελεί θραύσμα της προουελλίνης κάτι που πρέπει να επιβεβαιωθεί από την σύγκριση των δομών τους. Ο τρόπος δράσης αυτού του πολυσακχαρίτη είναι αφενός ότι αποτρέπει την πρόσδεση του ιού στα κύτταρα και αφετέρου ότι εμποδίζει τη διείσδυσή του σε αυτά πιθανόν μέσω αλληλεπίδρασης με

τις γλυκοπρωτεΐνες gC και gD, κάτι που απομένει να διερευνηθεί περαιτέρω (Zhang *et al.*, 2007). Άλλη μελέτη αναφέρει έναν ανιονικό πολυσακχαρίτη με μοριακό βάρος 3500 Da ο οποίος αποτελείται από 42% υδατάνθρακες, 0,75% ουρονικό οξύ, 30,78% άνθρακα, 3,05% υδρογόνο, 0,66% άζωτο και 2,69% θείο. Επίσης ο πολυσακχαρίτης αυτός είναι υδατοδιαλυτός και το υδατικό του διάλυμα έχει pH 5,5, ο κύριος μονοσακχαρίτης του είναι η γλυκόζη ενώ περιέχει και μονάδες γαλακτόζης και ξυλόζης. Ο συγκεκριμένος πολυσακχαρίτης αναστέλλει τον ιό HSV-1 σε συγκέντρωση 100 µg/mL ενώ η μέγιστη μη κυτταροτοξική του δράση εμφανίζεται στα 500 µg/mL. Είναι αρκετά πιθανό ότι αυτός ο πολυσακχαρίτης είναι θραύσμα της προυνελλίνης ή του συμπλόκου των λιγνινο-υδατανθράκων, μπορεί επίσης να είναι ένας τελείως διαφορετικός πολυσακχαρίτης και το παραπάνω μπορεί να απαντηθεί μόνο με σύγκριση των δομών τους. Ο μηχανισμός της αντιικής δράσης είναι ότι προσδένεται στα ιικά σωματίδια και εμποδίζει την πρόσδεση και την μόλυνση των κυττάρων καθώς και την έκφραση των ιικών αντιγόνων. Επίσης μειώνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του ιού, κάτι το οποίο είναι πολύ ενδιαφέρον, και απομένει να αποσαφηνιστεί ο ενδοκυτταρικός τρόπος της δράσης του καθώς όταν υπάρχει προκατεργασία των κυττάρων με τον πολυσακχαρίτη πριν τη μόλυνση τους με τον ιό δεν προσφέρει καμιά προστασία. Αυτό μάλλον εξηγείται διότι μη μολυσμένα κύτταρα δεν επιτρέπουν την είσοδο του πολυσακχαρίτη σε αντίθεση με τα μολυσμένα στα οποία έχει αλλάξει η διαπερατότητα της μεμβράνης τους με αποτέλεσμα να εισέρχεται ο πολυσακχαρίτης και να ασκεί την αντιική του δράση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δρα τόσο στα πρώιμα στάδια όσο και στα μετέπειτα, κάτι που τον καθιστά καλό αντι-HSV-1 παράγοντα (Xu *et al.*, 1999) .

Πολυσακχαρίτες

Τα σάκχαρα ταξινομούνται σε τρεις ομάδες ανάλογα με το μέγεθός τους: τους μονοσακχαρίτες, όπως η γλυκόζη, τους ολιγοσακχαρίτες, όπως η σουκρόζη και τους πολυσακχαρίτες ο οποίοι αποτελούν μεγάλα μόρια όπως η κυτταρίνη. Οι πολυσακχαρίτες είναι μακρομόρια που περιέχουν μεγάλο αριθμό μονοσακχαριτών με μεγάλο μοριακό βάρος. Είναι σχεδόν αδιάλυτοι στο νερό και δεν έχουν γεύση. Τα κόμματα και οι βλέννες αποτελούν πολύπλοκες ομάδες πολυσακχαριτών και κατά την υδρόλυσή τους παρέχουν εξόζες, πεντόζες και ουρονικά οξέα (Cseke *et al.*, 2006). Μεταξύ των πολλών δράσεων τους, το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια στρέφεται στις αντιικές τους ιδιότητες (Ghosh *et al.*, 2009)(Jin *et al.*, 2015). Και πιο συγκεκριμένα έναντι ιών με φάκελο όπως οι ιοί της οικογένειας των ερπητοϊών (Ceole *et al.*, 2018). Οι πολυσακχαρίτες μπορούν να εκφράσουν τις αντιικές τους ιδιότητες μέσω αναστολής κάποιου σταδίου του κύκλου ζωής του ιού είτε μέσω ενίσχυσης της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή με σκοπό την πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση του ιού. Έτσι λοιπόν μπορούν να παρέμβουν και να αναστείλουν καθένα από τα στάδια του κύκλου ζωής του ιού: 1) την ιική προσρόφηση, για παράδειγμα αλληλοεπιδρώντας είτε απευθείας με το ιικό σωματίδιο είτε με τους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή, 2) τη διείσδυση του ιού στο κύτταρο του ξενιστή, 3) τον σχηματισμό του καψιδίου, αναστέλλοντας αλλοστερικές διαδικασίες, 4) τη σύνθεση του γενετικού υλικού, αλληλοεπιδρώντας είτε με τα εμπλεκόμενα ένζυμα είτε με άλλους στόχους, 5) τη συναρμολόγηση του ιικού σωματιδίου και την 6) την απελευθέρωση του ιικού σωματιδίου. Επίσης οι πολυσακχαρίτες μπορούν να αναστείλουν απευθείας τα

ελεύθερα ιικά σωματίδια πριν αυτά μολύνουν τα κύτταρα-στόχο, για παράδειγμα αλληλοεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες gB και gC του HSV-1. Καθένας από τους παραπάνω μηχανισμούς δράσης συνδέεται με τα ειδικά δομικά χαρακτηριστικά των πολυσακχαριτών και τους ειδικούς ιικούς ορότυπους (Wang *et al.*, 2012).

1.3.3 Το *Thymus vulgaris* L. και ο μηχανισμός αντι-HSV-1 δράσης των βιοδραστικών ουσιών του

Το *Thymus vulgaris* L. ή αλλιώς θυμάρι ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae, είναι ένα αιθαλή βότανο το οποίο αυτοφύεται στην νότια Ευρώπη και την Μεσόγειο. Τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου του είναι η θυμόλη (23%-60%), το γ-τερπινένιο (18%-50%), το p-κυμένιο (8%-44%), η καρβακρόλη (2%-8%) και η λιναλόλη (3%-4%). Τόσο το αιθέριο έλαιο όσο και η θυμόλη έχουν σημαντικές αντιβακτηριακές, αντιμυκησιακές και αντι-φλεγμονώδεις δράσεις (Satyal *et al.*, 2016). Κατέχει επίσης και αντιική δράση έναντι του HSV-1. Μελέτη του αιθέριου ελαίου του θυμαριού του οποίου οι κύριες δραστικές ουσίες είναι η θυμόλη και η καρβακρόλη έδειξε ότι η μέγιστη μη τοξική συγκέντρωση ήταν 0,005%. Ο τρόπος με τον οποίο δρα το αιθέριο έλαιο είναι ότι επηρεάζει τον ιό πριν την προσρόφηση του με σαφώς διαφορετικό τρόπο του ήδη υπάρχοντος της ακυκλοβίρης με συνέπεια να είναι αποτελεσματικό ακόμα και σε ανθεκτικά στην ακυκλοβίρη στελέχη. Φαίνεται να είναι περισσότερο αποτελεσματικό στον ελεύθερο ιό ενώ έχει περιορισμένη δράση στην αντιγραφή του ιού και την εξάπλωσή του από κύτταρο σε κύτταρο. Τα παραπάνω στοιχεία συνηγορούν ότι το αιθέριο έλαιο αλληλοεπιδρά με τον φάκελο του ιικού σωματιδίου η ακεραιότητα της δομής του οποίου είναι αναγκαία για την προσρόφηση του ιού και την είσοδο του στα κύτταρα του ξενιστή. Άλλη πιθανότητα είναι να διασπά τον ιικό φάκελο. Να σημειωθεί πως τα αιθέρια έλαια είναι σύνθετα μίγματα δραστικών ουσιών με χαμηλό μοριακό βάρος, όπως οι υδρογονάνθρακες μονοτερπενίων, σεσκιτερπενίων και τα οξειδωμένα τους παράγωγα, τα ομόλογα των φαινυλοπροπανοειδών και οι μικρές ποσότητες διτερπενοειδών, με αποτέλεσμα οι λιπόφιλες αυτές ουσίες να αλληλοεπιδρούν με τη λιπόφιλη μεμβράνη (Schnitzler *et al.*, 2007). Ανεξάρτητη μελέτη έδειξε ότι οι ουσίες των αιθέριων ελαίων θυμόλη, καρβακρόλη και p-κυμένιο εμφανίζουν αντιερπητική δράση αναστέλλοντας απευθείας τον ιό είτε επεμβαίνοντας στον ιικό φάκελο είτε καλύπτοντας ιικές δομές οι οποίες είναι απαραίτητες για την προσρόφηση και την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή. Απαιτείται βέβαια να διευκρινιστεί αν η αλληλοεπίδραση με την μεμβράνη γίνεται εξαιτίας της πρόσδεσης με τις ιικές πρωτεΐνες. Να σημειωθεί πως η τιμή SI του αιθέριου ελαίου του θυμαριού είναι γύρω στο 7 και άρα κατάλληλη για χρήση στην τοπική θεραπεία (Sharifi-Rad *et al.*, 2017).

1.3.4 Η *Mentha x piperita* L. και ο μηχανισμός αντι-HSV-1 δράσης των βιοδραστικών ουσιών της

Η *Mentha x piperita* L. ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και φύεται σε πολλές περιοχές όπως στην Ευρώπη, μεταξύ άλλων χωρών της και στην Ελλάδα, στην βόρεια Αμερική και στη νότια Αφρική καθώς επίσης καλλιεργείται σε ακόμα περισσότερες. Το αιθέριο έλαιο της μέντας προέρχεται από το εναέριο τμήμα του ανθισμένου φυτού και οι δραστικές που περιέχει είναι οι εξής: μινθόλη (29%-48%), μινθόνη (20%-31%),

μινθοφουράνιο (6,8%), οξικό μινθύλιο (3%-10%) (Singh *et al.*, 2015) ενώ άλλα συστατικά ήταν η ισομινθόνη, η κινεόλη, το λεμονένιο και η καρβόνη. Αναλογία της κινεόλης προς το λεμονένιο μεγαλύτερη του δύο είναι χαρακτηριστική για τα αυτοφυή φυτά (Schuhmacher *et al.*, 2003). Βέβαια η χημική του σύσταση είναι πολύπλοκη και ποικίλη ενώ οι σχετικές συγκεντρώσεις διαφέρουν ανάλογα με το κλίμα, την καλλιέργεια και την γεωγραφική περιοχή. Το χαρακτηριστικό της άρωμα το οφείλει στην μινθόλη ενώ μεταξύ άλλων δράσεων κατέχει και δράση έναντι του HSV-1 (Schuhmacher *et al.*, 2003). Η τιμή SI είναι του αιθέριου ελαίου της μέντας είναι 7. Ο τρόπος δράσης του ελαίου εξαρτάται από τη δοσολογία και το χρονικό διάστημα εφαρμογής και είναι παρόμοιος με αυτόν του αιθέριου ελαίου του θυμαριού. Το αιθέριο έλαιο της μέντας αλληλοεπιδρά απευθείας με τα σωματίδια του ιού με τους δύο επικρατέστερους μηχανισμούς να είναι η διάσπαση του ιικού φακέλου και η κάλυψη σημαντικών ιικών δομών της επιφάνειας του ιού για την μετέπειτα προσκόλληση του, που ίσως είναι οι ιικές γλυκοπρωτεΐνες. Απομένει βεβαίως να μελετηθεί περισσότερο και να αποσαφηνιστεί. Η χρήση πάντως του αιθέριου ελαίου φαίνεται να είναι ιδανική στους ασθενείς που βιώνουν συχνά κρούσματα επιχείλιου έρπητα (Schuhmacher *et al.*, 2003). Το αιθέριο έλαιο μέντας είναι χρήσιμο στην θεραπεία του επιχείλιου έρπητα και για δυο ακόμα λόγους: την μείωση του πόνου λόγω της τοπικής αναισθητικής του δράσης και την αίσθηση δροσιάς με αποτέλεσμα την άμεση ανακούφιση των συμπτωμάτων του επιχείλιου έρπητα, πέραν της αντιικής του δράσης (Galeotti *et al.*, 2001). Πιο συγκεκριμένα η μινθόλη σαν τοπικός παράγοντας σε μικρές συγκεντρώσεις (<1%) δρα ως αντι-ερεθιστικό μέσω δημιουργίας αισθήματος δροσιάς, αρχικώς διεγείροντας τους αλγοϋποδοχείς “nociceptors” ενώ έπειτα τους αποευαισθητοποιεί. Επίσης η τοπική εφαρμογή της ενεργοποιεί τα κεντρικά αναλγητικά μονοπάτια. Η μινθόλη εμπλέκεται επίσης στην ενεργοποίηση των υποδοχέων TRPM8 οι οποίοι είναι μη εκλεκτικά κανάλια κατιόντων, στις νευρικές απολήξεις ή κατά μήκος του άξονα των νευρώνων, που είναι υπεύθυνοι για την αίσθηση του πόνου και ρόλος τους είναι να μεταδίδουν την αντίληψη ενός ερεθίσματος συμπεριλαμβανομένης και της θερμοκρασίας (ενεργοποιούνται σε θερμοκρασίες κάτω των 26 °C) κάτι που εξηγεί τη διττή δράση της. Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί πως οι επιδράσεις της μινθόλης τοπικά διαρκούν από πέντε μέχρι εξήντα λεπτά έπειτα από την εφαρμογής της (Pergolizzi *et al.*, 2018).

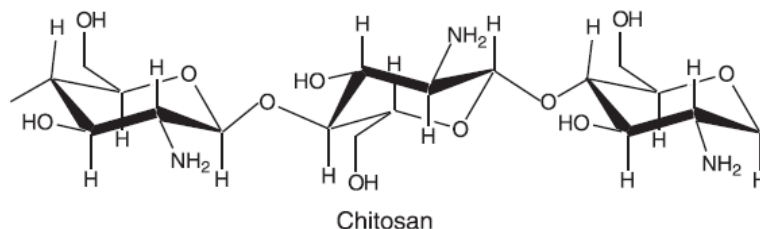
1.3.5 Η πρόπολη και ο μηχανισμός αντι-HSV-1 δράσης των βιοδραστικών ουσιών της

Η πρόπολη είναι ένα ρητινώδες υλικό το οποίο οι μέλισσες συλλέγουν από διάφορες φυτικές πηγές και το αναμιγνύουν με κερί με σκοπό να το χρησιμοποιήσουν για να «σφραγίσουν» αντιμικροβιακά τη κυψέλη στις περιπτώσεις που αυτό απαιτείται. Η χημική σύσταση της πρόπολης διαφέρει ποιοτικά και ποσοτικά και εξαρτάται κυρίως από τη γεωγραφική περιοχή και την εκάστοτε χλωρίδα της καθώς επίσης από την εποχή και τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες (Silva-Carvalho *et al.*, 2015) με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι βιολογικές ιδιότητές της. Επομένως έλεγχος και γνώση της περιοχής προέλευσης της πρόπολης αποτελεί ένα είδος τυποποίησης (Bankova *et al.*, 2014). Σε γενικές γραμμές η χημική της σύσταση περιλαμβάνει 50% ρητίνη, 30% κερί, 10% αιθέρια έλαια, 5% γύρη και 5% άλλες ουσίες στις οποίες περιλαμβάνονται μεταλλικά στοιχεία και οργανικές ενώσεις όπως φαινολικά οξέα

(κινναμικό, καφεϊκό οξύ κ.ά.) και τους εστέρες τους, φλαβονοειδή (φλαβόνες, φλαβονόνες, φλαβονόλες και χαλκόνες των διυδροφλαβονολών), τερπένια, αρωματικές αλδεΰδες και αλκοόλες, λιπαρά οξέα, στιλβένια και β-στεροειδή (Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Μεταξύ άλλων δράσεων της πρόπολης όπως η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης, η ανοσορυθμιστική κτλ. επιδεικνύει και σπουδαία αντιική δράση έναντι του HSV-1. Έτσι πρόπολη σε ποσότητα 30 μg/mL μειώνει αποτελεσματικά τον τίτλο του ερπητοϊού (Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Η πρόπολη φαίνεται να συμβάλει επίσης στην μείωση του σχηματισμού ουλής κατά τη διαδικασία επούλωσης δερματικών τραυμάτων, μειώνοντας το χρόνο επούλωσης, επιταχύνοντας την ανανέωση των ιστών και γενικότερα συμβάλλοντας στην μείωση του μεγέθους της πληγής (Oryan *et al.*, 2018) κάτι εξαιρετικά χρήσιμο στην επούλωση του επιχείλιου ερπητικού τραύματος. Είναι μη τοξικό φυσικό προϊόν με λίγες ανεπιθύμητες ενέργειες με μοναδικές εξαιρέσεις αυτών την αλλεργία και την δερματίτιδα εξ επαφής (οι οποίες όμως είναι ήπιες και μπορεί να πηγάζουν από αλλεργίες στο μέλι ή στα λουλούδια) και σε συνδυασμό με την υψηλή αντιική δράση της καθίσταται πολύτιμη στην αντιερπητική θεραπεία (Yildirim *et al.*, 2016). Θα πρέπει επίσης να διευκρινιστεί ότι παρόλη την ποικιλότητα στη χημική σύνθεση της πρόπολης εντοπίζονται κάποιες κοινές ομάδες ενώσεων όπως τα φλαβονοειδή, οι φαινόλες και τα τερπένια οι οποίες συμβάλουν στις φυσικοχημικές της δράσεις. Μάλιστα πιο συγκεκριμένα η *in vitro* αντιική δράση του βάμματος της πρόπολης οφείλεται στην παρουσία των πολυφαινόλων, των φλαβονοειδών και των φαινυλκαρβοξυλικών οξέων (Hazem *et al.*, 2017), (Schnitzler *et al.*, 2009), (Kurokawa *et al.*, 2011), (Khurshid *et al.*, 2017). Η δράση των παραπάνω ουσιών είναι συνεργιστική (Hazem *et al.*, 2017) και η αντιική δράση της πρόπολης οφείλεται στο σύνολο αυτών κι όχι στη μεμονωμένη δράση τους καθιστώντας το γαληνικό σκεύασμα περισσότερο αποτελεσματικό όσον αφορά τη φαρμακολογική του αξία (Bankova *et al.*, 2014). Οι διάφορες ουσίες φαίνεται να δρουν με διαφορετικό μηχανισμό (Hazem *et al.*, 2017) με συνέπεια οι μηχανισμοί δράσης της πρόπολης να είναι και αυτοί ποικίλοι και οι διακυμάνσεις τους να είναι ανάλογες με τις διακυμάνσεις του χημικού περιεχομένου της (Bankova *et al.*, 2014). Ενδεικτικοί μηχανισμοί δράσης είναι: 1) Τα φλαβονοειδή της πρόπολης (κερσετίνη, ρουτίνη, καμφερόλη, γκαλανγκίνη) και τα αρωματικά οξέα (το καφεϊκό οξύ και τα παράγωγά του) προστατεύουν τις λιπιδικές μεμβράνες καθώς μπλοκάρουν τη δράση των λυσοσωμικών ενζύμων εμποδίζοντας έτσι την είσοδο του ιού στα κύτταρα. Ο παραπάνω μηχανισμός δεν είναι αποσαφηνισμένος πλήρως αλλά πιθανότατα εμπλέκονται οι αμινομάδες των πρωτεϊνών του περιβλήματος οι οποίες αδρανοποιούνται από τη διαδικασία της φωσφορυλίωσης (Hazem *et al.*, 2017) 2) Ένας άλλος προτεινόμενος μηχανισμός είναι αυτός των αιθέριων ελαίων, δηλαδή, η αλληλοεπίδραση της πρόπολης με τα στοιχεία του ιικού φακέλου με αποτέλεσμα τη διάσπαση του ή την κάλυψη σημαντικών ιικών ενώσεων που υποβοηθούν την πρόσληψη και την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή, απομένοντας να αποσαφηνιστεί αν οι ιικές αυτές ενώσεις είναι γλυκοπρωτεΐνες (Schnitzler *et al.*, 2009) 3) Η δράση της πρόπολης μπορεί να εκδηλωθεί κατά τη διάρκεια της προσρόφησης του ιού και να τον παρεμποδίσει να διεισδύσει στα κύτταρα του ξενιστή με απευθείας επαφή με αυτόν έξω από τα κύτταρα του ξενιστή επιφέροντας του αλλαγές στη δομή και μειώνοντας την μολυσματικότητά του. Εκτιμάται πως υπάρχει πιθανότητα η πρόπολη να δρα και ενδοκυτταρικά μετά τη διείσδυση του ιού στα κύτταρα του ξενιστή (Bankova *et al.*, 2014).

1.3.6 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης τυχαία κατανεμημένων β(1,4)-συνδεδεμένων D-γλυκοσαμινών και N-ακετυλ-D-γλυκοσαμινών και αποτελεί το αποακετυλιωμένο παράγωγο της χιτίνης, (Siripatrawan & Harte, 2010) ενός φυσικού και άφθονου βλεννοπολυσακχαρίτη που αποτελεί το υποστηρικτικό υλικό των οστρακόδερμων, των εντόμων κτλ. και μπορεί να απομονωθεί από κελύφη καβουριών και γαρίδας καθώς και από μυκητιακά μικκύλια (Kumar, 2000). Είναι το δεύτερο πιο άφθονο πολυμερές μετά την κελουλόζη και προέρχεται από ανανεώσιμες πηγές. Επιπλέον είναι βιο-αποικοδομήσιμο υλικό ενώ η οικολογική παραγωγή της δεν επηρεάζει αρνητικά το περιβάλλον, όπως π.χ. με τα παράγωγα του πετρελαίου και είναι γνωστή για τον φιλικό προς το περιβάλλον χαρακτήρα της (Tongnuanchan *et al.*, 2012) (Siripatrawan & Harte, 2010). Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους φυσικούς πολυσακχαρίτες η χιτοζάνη είναι κατιονικό πολυμερές με pKa περίπου 6,3 και ανάμεσα στις μοναδικές της ιδιότητες περιλαμβάνονται η ικανότητα να σχηματίζει φιλμ. Η χιτοζάνη είναι διαλυτή σε αραιά όξινα υδατικά διαλύματα, όπως το οξικό οξύ, το φορμικό κτλ. (Kumar, 2000). Έχει αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες που εξαρτώνται από το μοριακό της βάρος και τη συγκέντρωσή της (Siripatrawan & Harte, 2010) ενώ άλλα χαρακτηριστικά της είναι η βιοσυμβατότητα, η βιοαποικοδόμηση, η μη-τοξικότητα και οι απορροφητικές ιδιότητες (Kumar, 2000). Μερικές από τις εφαρμογές της είναι στα καλλυντικά, στην παρασκευή τεχνητού δέρματος, στην οφθαλμολογία, στην επιστήμη της διατροφής, στη δέσμευση μετάλλων από τα λύματα καθώς και στο να λειτουργεί ως σύστημα διανομής φαρμακευτικών ουσιών (Kumar, 2000) και κατά κόρον στην επούλωση τραυμάτων (Patrulea *et al.*, 2015) (Azuma *et al.*, 2018).



Εικόνα 6. Δομή της χιτοζάνης (Jayakumar *et al.*, 2011).

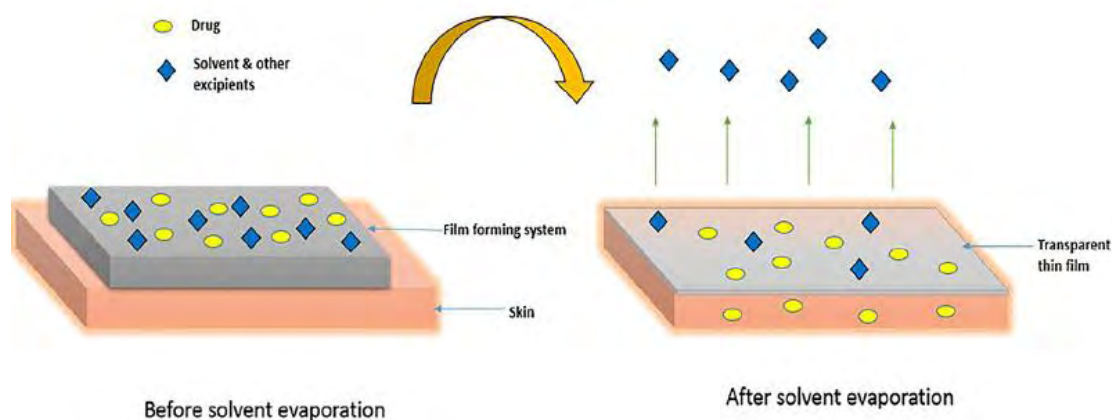
Το ιδανικό κάλυμμα ενός τραύματος θα πρέπει να είναι ένα ενυδατωμένο περιβάλλον πάνω στην επιφάνεια της πληγής, το οποίο θα επιτρέπει την ανταλλαγή των αερίων, θα δρα ως φραγμός για τους μικροοργανισμούς και τους ιούς και θα απορροφά το μεγαλύτερο ποσοστό των εκκρίσεων. Θα πρέπει επίσης να είναι μη-τοξικό, να μην προσκολλάται σε πολύ μεγάλο βαθμό και άρα να αφαιρείται εύκολα, χωρίς να δημιουργεί δευτερογενές τραύμα, θα πρέπει να αποτελείται από άμεσα διαθέσιμο βιο-υλικό, το οποίο ιδανικά θα απαιτεί όσον το δυνατόν λιγότερη επεξεργασία ενώ ταυτόχρονα θα κατέχει αντιμικροβιακές και αντιικές ιδιότητες και θα προωθεί την επούλωση του τραύματος. Προηγούμενες μελέτες αποκαλύπτουν ότι τα «κάλυμματα» χιτοζάνης (με τον όρο αυτό εννοούνται τα φιλμ, οι μεμβράνες, οι υδρογέλες κτλ., οπιδήποτε μπορεί να τοποθετηθεί πάνω σε μια παθούσα περιοχή για να προωθήσει την επούλωσή της) επιταχύνουν την επιδιόρθωση διάφορων ιστών και συμβάλλουν στη σμίκρυνση του μεγέθους των τραυμάτων καθώς επίσης ρυθμίζουν την έκκριση των ενδιάμεσων ουσιών της φλεγμονής όπως είναι η ιντερλευκίνη 8, η προσταγλαδίνη

Ε, η ιντερλευκίνη 1β και άλλες ουσίες. Λειτουργεί επίσης αιμοστατικά, βοηθώντας τη πήξη του αίματος και μπλοκάροντας τις απολήξεις των νεύρων για μείωση της αίσθησης του πόνου. Η χιτοζάνη σταδιακά αποπολυμερίζεται και απελευθερώνει τη Ν-ακετυλο-β-D-γλυκοσαμίνη, η οποία ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, βοηθά στην διατεταγμένη εναπόθεση του κολλαγόνου και διεγείρει την αυξημένη σύνθεση του φυσικού υαλουρονικού οξέος στην παθούσα περιοχή. Συμβάλει κατά αυτό τον τρόπο, στην ταχύτερη επούλωση της πληγής και την πρόληψη του σημαδιού που μπορεί να αφήσει το τραύμα (Jayakumar *et al.*, 2011). Η αιμοστατική ιδιότητα της χιτοζάνης σε μια πληγή οφείλεται στη συσσώρευση των ερυθροκυττάρων και τον σχηματισμό θρόμβου. Ταυτόχρονα μπορεί να διεγείρει την μετανάστευση των πολυμορφοπύρηνων καθώς και των μονοπύρηνων κυττάρων και να επιταχύνει την επανεπιθηλίωση του δέρματος (Ojagh *et al.*, 2010). Φυσιολογικά η διαδικασία επούλωσης μπορεί να διαιρεθεί σε τέσσερις διαφορετικές αλλά αλληλοεπικαλυπτόμενες φάσεις: τη φλεγμονή, το σχηματισμό του κοκκοποιητικού ιστού “granulation tissue”, την αναδιαμόρφωση της περιοχής του τραύματος και την επανεπιθηλίωση (Jagur-Grodzinski, 2006) περιλαμβάνοντας διαδικασίες όπως πήξη, αγγειογένεση και ινοπλασία (Altiok *et al.*, 2010). Το να εφαρμόζεται στα τραύματα μια μεμβράνη η οποία θα αποικοδομείται, προσφέρει το πλεονέκτημα ότι δεν προκαλεί δευτερογενές τραύμα κατά την αφαίρεση της (Jagur-Grodzinski, 2006). Όταν ένα «κάλυμμα» εφαρμόζεται σε μια πληγή, οι ινοβλάστες και τα επιθηλιακά κύτταρα συνήθως προσκολλώνται στο «κάλυμμα». Όταν πρέπει να αλλαχθεί, η προσκόλληση μεταξύ του «καλύμματος» και του νεοσυντιθέμενου ιστού θα «σπάσει», προκαλώντας έτσι επανατραυματισμό της ήδη παθούσας περιοχής (Haitang *et al.*, 2007). Επιπλέον λόγω του ότι το τραύμα από ερπητοϊό μπορεί να καλυφθεί από το περιεχόμενο των φυσαλίδων όταν αυτές σπάσουν, το φιλμ από άλλα πολυμερή όπως πολυουρεθάνη ή σιλικόνη πιθανότατα δεν θα είναι αρκετό, διότι δεν μπορούν να απορροφήσουν μεγάλες ποσότητες εκκρίσεων (Jagur-Grodzinski, 2006). Εκτεταμένες έρευνες αναφέρουν ότι η χιτοζάνη συμβάλει στην επούλωση τραυμάτων μέσω του πολλαπλασιασμού και της ενεργοποίησης των φλεγμονωδών κυττάρων στον κοκκοποιητικό ιστό με συνέπεια να επιταχύνεται ο καθαρισμός της πληγής και να επανεπιθηλιώνεται η περιοχή (Sezer *et al.*, 2007).

1.4 Φαρμακομορφή προϊόντος

Για την θεραπεία παθήσεων των ιστών και επούλωσης τραυμάτων του δέρματος είναι απαραίτητη η διατήρηση της φαρμακευτικής ουσίας πάνω στην παθούσα περιοχή για τον απαραίτητο χρόνο δράσης. Τα συστήματα σχηματισμού τοπικών φιλμ είναι τα πλέον κατάλληλα καθώς εμφανίζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων σε σύγκριση με τις υπόλοιπες φαρμακομορφές καθώς προσκολλώνται αποτελεσματικά στην περιοχή, σχηματίζουν ένα λεπτό διακριτικό φιλμ και παρέχουν τα απαραίτητα δραστικά συστατικά. Το σύστημα σχηματισμού φιλμ εφαρμόζεται στην παθούσα περιοχή και σχηματίζει ένα διακριτικό φιλμ *in situ* έπειτα από την εξάτμιση του διαλύτη. Έπειτα από την εφαρμογή, η σύνθεση του συστήματος αλλάζει σημαντικά εξαιτίας της εξάτμισης των πτητικών συστατικών το οποίο οδηγεί στο σχηματισμό ενός φιλμ στην επιφάνεια του δέρματος. Σε αυτή τη διαδικασία η συμπύκνωση της σύνθεσης αυξάνεται φτάνοντας στο επίπεδο κορεσμού, με τη δυνατότητα να φθάσει το επίπεδο υπερκορεσμού στην επιφάνεια του δέρματος. Ο υπερκορεσμός έχει ως αποτέλεσμα

την αυξημένη ροή των δραστικών ουσιών μέσω του δέρματος αυξάνοντας τη θερμοδυναμική δραστηριότητα του σκευάσματος χωρίς να επηρεάζει το φραγμό του δέρματος, μειώνοντας έτσι τις παρενέργειες ή τον ερεθισμό.



Εικόνα 7. Μηχανισμός σχηματισμού φιλμ στο δέρμα (Kathe & Kathpalia, 2017).

Το φιλμ πρέπει να μπορεί να εφαρμόζεται ανεξάρτητα από το σχήμα ή την επιφάνεια της περιοχής, να μπορεί να παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα, να σχηματίζεται μέσα σε λίγα λεπτά και να έχει διακριτική εμφάνιση. Επιπλέον, επιθυμητά χαρακτηριστικά του σχηματιζόμενου φιλμ είναι να μην είναι κολλώδες, να είναι εύκαμπτο και εύκολα αφαιρούμενο ή βιοδιασπώμενο. Επίσης, να έχει άριστες προσκολλητικές ικανότητες στο δέρμα και αντοχή παραμονής στην επιφάνειά του ώστε η πιθανότητα μεταφοράς των δραστικών σε άλλες περιοχές του δέρματος ή ρούχα και άλλες επιφάνειες να είναι περιορισμένη και τέλος να επιτρέπει τη λιγότερο συχνή εφαρμογή εξασφαλίζοντας έτσι τη συμμόρφωση του ασθενούς. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά καταφέρνει να συνδυάσει το σχηματιζόμενο *in situ* φιλμ. Αντίθετα τα επιθέματα παρουσιάζουν πληθώρα μειονεκτημάτων με πιο συχνό το δερματικό ερεθισμό εξαιτίας των αποφρακτικών ιδιοτήτων και της μη σωστής «αναπνοής» της περιοχής, κάτι που εμποδίζει την απώλεια υδρατμών από την επιφάνεια του δέρματος. Τα επιθέματα εμφανίζουν επίσης δυσκολίες στην εφαρμογή των καμπυλωτών επιφανειών, η αφαίρεσή τους είναι επώδυνη και το αισθητικό αποτέλεσμα συνήθως δεν είναι επαρκές. Από την άλλη μεριά οι ημιστερεές φαρμακομορφές, όπως οι κρέμες και οι αλοιφές, δεν εμφανίζουν κάποια από τα παραπάνω μειονεκτήματα αλλά άλλους περιορισμούς. Στους περιορισμούς αυτούς συμπεριλαμβάνονται ότι δεν εξασφαλίζεται συνεχή και πολύωρη επαφή με την δερματική επιφάνεια καθώς μπορεί εύκολα να αφαιρεθεί από τα ρούχα, την επαφή με άλλες επιφάνειες κτλ. καθώς και το ότι εμφανίζουν μια κολλώδη και λιπαρή αίσθηση. Ακολουθεί ένας πίνακας που συνοψίζει τα συγκριτικά χαρακτηριστικά των φαρμακομορφών.

Πίνακας 1. Σύγκριση των ιδιοτήτων μεταξύ των φαρμακομορφών: επιθεμάτων, συστήματος σχηματισμού φιλμ και ημιστερεών μορφών (Kathe & Kathpalia, 2017).

Ιδιότητες	Επιθέματα	Σύστημα σχηματισμού φιλμ	Ημιστερεές μορφές (κρέμες, αλοιφές κτλ.)
Εμφάνιση	Διακριτικό	Σχεδόν αόρατο	Εξαιρετικά ορατό
Αίσθηση στο δέρμα	Μη-κολλώδης, μη-λιπαρή υφή	Μη-κολλώδης, μη-λιπαρή υφή	Συνήθως κολλώδης και λιπαρή υφή
Τρόπος χορήγησης	Σχετικά εύκολος	Εύκολος	Εύκολος με πιθανότητα να καλύψει και τις γύρω περιοχές
Προσαρμογή δόσης Παρατεταμένη αποδέσμευση δραστικών	Χαμηλή Ναι	Υψηλή Ναι	Υψηλή Όχι
Αποφρακτικές ιδιότητες	Ναι	Όχι	Όχι
Αντοχή παραμονής	Ναι	Ναι	Όχι
Εναπομείναντα υπολείμματα μετά την αφαίρεση	Πιθανά	Όχι	Όχι

Το σύστημα σχηματισμού φιλμ μπορεί να έχει τη μορφή διαλύματος, γέλης ή γαλακτώματος. Αποτελείται σε γενικές γραμμές από τις δραστικές ουσίες, το πολυμερές, το διαλύτη και τον πλαστικοποιητή. Κατά την εκτίμηση των φιλμ θα πρέπει να ελέγχονται οι παρακάτω ιδιότητες: 1) η ικανότητα σχηματισμού φιλμ και τα χαρακτηριστικά του (οσμή, χρώμα, αν είναι κολλώδες, αν μπορεί να αφαιρεθεί εύκολα κτλ.), 2) το πόσο εύκαμπτο και ευπροσάρμοστο στις κινήσεις είναι, 3) ο χρόνος σχηματισμού του φιλμ, ο οποίος πρέπει να είναι σύντομος, 4) οι μηχανικές ιδιότητες του φιλμ, 5) ο καθορισμός της διαπερατότητας των υδρατμών, 6) η Swab μελέτη για να διαπιστωθεί η ικανότητα παραμονής του φιλμ στο δέρμα, 7) η χημική ομοιογένεια του φιλμ, 8) η *in vitro* μελέτη διάχυσης των δραστικών συστατικών στο δέρμα, με τη βοήθεια του κυττάρου Franz, 9) η *ex vivo* μελέτη διαπερατότητας των συστατικών και 10) η μελέτη απορρόφησης των συστατικών από το δέρμα (Kathe & Kathpalia, 2017). Μάλιστα έχει γίνει ήδη προσπάθεια για τη δημιουργία ενός συστήματος σχηματισμού φιλμ *in situ* για τοπική θεραπεία του επιχειλίου έρπητα με συστατικά το άμυλο, τη γλυκερόλη και το εκχύλισμα της *Melissa officinalis* (Rechia *et al.*, 2010).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτοχημική Μελέτη

2.1.1 Συλλογή και ξήρανση των φυτών

Για τους σκοπούς της μελέτης αυτής, το φυτό *Prunella vulgaris* αναγνωρίστηκε και συλλέχθηκε από το Καλλίδρομο όρος από την κα Βαλλανιάτου Ειρήνη και η *Melissa officinalis* αντίστοιχα από το Βοτανικό κήπο στις εγκαταστάσεις της APIVITA το μήνα Οκτώβριο. Το φυτικό υλικό ξηράνθηκε σε ανοιχτό χώρο σκοτεινού δωματίου υπό φυσικές συνθήκες σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2 εβδομάδες.

2.1.2 Προετοιμασία φυτικού υλικού για εκχύλιση

Για το φυτό *Melissa officinalis* χρησιμοποιήθηκε όλο το εναέριο τμήμα περιλαμβάνοντας τα φύλλα και τους μίσχους. Για την *Prunella vulgaris* έγινε διαχωρισμός των εναέριων τμημάτων και των ριζών. Έπειτα και για τα τρία φυτικά υποστρώματα υπήρξε τεμαχισμός και λειοτρίβηση αυτών με ιγδίο με σκοπό τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια μεταξύ αυτών και του συστήματος διαλυτών κατά την εκχύλιση, για καλύτερη απόδοση.

2.1.3 Εκχύλιση με Διαβροχή (Maceration)

Σε γυάλινο περιέκτη ενός κιλού τοποθετήθηκε κλειστό σακόφιλτρο μεγέθους πόρων 100 μm (TecnoLab, Italy) το οποίο περιείχε το φυτικό υλικό σε ποσοστό 2,44% w/w. Χρησιμοποιήθηκε ως φυτικό υπόστρωμα τα εναέρια τμήματα και οι ρίζες της *Prunella vulgaris* καθώς και τα εναέρια τμήματα της *Melissa officinalis*. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν νερό και γλυκερίνη (Organic Glycerin, Laboratoires Prod'Hyg) σε ποσοστό H₂O:Γλυκερίνη 60:40 w/w. Προστέθηκαν επίσης το συντηρητικό Microcare SB (μίγμα βενζοϊκού νατρίου και σορβικού καλίου, Thor Personal Care SAS) σε ποσοστό 1,00% w/w και κιτρικό οξύ (Citric acid, Jungbunzlauer, Austria) σε ποσοστό 0,40% w/w, για την ρύθμιση του pH του εκχυλίσματος. Η προσθήκη έγινε με τη σειρά που αναφέρθηκαν. Η μεγαλύτερη ποσότητα γλυκερίνης προστέθηκε στο τέλος της εκχύλισης μετά τις απαραίτητες διηθήσεις. Όλες οι μετρήσεις ποσοτήτων σε αυτό το τμήμα αλλά και σε όσα έπονται πραγματοποιήθηκαν με ζυγό ακριβείας (KERN 770). Ο γυάλινος περιέκτης κλείστηκε και έγινε ανακίνηση μέχρι την πλήρη διαβροχή του φυτικού υλικού. Τοποθετήθηκε σε σκοτεινό μέρος για μια εβδομάδα ενώ γινόταν καθημερινές ανακινήσεις. Μετά το πέρας της διαδικασίας τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν διαδοχικά από φίλτρα Whatman (Ashless hardened fine crystalline, circles 70 mm μεγέθους πόρων 8-12 μm, 3-5 μm, 1-2 μm, 0,45 μm, K&R, Germany) και έπειτα προστέθηκε και η τελική ποσότητα γλυκερίνης. Ποσότητα των εκχυλισμάτων αυτών τοποθετήθηκε σε καραμελέ PET συσκευασίες για μελέτη της σταθερότητάς τους η οποία θα αναλυθεί παρακάτω.

2.1.4 Εκχύλιση με Υπερήχους

Σε falcons των 50 mL τοποθετήθηκε φυτικό υλικό σε ποσοστό 10% από τα εναέρια τμήματα της *Melissa officinalis* καθώς και από τα εναέρια τμήματα και τις ρίζες της *Prunella vulgaris*. Προστέθηκαν το νερό και η γλυκερίνη σε ποσοστό H₂O:Γλυκερίνη 60:40 w/w, το συντηρητικό Microcare SB και το κιτρικό οξύ σε ποσοστό 1,00% w/w και 0,40% w/w αντίστοιχα. Αφού έγινε καλή ανακίνηση, τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων (LABSONIC LBS2 - 4,5 Lt, FALC, Italy) για 40 λεπτά. Έπειτα διηθήθηκαν απευθείας από φίλτρο 0,45 μm διαμέτρου πόρων (MCE, SARTORIUS, Germany) και προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα γλυκερίνης. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για ποσοστό φυτικού υλικού 20%. Τα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν ως προς τη κυτταροτοξικότητά τους και ήταν αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στη φυτοχημική μελέτη.

2.1.5 Έλεγχος σταθερότητας υδατο-γλυκερινικών εκχυλισμάτων

Την διαδικασία της εκχύλισης ακολούθησε ο έλεγχος σταθερότητας των εκχυλισμάτων ο οποίος ολοκληρώθηκε σε εύρος οκτώ εβδομάδων. Σκοπός της μελέτης αυτής είναι ο έλεγχος συγκεκριμένων παραμέτρων των εκχυλισμάτων και η σύγκρισή τους με τις αρχικές τιμές ώστε να εκτιμηθεί η πιθανή αλλοίωση υπό διαφορετικές συνθήκες. Για το σκοπό αυτό, ποσότητα γύρω στα 50 mL τοποθετείται σε καραμελέ PET συσκευασία (των 75 mL) και αποθηκεύεται στις εξής συνθήκες: 1) θερμοκρασία 5-7°C 2) θερμοκρασία δωματίου, 25 °C, στο σκοτάδι 3) θερμοκρασία 38 °C και 4) θερμοκρασία δωματίου σε UV ακτινοβολία.

Τα χαρακτηριστικά που καταγράφονται για όλες τις συνθήκες είναι τα εξής: 1) χρώμα, 2) οσμή, 3) pH, η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή pH SevenCompact™, pH/Ion S220 (Mettler Toledo Inc., Switzerland), 4) βαθμός διάθλασης, η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή μέτρησης δείκτη διάθλασης (Refractometer, RX-5000^a, ATAGO CO Ltd, Japan), 5) πυκνότητα με τη χρήση της συσκευής μέτρησης πυκνότητας (DMA 38, ANTON PAAR GmbH, Austria), 6) αντιρριζική ικανότητα, 7) ολικό φαινολικό περιεχόμενο, 8) κυτταροτοξικότητα, 9) μικροβιολογικός έλεγχος. Όλα τα παραπάνω ελέγχθηκαν με συγκεκριμένη περιοδικότητα μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα η οποία φαίνεται παρακάτω:

Πίνακας 2. Διακρίνονται όλες οι παράμετροι που ελέγχονται κάθε εβδομάδα.

Χρόνος	Παράμετροι
T=0	Χρώμα, Οσμή, pH, Βαθμός διάθλασης, Πυκνότητα, Αντιρριζική ικανότητα, Ολικό φαινολικό περιεχόμενο, Μικροβιολογικός έλεγχος
1 ^η , 2 ^η , 3 ^η εβδομάδα	Χρώμα, Οσμή, pH, Βαθμός διάθλασης
4 ^η εβδομάδα	Χρώμα, Οσμή, pH, Βαθμός διάθλασης, Πυκνότητα, Κυτταροτοξικότητα, Μικροβιολογικός έλεγχος
8 ^η εβδομάδα	Χρώμα, Οσμή, pH, Βαθμός διάθλασης, Πυκνότητα, Αντιρριζική ικανότητα, Ολικό φαινολικό περιεχόμενο, Μικροβιολογικός έλεγχος

2.1.6 Φωτομετρικοί προσδιορισμοί υδατο-γλυκερινικών εκχυλισμάτων

2.1.6.I Προσδιορισμός του συνολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Η πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού περιεχομένου η οποία ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Σε erpendorfs των 2 mL τοποθετήθηκαν 1580 μ L απεσταγμένου νερού, 20 μ L εκχυλίσματος και 100 μ L αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu [Phenol reagent (Merck) (FCPr)].
2. Ακολούθησε ανάδευση.
3. Μετά από ένα λεπτό προστέθηκαν 300 μ L κορεσμένου διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3 20% w/v) και το μίγμα ανακινήθηκε στον αναδευτήρα Vortex (VELD Scientifica).
4. Τα erpendorfs τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 120 λεπτά.
5. Για τον προσδιορισμό δύο τυφλών δειγμάτων το εκχύλισμα αντικαταστάθηκε από μεθανόλη.
6. Το προϊόν της αντίδρασης φωτομετρήθηκε στα 750 nm με φασματοφωτόμετρο UV-VIS διπλής δέσμης τύπου UV-1800 (Shimadzu Europa).

Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές.

2.1.6.II Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών βασιζόμενη στη δέσμευση της 1,1-διαφαινυλο-2-πικρυλο-υδραζυλο ελεύθερης ρίζας DPPH

Για την εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης των ελευθέρων ριζών ακολουθήθηκε η εξής πειραματική διαδικασία:

1. Σε erpendorfs των 2 mL τοποθετήθηκαν 50 μ L δείγματος και έπειτα 1950 μ L διαλύματος DPPH' (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, 100 μ M σε MeOH).
2. Ακολούθησε ανάδευση στο Vortex.
3. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 30 λεπτά στο σκοτάδι ώστε να αντιδράσουν.
4. Πραγματοποιήθηκε η φωτομέτρηση στα 515 nm με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου
5. Για την παρασκευή των τυφλών δειγμάτων το δείγμα αντικαταστάθηκε από μεθανόλη.

Κάθε μέτρηση επαναλήφθηκε τρεις φορές.

2.1.6.III Εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο βρωμιούχου άλατος 3-(4,5-διμεθυλθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζόλιου MTT

Τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων ήταν τα εξής:

1. Χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές καλλιέργειες Primary Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF), Lonza CloneticsTM (LonzaWalkersville, USA). Τα κύτταρα

- αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υλικό FGM™-2 SingleQuot™ Kit το οποίο περιλαμβάνει: FBS, rhFGF-β, GA (gentamycin-amfotericin), Insulin.
2. Για τα προσκολλημένα κύτταρα, γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και αντικατάσταση αυτού με 100 µL φρέσκου.
 3. Έγινε προσθήκη 10 µL από το διάλυμα 12 mM MTT (invitrogen, Thermo Fischer Scientific) (το οποίο έχει προηγουμένως διαλυθεί σε 1 mL PBS, pH 7,2, 1×, Gibco) σε κάθε πηγάδι του plate. Ετοιμάστηκε και το negative control το οποίο περιείχε 10 µL του stock διαλύματος του MTT και 100 µL θρεπτικού μέσου.
 4. Έγινε επώαση στους 37°C για 4 ώρες.
 5. Έπειτα από την προσθήκη του MTT στα κύτταρα, αφαιρέθηκε όλο εκτός από 25 µL θρεπτικού μέσου από κάθε πηγάδι. Για τα μη προσκολλημένα κύτταρα έγινε πρώτα φυγοκέντρηση ώστε αυτά να καθιζάνουν.
 6. Προστέθηκαν 50 µL DMSO (life Technologies, Thermo Fischer Scientific, North America) σε κάθε πηγάδι και πραγματοποιήθηκε καλή ανάμιξη με μια πιπέτα.
 7. Έγινε επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.
 8. Πραγματοποιήθηκε ανάμιξη κάθε δείγματος και τέλος έγινε μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm με τη συσκευή Infinite® 200 PRO NanoQuant Multimode Microplate Reader (Tecan Trading AG).

2.1.7 Απομάκρυνση της γλυκερόλης με τη μέθοδο της Εκχύλισης Στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας για την επεξεργασία των δειγμάτων με τη μέθοδο SPE για την απομάκρυνση της γλυκερόλης ήταν τα παρακάτω:

1. Προετοιμασία των δειγμάτων: σε 1 g από τα υδατο-γλυκερινικά εκχυλίσματα των εναέριων τμημάτων του φυτού *Melissa officinalis* και των εναέριων τμημάτων καθώς και των ριζών του φυτού *Prunella vulgaris*, περιεκτικότητας 2,44%, 10% και 20% σε φυτικό υπόστρωμα το καθένα, προστέθηκαν 4 mL νερού, αναδεύτηκαν στο Vortex και φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά. Συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο.
2. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Visiprep™ SPE Vacuum Manifold, SUPELCO, Sigma-Aldrich, 12-port model και τα στηλάκια Cartridge 2g.
3. Ενεργοποίηση των στηλών (Washing/Conditioning): αρχικά διήλθαν από τα στηλάκια 5 mL αιθανόλης και έπειτα 5 mL νερού. Απόρριψη του εκλούματος.
4. Φόρτωση του δείγματος (Loading): φόρτωση των υπερκείμενων των δειγμάτων. Ο ρυθμός ροής ρυθμίζεται στις 1-2 σταγόνες ανά δευτερόλεπτο.
5. Έκπλυση (Washing): γίνεται έκπλυση με 10 mL νερού. Απόρριψη του εκλούματος.
6. Έκλουση (Elution): έκλουση με 4 mL αιθανόλης. Αυτή τη φορά το παραγόμενο έκλουμα είναι το επιθυμητό και συλλέγεται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με άλλα 5 mL αιθανόλης και τα προϊόντα συνενώνονται.

2.1.8 Ποιοτικός και ποσοτικός φυτοχημικός προσδιορισμός των φυτικών υποστρωμάτων με τη Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Λεπτής Στιβάδας (HPTLC)

Για την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (High Performance Thin Layer Chromatography-HPTLC) χρησιμοποιήθηκε το σύστημα της Camag (Camag, Muttenz, Switzerland) το οποίο αποτελείται από το Linomat 5 για την αυτόματη τοποθέτηση των δειγμάτων στην πλάκα, τον αυτόματο θάλαμο ανάπτυξης Camag Automatic Developing Chamber 2 (ADC 2), τον TLC Visualizer 2 για την οπτικοποίηση των πλακών, την αξιολόγηση και την επεξεργασία τους, η λειτουργία του οποίου υποστηρίχθηκε από το λογισμικό visionCATS και το plate heater για την περίπτωση ψεκασμού με θειική βανιλίνη. Οι πλάκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι γυάλινες TLC plates Silica gel 60 F254, 10×20cm, Merck, Germany.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: Θειική βανιλίνη: (Vanillin/MeOH: 5/95 w/v, H₂SO₄/MeOH 5/95 v/v), Βανιλίνη: 99%, Alfa Aesar GmbH & Co, Germany, Θειικό οξύ: (>95), Analytical reagent grade (Fisher Scientific, Loughborough, UK), Φορμικό οξύ: 99% RPE, For analysis - ACS - Reag. Ph.Eur. - Reag. USP 1, (Carlo Erba reagents S.A.S., France), Οξικός αιθυλεστέρας: Analytical reagent grade, (Fisher Scientific, Loughborough, UK), Μεθανόλη: UHPLC Supergradient ACS, PanReac AppliChem ITW Reagents, Germany, Μεθανόλη: (Reag. Ph. Eur.) for analysis, ACS, ISO, PanReac AppliChem ITW Reagents, Germany, Διχλωρομεθάνιο: Analytical reagent grade, (Fisher Scientific, Loughborough, UK).

Ως πρότυπες ουσίες χρησιμοποιήθηκαν: ροσμαρινικό οξύ: ≥98% (HPLC), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), καφεϊκό οξύ: ≥99% (HPLC), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), ρ-κουμαρικό οξύ: ≥98% (HPLC), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), χλωρογενικό οξύ: ≥95% (titration), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), τριυδρική ρουτίνη: analytical standard (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), φερουλικό οξύ: pharmaceutical Secondary Standard (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), ουρσολικό οξύ: ≥90% (HPLC), (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), κερσετίνη: (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

2.1.8.1 Ποσοτικός προσδιορισμός ροσμαρινικού, καφεϊκού και ρ-κουμαρικού οξέος στην *Melissa officinalis*

Η ποσοτικοποίηση του ροσμαρινικού οξέος, του καφεϊκού και του ρ-κουμαρικού στην *Melissa officinalis* πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια των αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς. Για την δημιουργία αυτών χρησιμοποιήθηκαν διάφορες ποσότητες ροσμαρινικού, καφεϊκού και του ρ-κουμαρικού οξέος. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Παρασκευάστηκαν stock διαλύματα καθαρού ροσμαρινικού, καφεϊκού και ρ-κουμαρικού οξέος αντίστοιχα σε συγκεντρώσεως 10 mg/mL σε MeOH το καθένα.
2. Με τη χρήση του Linomat 5 και με σύριγγα των 100 μL τοποθετήθηκαν 6 κηλίδες του ροσμαρινικού οξέος ίσης ποσότητας και διαφορετικής περιεκτικότητας σε απόσταση 2 mm η μία από την άλλη πάνω στην πλάκα

TLC, αντίστοιχα 6 κηλίδες διαλύματος καθαρού καφεϊκού οξέος και 5 κηλίδες *p*-κουμαρικού. Για κάθε πρότυπη ουσία χρησιμοποιήθηκε ξεχωριστή πλάκα. Για μεγαλύτερη ακρίβεια κάποιες από τις κηλίδες τοποθετήθηκαν σε δύο επαναλήψεις και κάποιες σε τρεις.

3. Η κάθε πλάκα έπειτα τοποθετήθηκε στο CAMAG Automatic Developing Chamber 2 (ADC 2) ώστε να αναπτυχθεί στον κορεσμένο από το σύστημα διαλυτών της κινητής φάσης θάλαμο ανάπτυξης και έπειτα να εξατμιστεί ο διαλύτης ώστε να παραληφθεί. Να σημειωθεί πως το σύστημα διαλυτών που επιλέχθηκε για την ανάπτυξη της πλάκας του ροσμαρινικού οξέος ήταν το EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 50:10:7:1 v/v ενώ για την ανάπτυξη της πλάκας του καφεϊκού και του *p*-κουμαρικού οξέος χρησιμοποιήθηκε το DCM:MeOH:H₂O σε αναλογία 70:30:4 v/v.
4. Έπειτα από την παραλαβή των ανεπτυγμένων πλέον πλακών, τοποθετήθηκαν μεμονωμένα στο TLC Visualizer 2 για να παρατηρηθούν και να φωτογραφηθούν στα 254 και 366 nm.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε για το εκχύλισμα της *Melissa officinalis*, με περιεκτικότητα φυτικού υποστρώματος 10%. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες 8, 10, 12 και 14 μ L για το σύστημα διαλυτών EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 50:10:7:1 v/v και 10, 12, 15, 18, 20, 25 μ L για το σύστημα διαλυτών DCM:MeOH:H₂O σε αναλογία 70:30:4 v/v. Το εκχύλισμα αυτό ήταν κατάλληλα επεξεργασμένο με τη SPE και η περιεκτικότητά του είχε ρυθμιστεί στα 10 mg/mL.

2.1.8.II Ποιοτική ανίχνευση βιοδραστικών ουσιών στο φυτό *Prunella vulgaris*

Πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανίχνευση στο φυτό *Prunella vulgaris* των παρακάτω βιοδραστικών ουσιών: ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, *p*-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, ουρσολικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, κερσετίνη και ρουτίνη (Demir *et al.*, 2011).

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τον ποιοτικό προσδιορισμό ήταν τα εξής:

1. Ετοιμάστηκαν stock διαλύματα σε περιεκτικότητα 10 mg/mL από τις καθαρές ουσίες: ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, *p*-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, ουρσολικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, κερσετίνη και ρουτίνη.
2. Τα εκχυλίσματα των εναέριων τμημάτων και των ριζών του φυτού *Prunella vulgaris*, με περιεκτικότητα φυτικού υποστρώματος 10% και 20%, που χρησιμοποιήθηκαν είχαν επεξεργαστεί προηγουμένως καταλλήλως με την SPE ώστε να απομακρυνθεί η γλυκερίνη ενώ έπειτα αφέθηκαν να ξηρανθούν με σκοπό να ρυθμιστεί η περιεκτικότητά τους σε 1 mg/mL.
3. 4 μ L από τα stock διαλύματα των καθαρών ουσιών όπως και 10 και 15 μ L από το εκχύλισμα της *Prunella vulgaris* 10%, εναέριων τμημάτων και ριζών και αντίστοιχα 10 μ L από το εκχύλισμα 20% τοποθετήθηκαν σε πλάκα TLC με το Linomat 5. Η διαδικασία επαναλήφθηκε ώστε να δημιουργηθούν δύο όμοιες πλάκες για να αναπτυχθούν σε διαφορετικούς διαλύτες.
4. Η κάθε πλάκα έπειτα τοποθετήθηκε στο CAMAG Automatic Developing Chamber 2 (ADC 2) ώστε να αναπτυχθεί στον κορεσμένο από το σύστημα διαλυτών της κινητής φάσης θάλαμο ανάπτυξης και έπειτα να εξατμιστεί ο διαλύτης και να παραληφθεί. Το ένα σύστημα διαλυτών για την κινητή φάση

ήταν DCM:MeOH:H₂O σε 70:30:4 v/v και το άλλο ήταν EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε 50:10:7:1 v/v.

5. Έπειτα από την παραλαβή της ανεπτυγμένης πλέον πλάκας, τοποθετήθηκε στο TLC Visualizer 2 για να παρατηρηθεί και να φωτογραφηθεί στα 254 και 366 nm.
6. Τέλος η κάθε πλάκα ψεκάστηκε με διάλυμα θειικής βανιλίνης και έπειτα θερμάνθηκε στην ειδική πλάκα. Τέλος παρατηρήθηκε και φωτογραφήθηκε στο ορατό.

2.1.9 Προσδιορισμός συνολικού περιεχομένου υδατανθράκων του φυτού *Prunella vulgaris* με τη μέθοδο της Φαινόλης και του Θειικού οξέος (Phenol-sulfuric acid assay)

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Προστέθηκαν 50 μL γλυκόζης [(D-(+)-Glucose 95% (GC), Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)] ,σε διαδοχικές αραιώσεις από το αρχικό διάλυμα, καθώς και ίδια ποσότητα από τα εκχυλίσματα των εναέριων τμημάτων αλλά και των ριζών της *Prunella vulgaris* (περιεκτικότητας φυτικού υποστρώματος 10% και 20%) σε συγκεντρώσεις 0,25, 0,5 και 1,0 mg/mL σε 96 well plate.
2. Προστέθηκαν 150 μL πυκνού θειικού οξέος [H₂SO₄, (>95), Analytical reagent grade (Fisher Scientific, Loughborough, UK)] σε κάθε πηγάδι και έπειτα πραγματοποιήθηκε ανάδευση.
3. Προστέθηκαν 30 μL από υδατικό διάλυμα φαινόλης 5% w/v (Phenol for molecular Biology, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).
4. Το plate αποθηκεύτηκε στο σκοτάδι για 10 λεπτά και έπειτα μετρήθηκε η απορρόφηση στα 490 nm με τη βοήθεια της συσκευής Infinite® 200 PRO NanoQuant Multimode Microplate Reader (Tecan Trading AG).

2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΡΦΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΝΤΙΕΡΠΗΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

2.2.1 Δοκιμές διάλυσης της χιτοζάνης σε ασκορβικό, οξικό και γαλακτικό οξύ

Η χιτοζάνη είναι υδατο-διαλύτη μόνο σε pH κάτω από 6 (Sogias *et al.*, 2010). Ανάμεσα στους πιο κοινά χρησιμοποιούμενους διαλύτες για τη διάλυση της χιτοζάνης είναι το υδατικό διάλυμα οξικού οξέος και γαλακτικού οξέος ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και φυσικά οργανικά οξέα όπως το ασκορβικό οξύ (Romanazzi *et al.*, 2009) (Chen *et al.*, 2007). Στην παρούσα εργασία έγιναν προσπάθειες διάλυσης της χιτοζάνης, [chitosan Medium weight (190-310 kDa), 75-85% deacetylated, (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)] σε ασκορβικό οξύ (PENTA, Czech Republic), οξικό, [acetic acid glacial, Laboratory reagent grade, (Fisher Scientific, Loughborough, UK)] και γαλακτικό οξύ, (90%, Galactic, Belgium).

2.2.2 Δοκιμές μορφοποίησης του αντιερπητικού προϊόντος και έλεγχος σταθερότητας των προϊόντων μορφοποίησης

Έπειτα από εκτενή βιβλιογραφική έρευνα σχετικά με τη δημιουργία फिल्म χιτοζάνης τα οποία ενσωμάτωναν φυσικά προϊόντα (Siripatrawan *et al.*, 2016) (Zivanovic *et al.*, 2005) (Siripatrawan *et al.*, 2012) (Siripatrawan *et al.*, 2010) (Wu *et al.*, 2015) (Moradi *et al.*, 2012) (Altiok *et al.*, 2010) πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για έξι διαφορετικές συνταγές με ανάλογες τροποποιήσεις ενώ τα προκύπτοντα προϊόντα ελέγχθηκαν σε ένα πρώτο επίπεδο όσον αφορά τη σταθερότητά τους.

Δοκιμή 1^η (CS-ALL 1)

Παρασκευάστηκαν 250 mL 2% v/v υδατικού διαλύματος οξικού οξέος και προστέθηκε 2% w/w χιτοζάνη για ολονύκτια ανάδευση σε πλάκα με μαγνητικό αναδευτήρα IKA labortechnik RCT basic, (Staufen Germany). Ακολούθησε φιλτράρισμα από φίλτρο με διάμετρο πόρων 8-10 μm με κενό Buchner. Το pH βρέθηκε στα 4,66 και το ιξώδες [το οποίο μετρήθηκε στις συνθήκες: 0,6 rpm, 21 spindle και θερμοκρασία στους 22°C, (Chen *et al.*, 2007)] βρέθηκε 1750 cp στο 2,1%. Το τζελ τοποθετήθηκε στο Silverson (L5M-A Laboratory Mixer), και προστέθηκε γλυκερόλη (σε ποσότητα 0,5 mL ανά g χιτοζάνης) (Moradi *et al.*, 2012). Έπειτα προστέθηκαν 20% w/v υδατο-γλυκερινικού εκχυλίσματος της *Melissa officinalis*, της *Prunella vulgaris* και του βάμματος πρόπολης (APIVITA PROPOLIS, alcohol > 85%) (σε αναλογία 1:1:1) (Siripatrawan *et al.*, 2010)(Siripatrawan *et al.*, 2012). Τέλος προστέθηκε το αιθέριο έλαιο του *Thymus vulgaris*, (Bio Hellas) σε ποσότητα 5 g/l (Moradi *et al.*, 2012). Τελευταίο βήμα ήταν η ρύθμιση του pH του τελικού προϊόντος σε 5,00 με NaOH 0,1 M.

Η τελική ποσότητα διαχωρίστηκε σε έξι ποσότητες των 30 mL περίπου και η καθεμιά τοποθετήθηκε σε γυάλινα διάφανα βαζάκια stability με σκοπό να μελετηθεί η συμπεριφορά του περιεχομένου για τέσσερις βδομάδες στις εξής θερμοκρασίες: RT, UV, 5-7°C, 38 °C, 45 °C και 50 °C. Ο έλεγχος των παραμέτρων, οι οποίες διαφαίνονται στο παρακάτω πίνακα γινόταν σε εβδομαδιαία βάση. Να σημειωθεί πως ταυτόχρονα γινόταν έλεγχος της ικανότητας σχηματισμού फिल्म και παρατήρησης των αντίστοιχων फिल्म πάνω σε parafilm καθώς και του χρόνου που απαιτείται ενώ επίσης μελετήθηκε η δομή του τζελ και του σχηματιζόμενου फिल्म με μικροσκόπιο (OPTICA MICROSCOPE B-353A, Italy Ponteranica). Το ιξώδες μετρήθηκε με τη βοήθεια συσκευής μέτρησης ιξώδους [BROOKFIELD DV-II+ Pro viscometer, USA μαζί με κυκλοφορητή/θερμοστάτη (Umwälzthermostat) PT31, KRÜSS Optronic, Germany].

Πίνακας 3. Παράμετροι που μελετώνται για το χαρακτηρισμό της σταθερότητας του προϊόντος κάθε εβδομάδα.

Εβδομάδα	Παράμετροι που ελέγχονται
1 ^η	Εμφάνιση, Χρώμα, Οσμή, pH, Ιξώδες, Αντιρριζική ικανότητα, Φαινολικό περιεχόμενο
2 ^η	Εμφάνιση, Χρώμα, Οσμή, pH
3 ^η	Εμφάνιση, Χρώμα, Οσμή, pH
4 ^η	Εμφάνιση, Χρώμα, Οσμή, pH, Ιξώδες, Αντιρριζική ικανότητα, Φαινολικό περιεχόμενο

Δοκιμή 2^η (CS-ALL 2)

Παρασκευάστηκαν 250 mL 2% w/w χιτοζάνης σε 2% v/v υδατικό διάλυμα οξικού οξέος. Έπειτα ακολούθησε προσθήκη των υπόλοιπων συστατικών στις ίδιες ποσότητες με την δοκιμή CS-ALL 1. Σε αυτή τη δοκιμή προστέθηκε ο αποσμητής Sinodor σε ποσοστό 0,2% w/w. Εδώ δεν υπήρξε ρύθμιση του pH. Ακολούθησε μελέτη σταθερότητας ακολουθώντας ακριβώς την ίδια διαδικασία με την πρώτη δοκιμή.

Δοκιμή 3^η (CS-ALL 3)

Παρασκευάστηκαν 250 mL 2% w/w χιτοζάνης σε 2% v/v υδατικό διάλυμα οξικού οξέος. Έπειτα ακολούθησε προσθήκη γλυκερόλης (σε ποσότητα 0,5 mL ανά g χιτοζάνης)(Moradi *et al.*, 2012), της πρόπολης και των υδατο-γλυκερινικών εκχυλισμάτων της *Melissa officinalis* και της *Prunella vulgaris* (σε συνολική ποσότητα 10 g/l με αναλογία 1:1:1) (Moradi *et al.*, 2012) σε συμπυκνωμένη μορφή έπειτα από τη χρήση του Rotavapor (R-100, BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland).

Δοκιμή 4^η (CS-ALL 4)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής (Oh *et al.*, 2017): ανάμιξη νερού με αιθανόλη (99% denaturated with 1% MEK pure, PanReac AppliChem ITW Reagents, Germany) σε μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 10 λεπτά. Προσθήκη της χιτοζάνης και ανάμιξη στο Silverson για 30 λεπτά μέχρι την ισοκατανομή και τη διάτμησή της στα 700 rpm. Προσθήκη οξικού οξέος και ανάδευση για 1 ώρα στα 2300-3000 rpm. Μετά το πέρας του χρόνου γίνεται οπτικός έλεγχος για τη διάλυση της χιτοζάνης. Προσθήκη της προπύλενο-γλυκόλης [propylene glycol (Roumboulakis S.A.)]. Ανάμιξη για 15 λεπτά. Προσθήκη της πρόπολης και έπειτα των δυο εκχυλισμάτων, σε ποσότητα 2,5 g το καθένα σε συμπυκνωμένη μορφή. Προσθήκη αιθέριου ελαίου *Thymus vulgaris* και ανάδευση για τουλάχιστον 2 ώρες. Ακολούθησε μελέτη σταθερότητας ίδια με τις προηγούμενες. Τα ποσοστά και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον **Πίνακας 4**.

Πίνακας 4. Διακρίνονται τα ποσοστά των συστατικών της σύνθεσης και οι αντίστοιχες χρησιμοποιούμενες ποσότητες για το CS-ALL 4.

Συστατικά	% w/w	Βάρος (g)
Υπερκάθαρο νερό	43,7	109,25
Αιθανόλη	40	100
Χιτοζάνη	3	7,5
Οξικό οξύ	8	20
Προπυλενο-γλυκόλη	2	5
Συνολική ποσότητα δραστικών (<i>M.officinalis</i> : <i>P.vulgaris</i> :πρόπολη 1:1:1)	3	7,5
Αιθέριο έλαιο <i>T.vulgaris</i>	0,3	0,75
Σύνολο	100	250

Δοκιμή 5^η (CS-ALL 5)

Η πέμπτη δοκιμή αποτέλεσε μια ελαφρά παραλλαγή της προηγούμενης. Τα βήματα και οι χρόνοι διατηρήθηκαν. Το ποσοστό του οξέος μειώθηκε και του αιθέριου ελαίου αυξήθηκε. Ακολούθησε και πάλι η ίδια μελέτη σταθερότητας ενώ τα ποσοστά και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον **Πίνακας 5**.

Πίνακας 5. Διακρίνονται τα ποσοστά των συστατικών της σύνθεσης και οι αντίστοιχες χρησιμοποιούμενες ποσότητες για το CS-ALL 5.

Συστατικά	% w/w	Βάρος (g)
Υπερκάθαρο νερό	47,5	118,75
Αιθανόλη	40	100
Χιτοζάνη	3	7,5
Οξικό οξύ	4	10
Προπυλενο-γλυκόλη	2	5
Συνολική ποσότητα δραστικών (<i>M.officinalis</i> : <i>P.vulgaris</i> : πρόπολη 1:1:1)	3	7,5
Αιθέριο έλαιο <i>T.vulgaris</i>	0,5	1,25
Σύνολο	100	250

Δοκιμή 6^η (CS-ALL 6)

Στη δοκιμή αυτή το οξικό οξύ αντικαταστάθηκε από το γαλακτικό οξύ και η προπυλενο-γλυκόλη από την 1,3-προπανεδιόλη (1,3-propanediol, Zemea, BIO). Η σύσταση, οι χρόνοι, τα βήματα της διαδικασίας καθώς και η μελέτη σταθερότητας διατηρήθηκαν. Χρησιμοποιήθηκε επιπλέον το αιθέριο έλαιο μέντας (*Mentha piperita*, Fytosan, France). Παρακάτω, στον **Πίνακας 6**, συνοψίζονται τα συστατικά και οι αναλογίες τους.

Πίνακας 6. Διακρίνονται τα ποσοστά των συστατικών της σύνθεσης και οι αντίστοιχες χρησιμοποιούμενες ποσότητες για το CS-ALL 6.

Συστατικά	% w/w	Βάρος (g)
Υπερκάθαρο νερό	47,5	118,75
Αιθανόλη	40	100
Χιτοζάνη	3	7,5
Γαλακτικό οξύ	4	10
1,3 - προπανεδιόλη	2	5
Συνολική ποσότητα δραστικών (<i>M.officinalis</i> : <i>P.vulgaris</i> : πρόπολη 1:1:1)	3	7,5
Αιθέριο έλαιο <i>T.vulgaris</i>	0,35	0,875
Αιθέριο έλαιο <i>M.piperita</i>	0,15	0,375
Σύνολο	100	250

Επειδή η έκτη δοκιμή, CS-ALL 6, αποδείχτηκε η πιο πολλά υποσχόμενη πραγματοποιήθηκε επίσης κυτταροτοξική μελέτη.

2.3 Στατιστική ανάλυση και άντληση οικονομικών δεδομένων

Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (SD). Για την στατιστική ανάλυση εφαρμόστηκε η ανάλυση one-way analysis ANOVA με τη χρήση του αλγορίθμου Tukey, με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. Για την στατιστική επεξεργασία και την κατασκευή των γραφημάτων έγινε η χρήση του λογισμικού SigmaPlot™ (Systat Software, Version 14.0).

Η επεξεργασία των διαγραμμάτων έγινε με τη χρήση του Excel 2016 και του GraphPad Prism 8.0.2 (263).

Τα οικονομικά στοιχεία που ενσωματώθηκαν στην οικονομική ανάλυση της παρούσας μελέτης αντλήθηκαν από πληροφορίες ανάλογων προϊόντων μέσω του Enterprise Resource Planning (ERP) της APIVITA καθώς και από τα τμήματα προμηθειών και marketing.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Φυτοχημική μελέτη

3.1.1 Εκτίμηση σταθερότητας των υδατο-γλυκερινικών εκχυλισμάτων της *Melissa officinalis* και της *Prunella vulgaris* που προήλθαν από εκχύλιση με διαβροχή

Το εκχύλισμα των εναέριων τμημάτων της *Melissa officinalis* και τα εκχυλίσματα των εναέριων τμημάτων και των ριζών της *Prunella vulgaris*, με ποσοστό φυτικού υποστρώματος 2,44%, εκτιμήθηκαν όσον αφορά την σταθερότητά τους σε διαφορετικές συνθήκες. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πίνακες που συνοψίζουν τις παραμέτρους οι οποίες καταγράφηκαν στο διάστημα των οκτώ εβδομάδων και βάση των οποίων κρίνεται η σταθερότητα των μελετώμενων εκχυλισμάτων. Τα αποτελέσματα καταγράφονται με τη βοήθεια της κλίμακας 1-9, όπου το 1 αντιπροσωπεύει τη μέγιστη μεταβολή και αλλοίωση των χαρακτηριστικών σε σύγκριση με τις αρχικές μετρήσεις και το 9 αντιπροσωπεύει τη μηδενική μεταβολή αυτών στο πέρασμα των εβδομάδων.

- ο Εκχύλισμα εναέριων τμημάτων *Melissa officinalis* 2,44%

Αμέσως μετά την παραγωγή του εκχυλίσματος, δηλαδή σε μηδενικό χρόνο ρυθμίστηκε το pH με τη προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας κιτρικού οξέος και προσαρμόστηκε περίπου στο 4, όπως και στα επόμενα εκχυλίσματα. Πιο συγκεκριμένα η τιμή του ήταν 4,23. Στο πέρασμα των οκτώ εβδομάδων βλέπουμε μικρές διακυμάνσεις οι οποίες όμως θεωρούνται αμελητέες. Αντίστοιχα μετρήθηκε ο δείκτης διάθλασης με τιμή 33,81%. Και πάλι παρατηρούνται διακυμάνσεις οι οποίες βρίσκονται γύρω από το 34% και δεν είναι ικανές ώστε να θεωρηθεί το εκχύλισμα ασταθές. Όσον αφορά το χρώμα, αρχικώς είχε ένα βαθύ μελί το οποίο και διατηρήθηκε, παρατηρώντας μόνο σχετικά μικρή αλλοίωση και πιο συγκεκριμένα αύξηση της έντασης του χρώματος (έγινε πιο σκούρο) κατά την τέταρτη και όγδοη εβδομάδα όταν το εκχύλισμα αποθηκεύτηκε στους 38 °C. Η οσμή, η οποία αρχικώς, σε χρόνο μηδέν, ήταν χαρακτηριστική, μεταβλήθηκε ελάχιστα καθώς εξασθένησε ελαφρώς στα εκχυλίσματα όλων των συνθηκών κατά την όγδοη εβδομάδα. Η πυκνότητα παρέμεινε σχετικά σταθερή γύρω από την αρχική τιμή, 1,1051 g/mL, ενώ η αντιρριζική ικανότητα και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο μειώθηκαν ελαφρώς την όγδοη εβδομάδα σε σύγκριση με την αρχική τιμή. Παρόλα αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν ως σταθερές παράμετροι στο πέρασμα του χρόνου. Το εκχύλισμα, όπως και τα επόμενα, επίσης ελέγχθηκε όσον αφορά το μικροβιολογικό του φορτίο σε TPC (Total Plate Content), Y&M, coliforms, *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* σε χρόνο μηδέν καθώς και την τέταρτη και όγδοη εβδομάδα και κρίθηκαν εντός ορίου προδιαγραφών (TPC και Y&M <10 ενώ δεν ανιχνεύτηκαν τα υπόλοιπα βακτήρια). Το τελικό συμπέρασμα ήταν πως το εκχύλισμα είναι σταθερό και μπορεί να προχωρήσει η ενσωμάτωσή του σε προϊόν.

Πίνακας 7. Συνολική καταγραφή των παραμέτρων στις οποίες στηρίζεται ο χαρακτηρισμός για τη σταθερότητα του εκχυλίσματος των εναέριων τμημάτων της *Melissa officinalis*. Όπου N.T.: Not tested.

Εβδομάδα	Παράμετροι	pH	RI (Brix%)	Χρώμα	Οσμή	Πυκνότητα (g/mL)	DPPH (mM Trolox equiv.)	TPC (mg GA/L)	Μικροβιολογικές αναλύσεις
T=0		4,23	33,81	Του μελιού	Χαρακτηριστική				
						1,1051	6,57	1021	οκ
1η	5-7 °C	4,22	34,17	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,21	34,08	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	4,23	34,07	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,23	34,06	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
2η	5-7 °C	4,26	33,68	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,23	33,72	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	4,21	33,75	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,22	33,66	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
3η	5-7 °C	4,21	33,80	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,21	33,66	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	4,23	33,85	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,22	33,72	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
4η	5-7 °C	4,20	33,80	9	9	1,1053	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,20	33,81	9	9	1,1045	N.T.	N.T.	οκ
	38 °C	4,19	33,96	8	9	1,1019	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,19	33,82	9	9	1,0992	N.T.	N.T.	N.T.
8η	5-7 °C	4,33	33,83	9	8	1,1045	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,29	34,09	9	8	1,1059	6,24	1005	οκ
	38 °C	4,23	34,37	7	8	1,1075	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,21	33,97	9	8	1,1036	N.T.	N.T.	N.T.

ο Εκχύλισμα εναέριων τμημάτων *Prunella vulgaris* 2,44%

Αμέσως μετά την παραγωγή του εκχυλίσματος, δηλαδή σε μηδενικό χρόνο μετρήθηκε το pH το οποίο ήταν στη τιμή 4,28. Στο πέρασμα των οκτώ εβδομάδων βλέπουμε μικρές διακυμάνσεις, από 4,24 μέχρι 4,34, οι οποίες όμως θεωρούνται αμελητέες. Αντίστοιχα μετρήθηκε ο δείκτης διάθλασης με τιμή 32,47% και η διακύμανσή του είναι εξαιρετικά μικρή. Όσον αφορά το χρώμα, αρχικώς προσδιορίζεται ως βαθύ χρώμα του κρασιού, το οποίο και διατηρήθηκε, παρατηρώντας μόνο σχετικά μικρή αλλοίωση και πιο συγκεκριμένα αύξηση της έντασης του χρώματος (έγινε πιο σκούρο) κατά την τέταρτη και όγδοη εβδομάδα όταν το εκχύλισμα αποθηκεύτηκε στους 38 °C. Η οσμή, η οποία αρχικώς, σε χρόνο μηδέν, ήταν χαρακτηριστική, μεταβλήθηκε ελάχιστα καθώς εξασθένησε ελαφρώς στα εκχυλίσματα όλων των συνθηκών κατά την όγδοη εβδομάδα. Η πυκνότητα παρέμεινε σχετικά σταθερή γύρω από την αρχική τιμή 1,0997 g/mL. Όσον αφορά την ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, η πρώτη μειώθηκε ελαφρώς την όγδοη εβδομάδα σε σύγκριση με την αρχική τιμή και το δεύτερο θα μπορούσε να χαρακτηριστεί σχεδόν αμετάβλητο. Το εκχύλισμα επίσης ελέγχθηκε όσον αφορά το μικροβιολογικό του φορτίο σε χρόνο μηδέν καθώς και την τέταρτη και όγδοη εβδομάδα και οι τιμές κρίθηκαν εντός ορίου προδιαγραφών. Το τελικό συμπέρασμα ήταν πως το εκχύλισμα είναι σταθερό και μπορεί να προχωρήσει η ενσωμάτωσή του σε προϊόν.

Πίνακας 8. Συνολική καταγραφή των παραμέτρων στις οποίες στηρίζεται ο χαρακτηρισμός για τη σταθερότητα του εκχυλίσματος των εναέριων τμημάτων της *Prunella vulgaris*. Όπου N.T.: Not tested.

Εβδομάδα	Παράμετροι	pH	RI (Brix%)	Χρώμα	Οσμή	Πυκνότητα (g/mL)	DPPH (mM Trolox)	TPC (mg GAL/L)	Μικροβιολογικές αναλύσεις
T=0		4,28	32,47	Σκούρο του κρασιού /μελιού	Χαρακτηριστική	1,0977	5,47	866	οκ
1η	5-7 °C	4,29	32,46	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,24	32,45	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	4,28	32,54	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,28	32,49	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
2η	5-7 °C	4,32	32,41	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,30	32,41	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	4,32	32,49	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,31	32,46	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
3η	5-7 °C	4,24	32,41	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,25	32,41	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	4,29	32,53	8	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,26	32,41	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
4η	5-7 °C	4,29	32,52	9	9	1,0992	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,32	32,51	9	9	1,0989	N.T.	N.T.	οκ
	38 °C	4,33	32,64	8	9	1,0974	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,33	32,48	9	9	1,0925	N.T.	N.T.	N.T.
8η	5-7 °C	4,29	32,47	9	8	1,1007	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,34	32,81	9	8	1,0996	5,31	864	οκ
	38 °C	4,31	32,78	7	8	1,1013	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,30	32,51	9	8	1,1012	N.T.	N.T.	N.T.

ο Εκχύλισμα ριζών *Prunella vulgaris* 2,44%

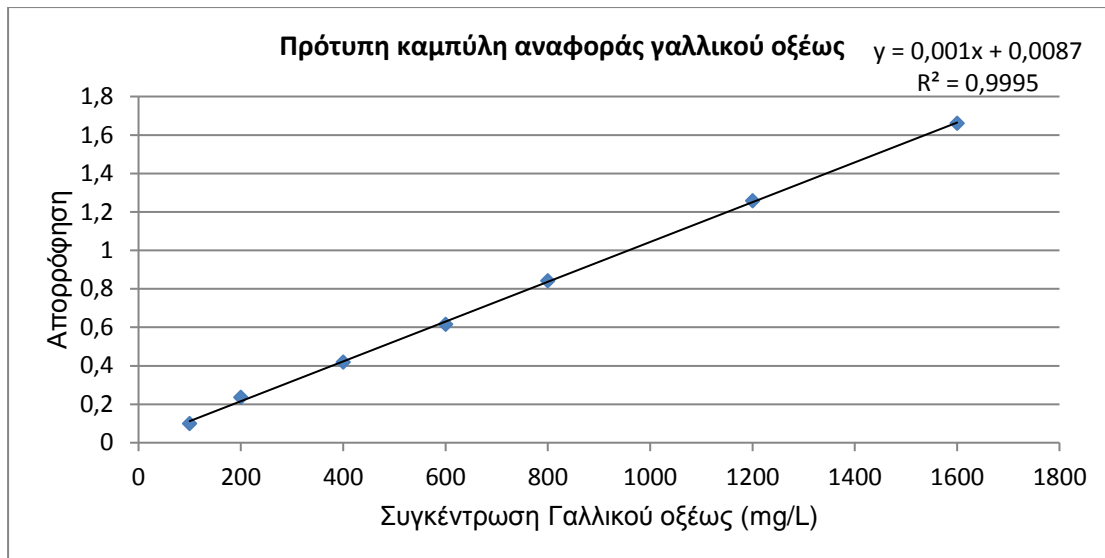
Αμέσως μετά την παραγωγή του εκχυλίσματος, δηλαδή σε μηδενικό χρόνο μετρήθηκε το pH το οποίο ήταν στη τιμή 4,43. Στο πέρασμα των οκτώ εβδομάδων βλέπουμε μικρή μείωση αυτού, από 4,26 μέχρι 4,39, η οποία όμως κρίνεται ελάχιστη. Αντίστοιχα μετρήθηκε ο δείκτης διάθλασης με τιμή 32,48% και η διακύμανσή τους το επόμενο χρονικό διάστημα είναι εξαιρετικά μικρή. Όσον αφορά το χρώμα, αρχικώς προσδιορίζεται ως σκούρο μελί/καφετί, το οποίο και διατηρήθηκε, παρατηρώντας μόνο σχετικά μικρή αλλοίωση και πιο συγκεκριμένα αύξηση της έντασης του χρώματος (έγινε πιο σκούρο) κατά την τέταρτη και όγδοη εβδομάδα όταν το εκχύλισμα αποθηκεύτηκε στους 38 °C. Η οσμή, η οποία αρχικώς, σε χρόνο μηδέν, ήταν χαρακτηριστική, μεταβλήθηκε ελάχιστα καθώς εξασθένησε ελαφρώς στα εκχυλίσματα όλων των συνθηκών κατά την όγδοη εβδομάδα. Η πυκνότητα παρέμεινε σχετικά σταθερή γύρω από την αρχική τιμή 1,1001 g/mL ενώ η αντιριζική ικανότητα και το ολικό φαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) την όγδοη εβδομάδα σε σύγκριση με την αρχική τιμή. Το εκχύλισμα επίσης ελέγχθηκε όσον αφορά το μικροβιολογικό του φορτίο σε χρόνο μηδέν καθώς και την τέταρτη και όγδοη εβδομάδα και οι τιμές κρίθηκαν εντός ορίου προδιαγραφών. Το τελικό εκχύλισμα θα μπορούσε να χαρακτηριστεί σχετικά σταθερό αλλά απαιτείται περαιτέρω μελέτη.

Πίνακας 9. Συνολική καταγραφή των παραμέτρων στις οποίες στηρίζεται ο χαρακτηρισμός για τη σταθερότητα του εκχυλίσματος των ριζών της *Prunella vulgaris*. Όπου N.T.: Not tested.

Εβδομάδα	Παράμετροι	pH	RI (Brix%)	Χρώμα	Οσμή	Πυκνότητα (g/mL)	DPPH (mM Trolox)	TPC (mg GAL/L)	Μικροβιολογικές αναλύσεις
T=0		4,43	32,48	Σκούρο του μελιού /καφετί	Χαρακτηριστική	1,1001	6,72	1143	οκ
1η	5-7 °C	4,33	32,49	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,26	32,46	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	4,30	32,49	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,33	32,49	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
2η	5-7 °C	4,37	32,41	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,37	32,43	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	4,39	32,52	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,38	32,42	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
3η	5-7 °C	4,26	32,39	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,29	32,42	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	4,27	32,53	8	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,25	32,41	9	9	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
4η	5-7 °C	4,34	32,51	9	9	1,0992	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,36	32,52	9	9	1,0967	N.T.	N.T.	οκ
	38 °C	4,37	32,69	8	9	1,0981	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,34	32,55	9	9	1,0957	N.T.	N.T.	N.T.
8η	5-7 °C	4,3	32,44	9	8	1,0993	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	4,39	32,99	9	8	1,1026	6,28	1013	οκ
	38 °C	4,34	32,80	7	8	1,1005	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	4,32	32,48	9	8	1,1004	N.T.	N.T.	N.T.

3.1.2 Εκτίμηση ολικού φαινολικού περιεχομένου (TPC) των υδατο-γλυκερινικών εκχυλισμάτων της *Melissa officinalis* και της *Prunella vulgaris* που προήλθαν από εκχύλιση με διαβροχή

Η συγκέντρωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου στα δείγματα υπολογίζεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς γαλλικού οξέος και εκφράζεται ως ισοδύναμο γαλλικού οξέος. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς δημιουργείται από τις μετρήσεις της απορρόφησης στα 750 nm γνωστών συγκεντρώσεων γαλλικού οξέος, οι οποίες προκύπτουν με διαδοχικές αραιώσεις από το αρχικό διάλυμα. Προκύπτει έτσι η συνάρτηση (1) $y=0,001x+0,0087$ με $R^2 = 0,9995$. Με τη βοήθεια αυτής ανάγονται οι απορροφήσεις των δειγμάτων προς τις συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος και κατά επέκταση στη τιμή που εκφράζει το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο.



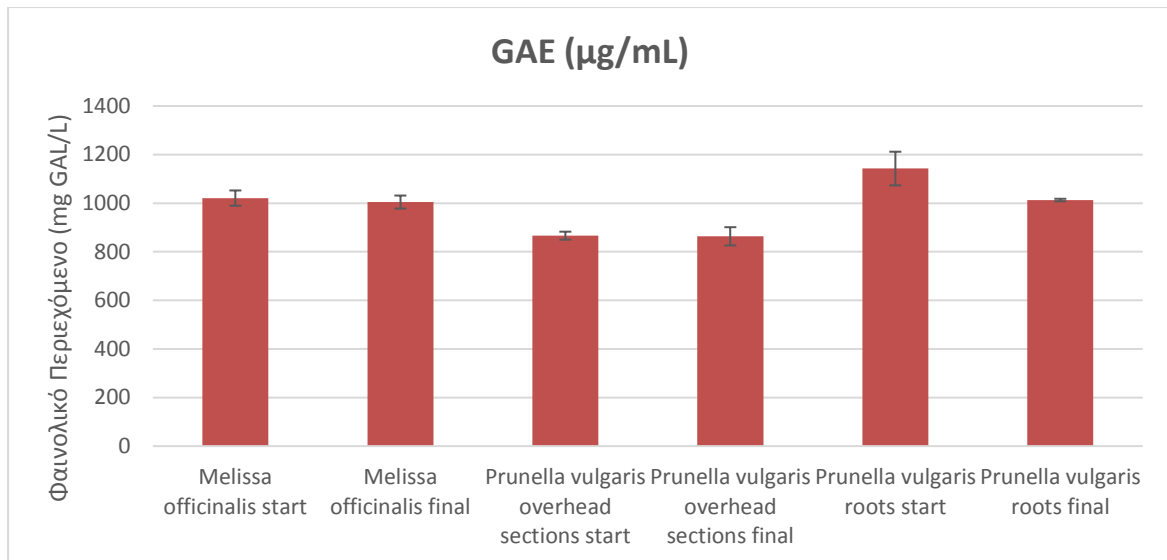
Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέως.

Τα τρία εκχυλίσματα που προήλθαν με τη μέθοδο της διαβροχής εμφανίζουν αρκετά μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες, όπως διακρίνεται στον **Πίνακας 10**.

Πίνακας 10. Διακρίνονται οι τιμές του ολικού φαινολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σε μg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος (Gallic Acid Equivalents, GAE) (Μέσος όρος \pm SD). Τιμές στο ίδιο εκχύλισμα με τον ίδιο εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Εκχύλισμα	Χρόνος μέτρησης	GAE ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Melissa officinalis</i>	T=0	1021 \pm 31,43
	8 ^η εβδομάδα	1005 \pm 26,86
<i>Prunella vulgaris</i> εναέρια τμήματα	T=0	866 \pm 16,50
	8 ^η εβδομάδα	864 \pm 37,55
<i>Prunella vulgaris</i> ρίζες	T=0	1143 \pm 69,26 ^a
	8 ^η εβδομάδα	1013 \pm 5,20 ^a

Η μεταβολή από χρόνο T=0 μέχρι την όγδοη εβδομάδα είναι μικρή. Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ουσίες έχουν οι ρίζες του φυτού *Prunella vulgaris*, ακολουθούν τα εναέρια τμήματα της *Melissa officinalis* και στο τέλος βρίσκονται τα εναέρια τμήματα της *Prunella vulgaris*.



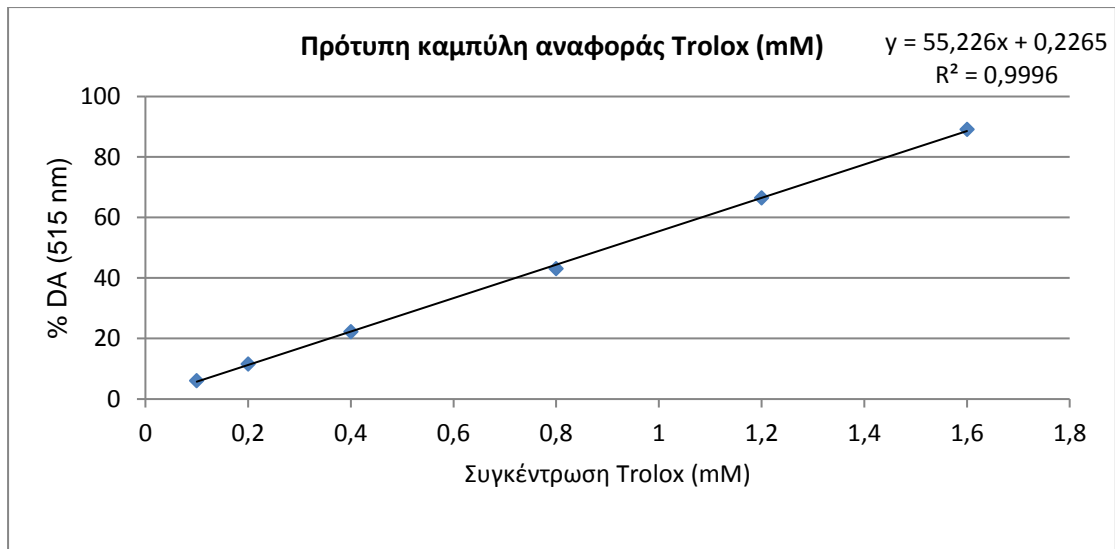
Διάγραμμα 2. Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών των τριών εκχυλισμάτων εκφρασμένης σε µg ισοδύναμων του γαλλικού οξέος σε χρόνο T=0 και στην όγδοη εβδομάδα.

3.1.3 Εκτίμηση της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών των υδατο-γλυκερινικών εκχυλισμάτων της *Melissa officinalis* και της *Prunella vulgaris* που προήλθαν από εκχύλιση με διαβροχή

Η εκτίμηση της αντιριζικής ικανότητας των δειγμάτων υπολογίζεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς Trolox mM και εκφράζεται ως ισοδύναμα Trolox, το οποίο ουσιαστικά ισοδυναμεί με τη βιταμίνη E όσον αφορά την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Η % αναστολή σχηματισμού ή αλλιώς εξουδετέρωση της ρίζας DPPH υπολογίζεται από τον τύπο:

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

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς δημιουργείται από τις μετρήσεις της απορρόφησης στα 515 nm γνωστών συγκεντρώσεων Trolox, οι οποίες προκύπτουν με διαδοχικές αραιώσεις από το αρχικό διάλυμα. Προκύπτει έτσι η συνάρτηση (2) $y=55,226x+0,2265$ με $R^2=0,9996$. Με τη βοήθεια αυτής πλέον μπορούν οι απορροφήσεις των δειγμάτων να αναχθούν προς τις συγκεντρώσεις Trolox (mg/mL).

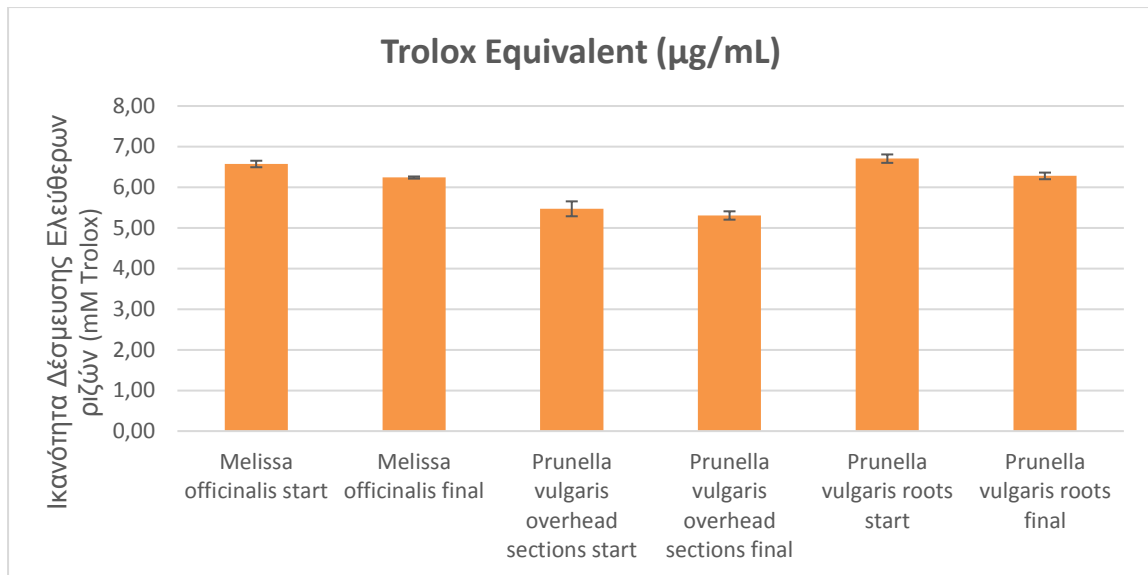


Διάγραμμα 3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των εκχυλισμάτων επεξεργάστηκαν με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης αναφοράς της ένωσης Trolox (βιταμίνη E) και εκφράστηκαν ως ισοδύναμα Trolox (TE) όπως διακρίνεται στον **Πίνακας 11**.

Πίνακας 11. Διακρίνονται οι τιμές της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών εκφρασμένης σε ισοδύναμα Trolox (Trolox Equivalents, TE) (Μέσος όρος±SD). Τιμές στο ίδιο εκχύλισμα με τον ίδιο εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Εκχύλισμα	Χρόνος μέτρησης	Trolox Equiv. (μg/mL)
Melissa officinalis	T=0	6,57±0,08
	8 ^η εβδομάδα	6,24±0,026
Prunella vulgaris εναέρια τμήματα	T=0	5,47±0,184
	8 ^η εβδομάδα	5,31±0,103
Prunella vulgaris ρίζες	T=0	6,72±0,104 ^a
	8 ^η εβδομάδα	6,28±0,081 ^a



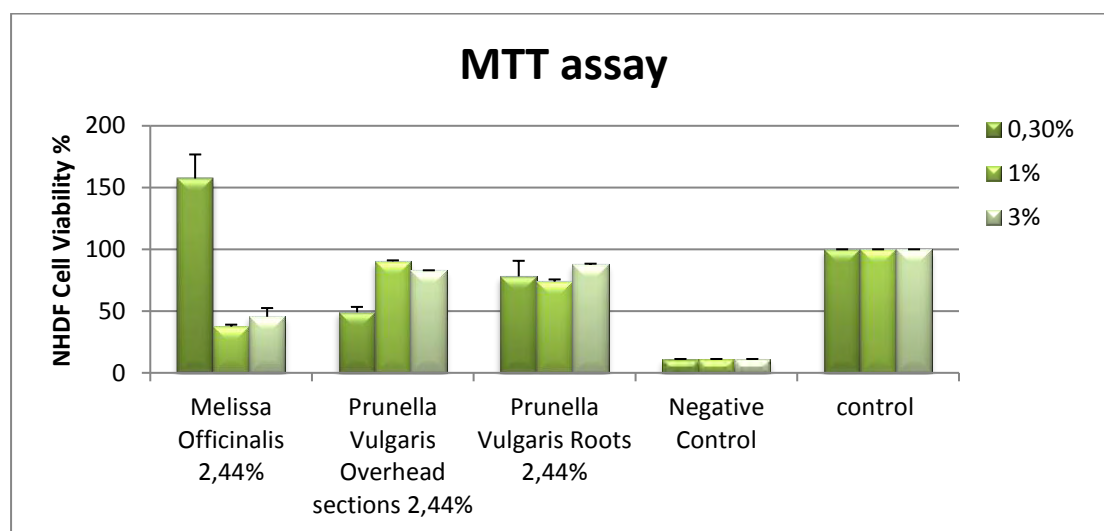
Διάγραμμα 4. Συγκριτικό γράφημα της συγκέντρωσης της ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών των τριών εκχυλισμάτων εκφρασμένης σε µg ισοδύναμων Trolox σε χρόνο T=0 και στην όγδοη εβδομάδα.

Γίνεται φανερό πως τα τρία εκχυλίσματα είναι πλούσια σε ενώσεις που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και άρα εμφανίζουν καλή αντιρριζική ικανότητα. Η ικανότητα σάρωσης των ελευθέρων ριζών αυξάνεται όσο πιο μεγάλη είναι η συγκέντρωση των ισοδύναμων του Trolox. Η μεταβολή από χρόνο T=0 μέχρι την όγδοη εβδομάδα είναι μικρή. Και εδώ τη μεγαλύτερη αντιρριζική ικανότητα έχουν οι ρίζες του φυτού *Prunella vulgaris*, ακολουθούν τα εναέρια τμήματα της *Melissa officinalis* και στο τέλος βρίσκονται τα εναέρια τμήματα της *Prunella vulgaris*. Γίνεται διακριτή μια θετική συσχέτιση μεταξύ των ολικών φαινολικών ενώσεων και της αντιρριζικής ικανότητας. Αυτό εν μέρει εξηγείται καθώς σε ευρύτερο πλαίσιο ισχύει ότι τόσο η ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών όσο και η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός εκχυλίσματος είναι ανάλογη τις περισσότερες φορές με την περιεκτικότητα του σε φαινολικές ενώσεις καθώς είναι αυτές που την προκαλούν.

3.1.4 Εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των υδατο-γλυκερινικών εκχυλισμάτων της *Melissa officinalis* και της *Prunella vulgaris* που προήλθαν από εκχύλιση με διαβροχή και με υπέρηχους

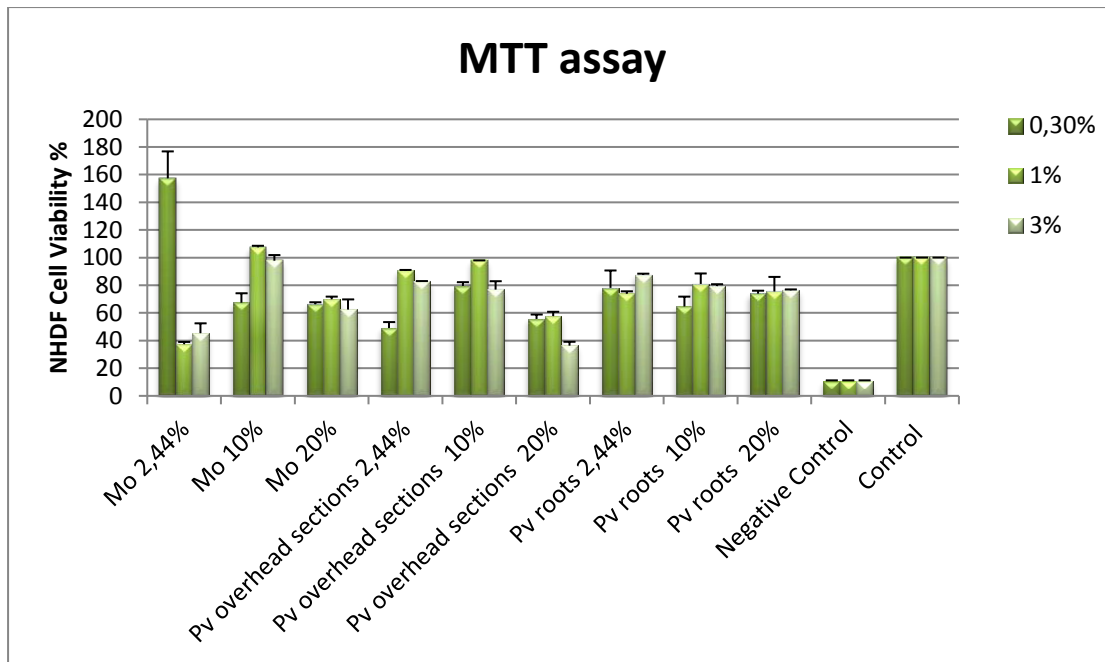
Την όγδοη εβδομάδα της μελέτης σταθερότητας των εκχυλισμάτων μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητά τους. Δοκιμάστηκαν, έτσι, τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτών στα κύτταρα: 0,3%, 1% και 3%. Τα εκχυλίσματα εκείνα για τα οποία έπειτα από την δοκιμασία MTT επιβιώνει περισσότερο του 80% των κυτάρων είναι όσα μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για ενσωμάτωσή τους σε προϊόντα. Να σημειωθεί ότι δεν σημαίνει απαραίτητα ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που δοκιμάζεται στα κύτταρα αυξάνεται ταυτόχρονα και η κυτταροτοξικότητά του. Το παραπάνω μπορεί να οφείλεται σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταβολισμού του MTT το οποίο μπορεί τελικά να οδηγεί σε αποτελέσματα διαφορετικά των αρχικών προβλέψεων. Συνοπτικά μια εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι πως η ενδοκυττάρωση του MTT δεν προκαλεί κάποια προφανή αλλοίωση ούτε και επάγει τον κυτταρικό θάνατο αλλά ο μεταβολισμός και η εξωκύτωση αυτού μπορούν να επηρεάσουν

δραματικά και να καταστρέψουν τα κύτταρα. Το MTT προσλαμβάνεται μέσω της ενδοκυττάρωσης και ανάγεται από μιτοχονδριακά ένζυμα καθώς επίσης και σε ενδοσωμικά/λυσosomalικά τμήματα και έπειτα μεταφέρεται στις κυτταρικές επιφάνειες για να σχηματίσει τα μόρια φορμαζάνης. Μια άλλη εξήγηση είναι ότι το MTT μπορεί να ενεργοποιήσει επίσης τους μηχανισμούς που σχετίζονται με την απόπτωση, όπως η κασπάση-8, η κασπάση-3 ή να επιταχύνει τη διαρροή των κυτταρικών περιεχομένων μετά από το σχηματισμό της φορμαζάνης. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η εξάρτηση του MTT από τον μεταβολικό ρυθμό και τον αριθμό των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα πιθανές παρεμβολές στο τελικό αποτέλεσμα (Kuefe *et al.*, 2017). Ίσως τέτοιες παρεμβολές να έχουν συμβεί και εδώ. Και για τα τρία εκχυλίσματα, με ποσοστό φυτικού υποστρώματος 2,44%, φαίνεται να υπάρχει συγκέντρωση η οποία δεν λειτουργεί κυτταροτοξικά, όπως η 0,3% της *Melissa officinalis*, η 1% και 3% των εναέριων τμημάτων της *Prunella vulgaris* καθώς και η συγκέντρωση 0,3% και 3% των ριζών της *Prunella vulgaris*.



Διάγραμμα 5. Παρουσίαση αποτελεσμάτων βιωσιμότητας των κυττάρων NHDF έπειτα από MTT δοκιμή στα εκχυλίσματα *Melissa officinalis* και *Prunella vulgaris* φυτικού υποστρώματος 2,44%.

Το **Διάγραμμα 6** είναι η ολοκληρωμένη μορφή του **Διαγράμματος 5** καθώς εδώ φαίνονται συγκριτικά τα τρία εκχυλίσματα και στις τρεις συγκεντρώσεις του φυτικού υποστρώματος 2,44%, 10% και 20%. Ισχύουν τα σχόλια που έγιναν στο προηγούμενο διάγραμμα. Πιο συγκεκριμένα διαφαίνεται πως η συγκέντρωση 1% και 3% της *Melissa officinalis* φυτικού υποστρώματος 10% θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω καθώς παρουσιάζουν κυτταρική βιωσιμότητα άνω του 80%. Οι συγκεντρώσεις 0,3% και 1% των εναέριων τμημάτων της *Prunella vulgaris* φυτικού υποστρώματος 10% επιτρέπουν επακόλουθη χρήση τους σε προϊόντα σε αντίθεση με όλες τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν από τα εναέρια τμήματα της *Prunella vulgaris* φυτικού υποστρώματος 20% των οποίων η κυτταροτοξικότητα εμποδίζει τους μετέπειτα χειρισμούς. Κάτι ανάλογο συμβαίνει και για τα εκχυλίσματα των ριζών της *Prunella vulgaris* φυτικού υποστρώματος 10% καθώς κρίνονται κατάλληλες μόνο οι συγκεντρώσεις 1% και 3% χωρίς ωστόσο να συμβαίνει το ίδιο και με τα αντίστοιχα εκχυλίσματα φυτικού υποστρώματος 20%, για τα οποία η βιωσιμότητα των κυττάρων βρίσκεται κάτω από 80%.



Διάγραμμα 6. Παρουσίαση αποτελεσμάτων βιωσιμότητας των κυττάρων NHDF έπειτα από MTT δοκιμή στα εκχύλισματα φυτικού υποστρώματος 2,44%, 10% και 20%. (Mo: *Melissa officinalis*, Pv: *Prunella vulgaris*)

3.1.5 Εκτίμηση ποσοτικού προσδιορισμού του ροσμαρινικού οξέος, του καφεϊκού οξέος και του ρ-κουμαρικού οξέος για το εκχύλισμα της *Melissa officinalis* με τη χρήση της HPTLC

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του ροσμαρινικού, του καφεϊκού και του ρ-κουμαρικού οξέος στο εκχύλισμα της *Melissa officinalis* επιτυγχάνεται με τη χρήση καμπυλών αναφοράς για την κάθε ουσία ξεχωριστά.

Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του ροσμαρινικού οξέος φαίνονται στον **Πίνακας 12** :

Πίνακας 12. Παρουσιάζονται οι ποσότητες και οι αντίστοιχες περιεκτικότητες του ροσμαρινικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς.

Standards	μL διαλύματος stock που τοποθετήθηκαν στην πλάκα	μg/mL ροσμαρινικού οξέος	μg ροσμαρινικού οξέος
1	4	1250	5
2	4	2000	8
3	4	2500	10
4	4	3750	15
5	4	4500	18
6	4	5000	20

Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του καφεϊκού οξέος φαίνονται στον **Πίνακας 13**:

Πίνακας 13. Παρουσιάζονται οι ποσότητες και οι αντίστοιχες περιεκτικότητες του καφεϊκού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς

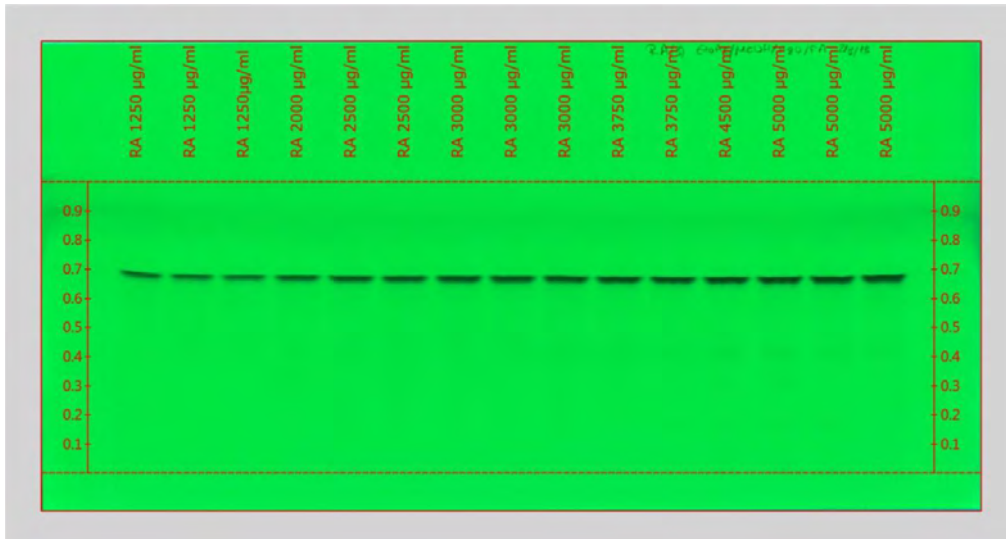
Standards	μL διαλύματος stock που τοποθετήθηκαν στην πλάκα	μg/mL καφεϊκού οξέος	μg καφεϊκού οξέος
1	4	125	0,5
2	4	150	0,6
3	4	175	0,7
4	4	200	0,8
5	4	225	0,9
6	4	250	1,0

Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του p-κουμαρικού οξέος φαίνονται στον **Πίνακας 14**:

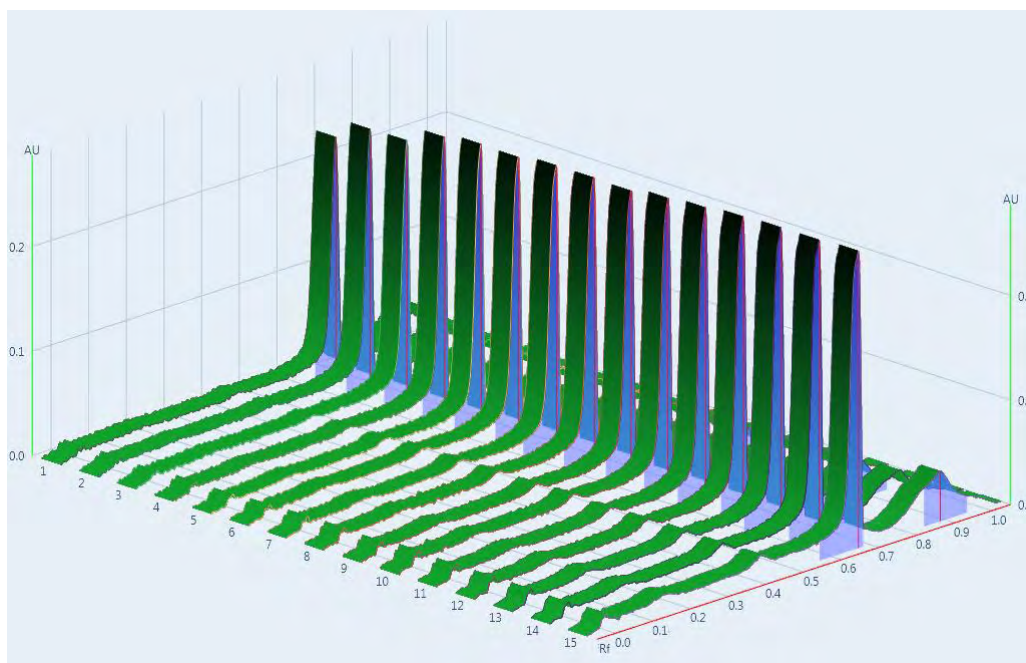
Πίνακας 14. Παρουσιάζονται οι ποσότητες και οι αντίστοιχες περιεκτικότητες του p-κουμαρικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς

Standards	μL διαλύματος stock που τοποθετήθηκαν στην πλάκα	μg/mL p-κουμαρικού οξέος	μg p-κουμαρικού οξέος
1	4	25	0,1
2	4	50	0,2
3	4	75	0,3
4	4	125	0,5
6	4	250	1,0

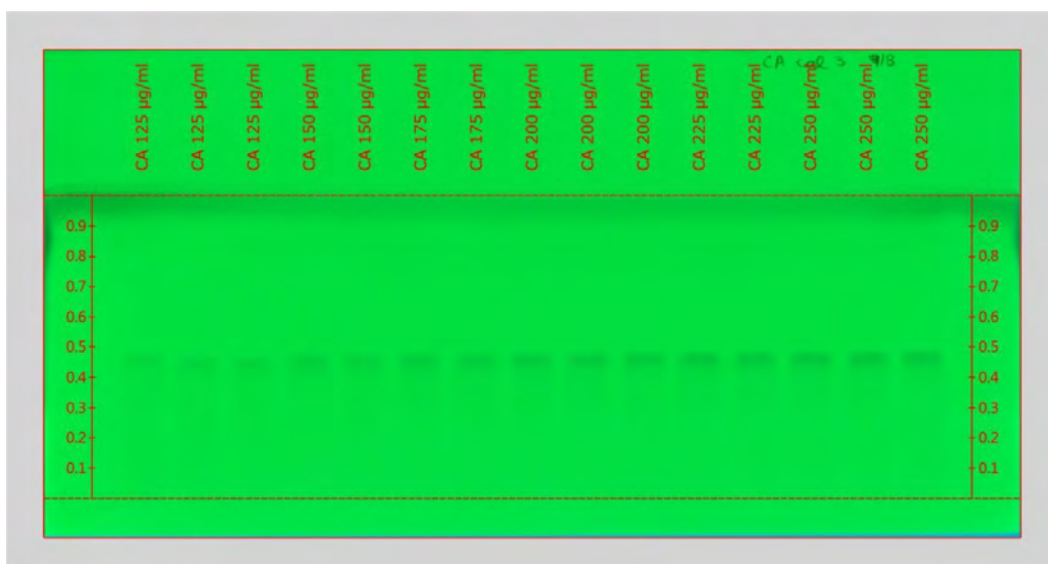
Παρακάτω παρουσιάζονται οι αντίστοιχες φωτογραφίες της κάθε πλάκας. Έπειτα τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με το visionCATS λογισμικό το οποίο απέδωσε την εικόνα του χρωματογραφήματος σε αναλογικές καμπύλες με βάση την απορρόφηση των ξεχωριστών ζωνών ώστε να αποδοθεί η εικόνα τριών διαστάσεων του αντίστοιχου προφίλ για την κάθε ουσία.



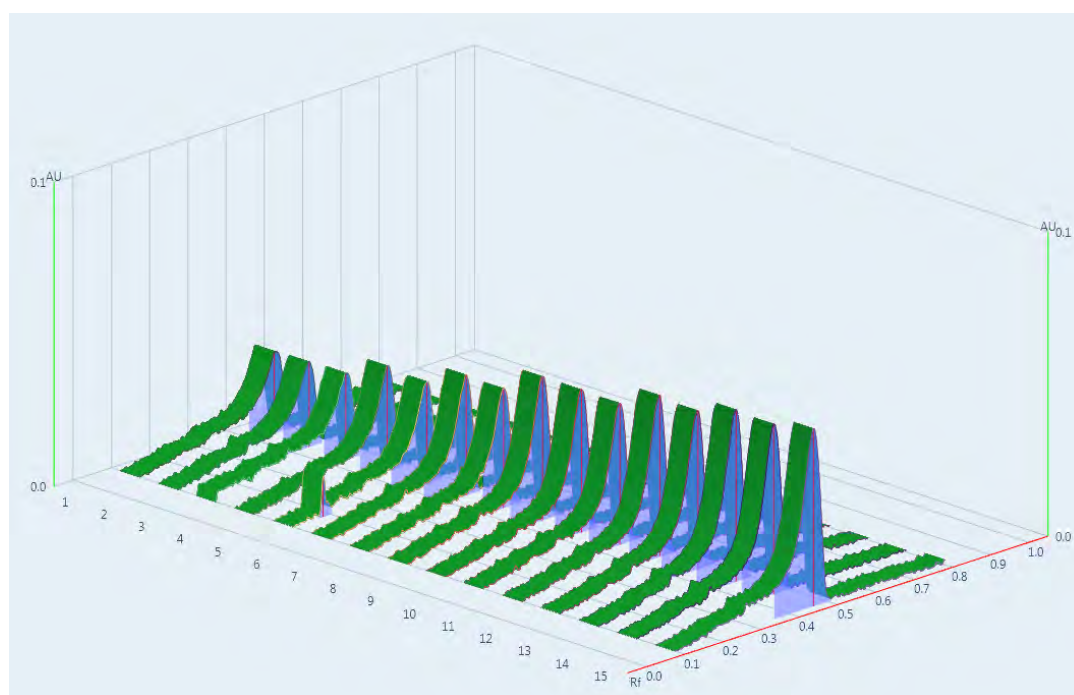
Εικόνα 8. Ανεπτυγμένη πλάκα με τα standards του ροσμαρινικού οξέος (RA) στα 254 nm.



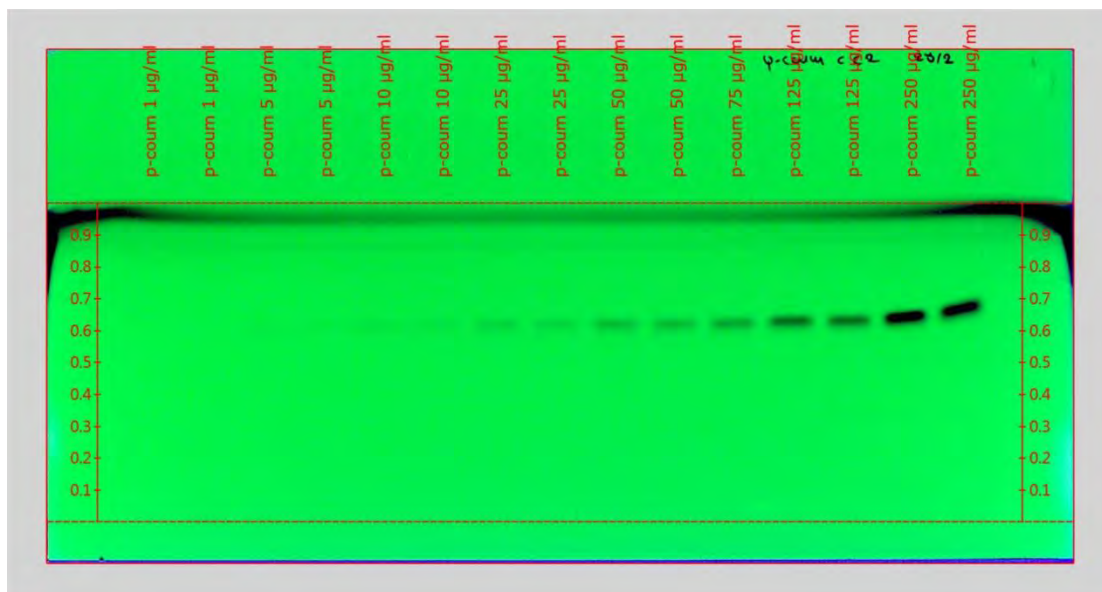
Χρωματογράφημα 1. Τρισδιάστατη εικόνα που αποδίδει σχηματικά το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (Area under the curve-AUC) για το ροσμαρινικό οξύ.



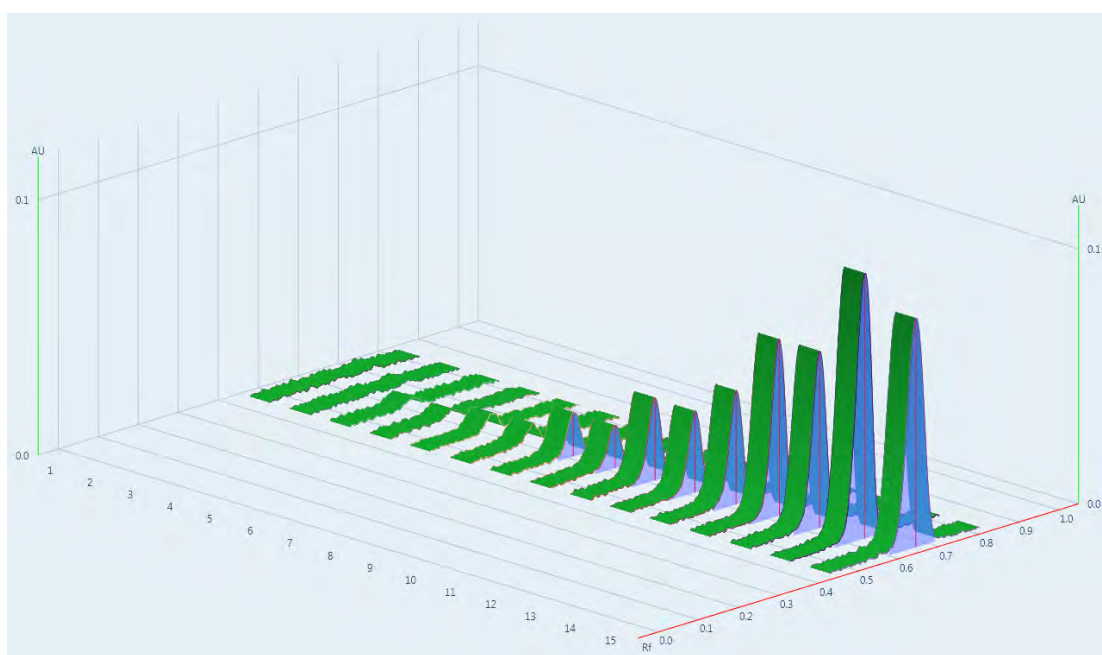
Εικόνα 9. Ανεπτυγμένη πλάκα με τα standards του καφεϊκού οξέος (CA) στα 254 nm.



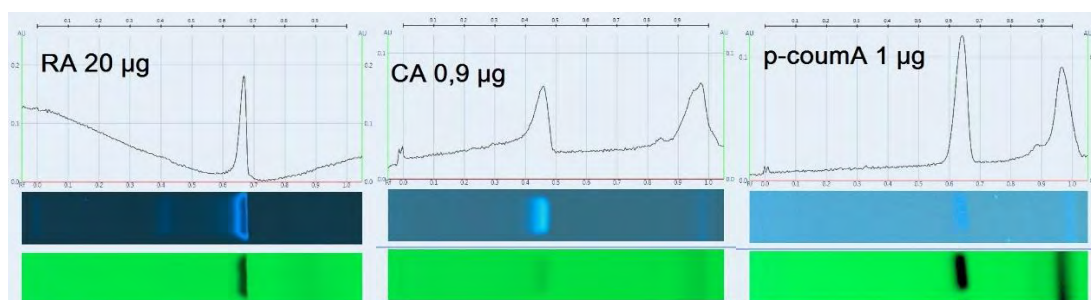
Χρωματογράφημα 2. Τρισδιάστατη εικόνα που αποδίδει σχηματικά το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (Area under the curve-AUC) για το καφεϊκό οξύ.



Εικόνα 10. Ανεπτυγμένη πλάκα με τα standards του ρ-κουμαρικού οξέος (ρ-coum.) στα 254 nm.



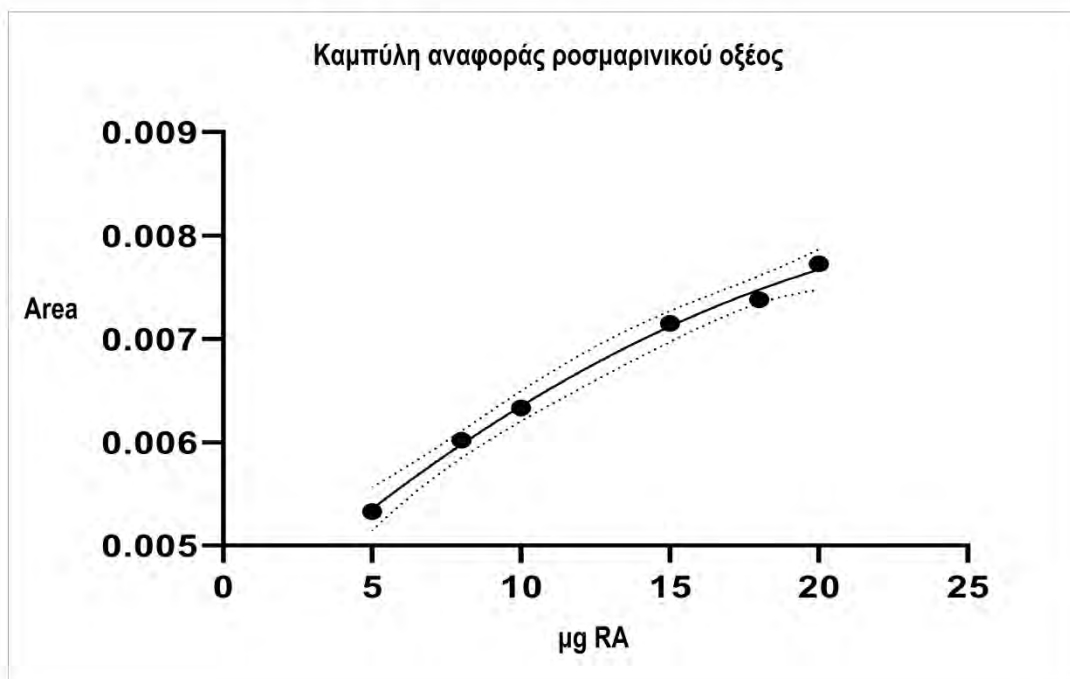
Χρωματογράφημα 3. Τρισδιάστατη εικόνα που αποδίδει σχηματικά το εμβαδό κάτω από την καμπύλη (Area under the curve-AUC) για το ρ-κουμαρικό οξύ.



Εικόνα 11. Διακρίνεται συγκεντρωτικά η κορυφή απορρόφησης του ροσμαρινικού, καφεΐκου οξέος και του ρ-κουμαρικού οξέος ποσότητας 20, 0,9 και 1 µg αντίστοιχα καθώς και η αντίστοιχη κηλίδα στα 366 και 254 nm.

Από τις συγκεντρώσεις των προτύπων και τα εμβαδά των κορυφών του ροσμαρινικού οξέος στο χρωματογράφημα κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς. Η καμπύλη αντιστοιχεί σε πολυωνυμική εξίσωση δευτέρου βαθμού, συνάρτηση (3), $y = -4E-06x^2 + 0,0003x + 0,0041$ με $R^2 = 0,9962$.

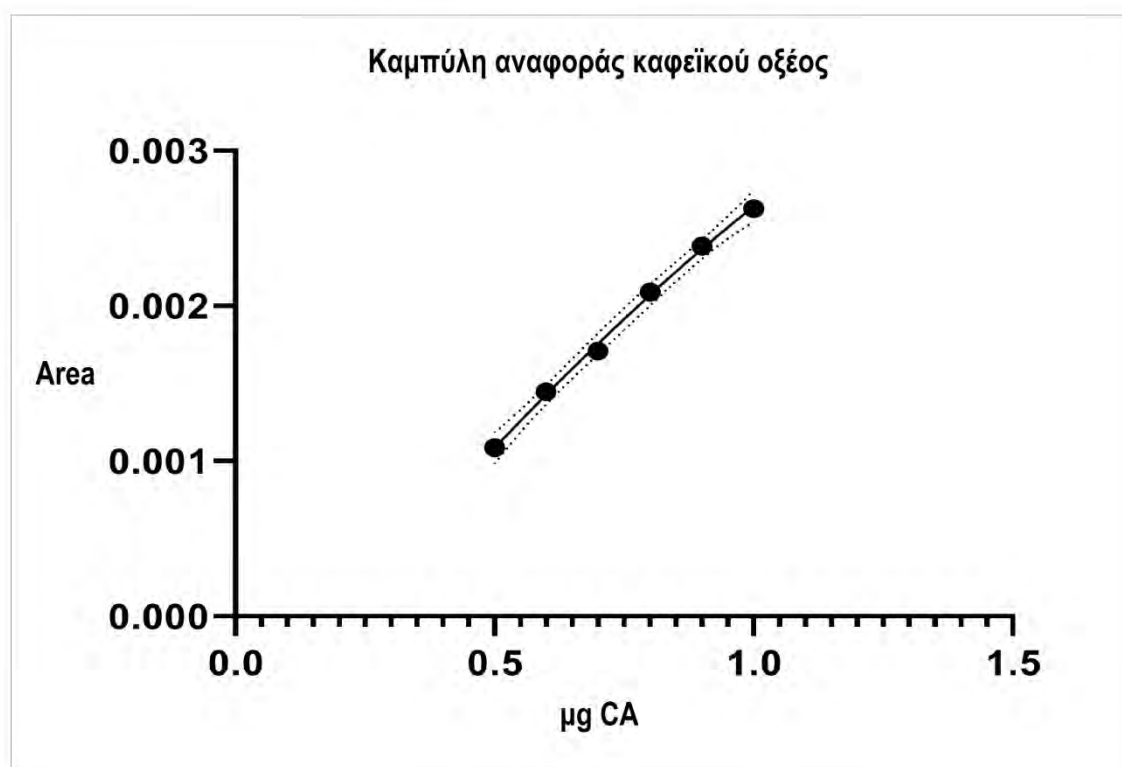
Έγινε έλεγχος της καμπύλης αναφοράς όσον αφορά την ακρίβεια των ίδιων των σημείων για να διαπιστωθεί η ορθότητα του μοντέλου στην πρόβλεψη των θεωρητικών συγκεντρώσεων. Πιο συγκεκριμένα υπολογίστηκε το μέγιστο $E_r\% = 4,8$ και το ελάχιστο $E_r\% = -3,4$ ενώ όλες οι υπόλοιπες τιμές ήταν εντός αυτού του εύρους.



Διάγραμμα 7. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς του ροσμαρινικού οξέος.

Από τις συγκεντρώσεις των προτύπων και τα εμβαδά των κορυφών του καφεϊκού οξέος στο χρωματογράφημα κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς. Η καμπύλη αντιστοιχεί σε πολυωνυμική εξίσωση δευτέρου βαθμού, συνάρτηση (4), $y = -0,0009x^2 + 0,0044x - 0,0009$ με $R^2 = 0,9978$.

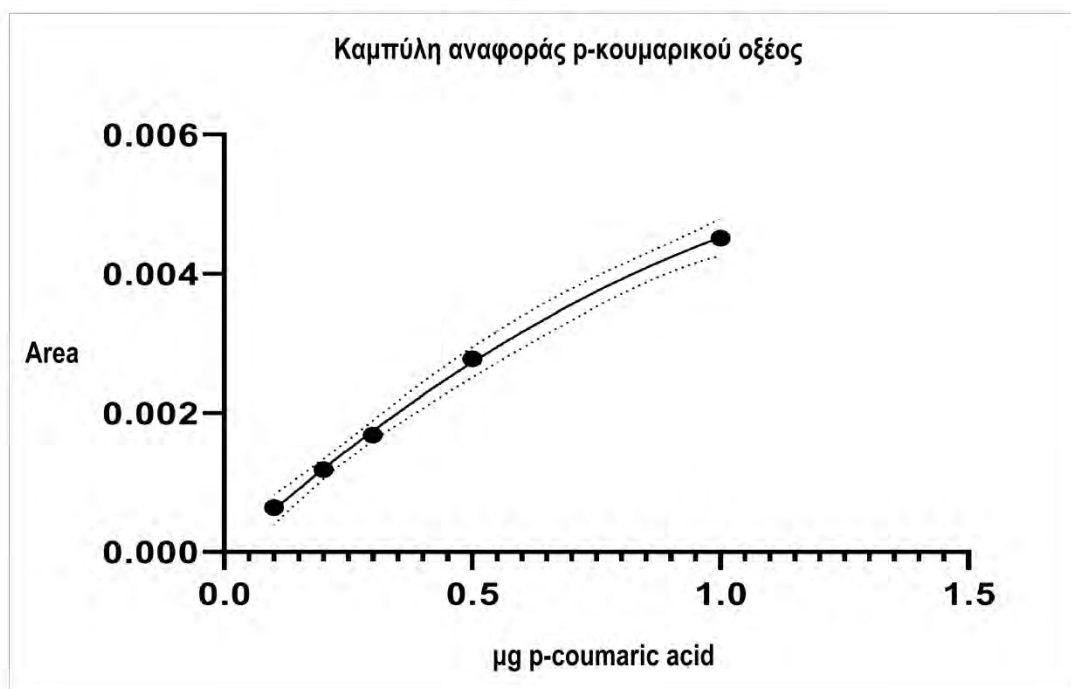
Έγινε έλεγχος της καμπύλης αναφοράς όσον αφορά την ακρίβεια των ίδιων των σημείων για να διαπιστωθεί η ορθότητα του μοντέλου στην πρόβλεψη των θεωρητικών συγκεντρώσεων. Πιο συγκεκριμένα υπολογίστηκε το μέγιστο $E_r\% = 2,1$ και το ελάχιστο $E_r\% = -0,88$ ενώ όλες οι υπόλοιπες τιμές ήταν εντός αυτού του εύρους.



Διάγραμμα 8. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς του καφεϊκού οξέος.

Από τις συγκεντρώσεις των προτύπων και τα εμβαδά των κορυφών του ρ -κουμαρικού οξέος στο χρωματογράφημα κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς. Η καμπύλη αντιστοιχεί σε πολυωνυμική εξίσωση δευτέρου βαθμού, συνάρτηση (5), $y = -0,0019x^2 + 0,0064x - 2E-05$ με $R^2 = 0,9992$.

Έγινε έλεγχος της καμπύλης αναφοράς όσον αφορά την ακρίβεια των ίδιων των σημείων για να διαπιστωθεί η ορθότητα του μοντέλου στην πρόβλεψη των θεωρητικών συγκεντρώσεων. Πιο συγκεκριμένα υπολογίστηκε το μέγιστο $Er\% = 3,88$ και το ελάχιστο $Er\% = -5,46$ ενώ όλες οι υπόλοιπες τιμές ήταν εντός αυτού του εύρους.



Διάγραμμα 9. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς του p-κουμαρικού οξέος.

Με τη βοήθεια των καμπυλών αναφοράς του ροσμαρινικού οξέος, του καφεϊκού και του p-κουμαρικού οξέος που παρουσιάστηκαν πραγματοποιείται ο υπολογισμός της περιεκτικότητας των παραπάνω στο φυτό *Melissa officinalis*, όπως φαίνεται παρακάτω: **Πίνακας 15, Πίνακας 16, Πίνακας 17:**

Πίνακας 15. Προσδιορισμός του ποσοστού (Μέσος όρος \pm Sdev) του ροσμαρινικού οξέος στα εναέρια τμήματα του φυτού *Melissa officinalis*.

µg εκχυλίσματος	X (µg RA)	% RA στο εκχύλισμα	% Average	Sdev
80	3,34037151	4,18		
100	4,4903753	4,49	4,9	0,65
120	6,1891793	5,16		
140	7,86543721	5,62		

Πίνακας 16. Προσδιορισμός του ποσοστού (Μέσος όρος \pm Sdev) του καφεϊκού οξέος στα εναέρια τμήματα του φυτού *Melissa officinalis*.

µg εκχυλίσματος	X (µg CA)	% CA στο εκχύλισμα	% Average	Sdev
100	0,75321385	0,75		
120	0,80047176	0,67		
150	0,87987155	0,59	0,6	0,14
180	0,90425543	0,50		
200	0,93256821	0,47		
250	0,96501821	0,39		

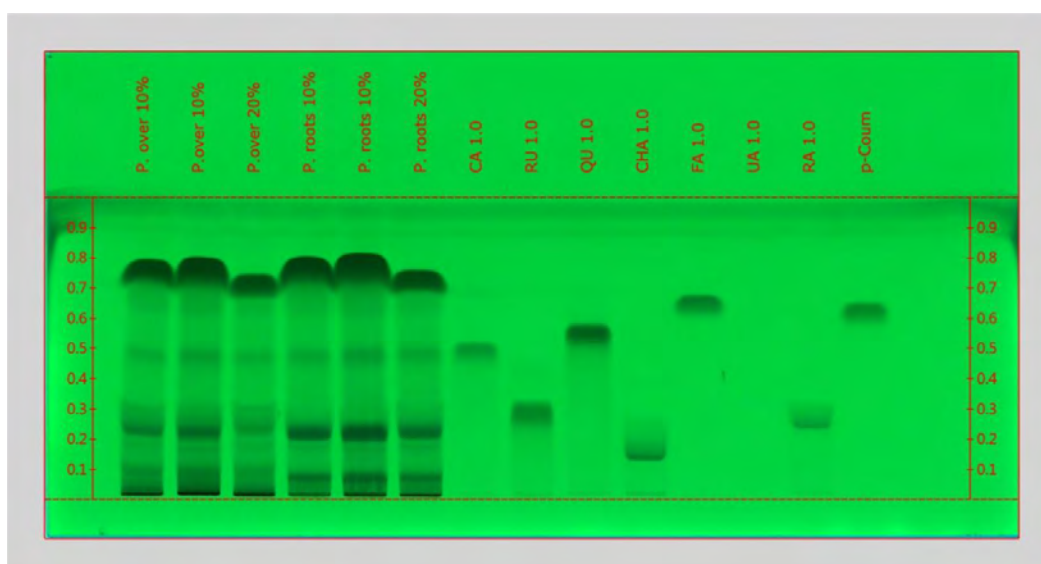
Πίνακας 17. Προσδιορισμός του ποσοστού (Μέσος όρος \pm Sdev) του p-κουμαρικού οξέος στα εναέρια τμήματα του φυτού *Melissa officinalis*.

μg εκχυλίσματος	X (μg p-coum.)	% p-coum. στο εκχύλισμα	% Average	Sdev
100	0,084878231	0,08		
120	0,090616925	0,08		
150	0,112945732	0,08	0,1	0,01
180	0,132216697	0,07		
200	0,143214209	0,07		
250	0,153434976	0,06		

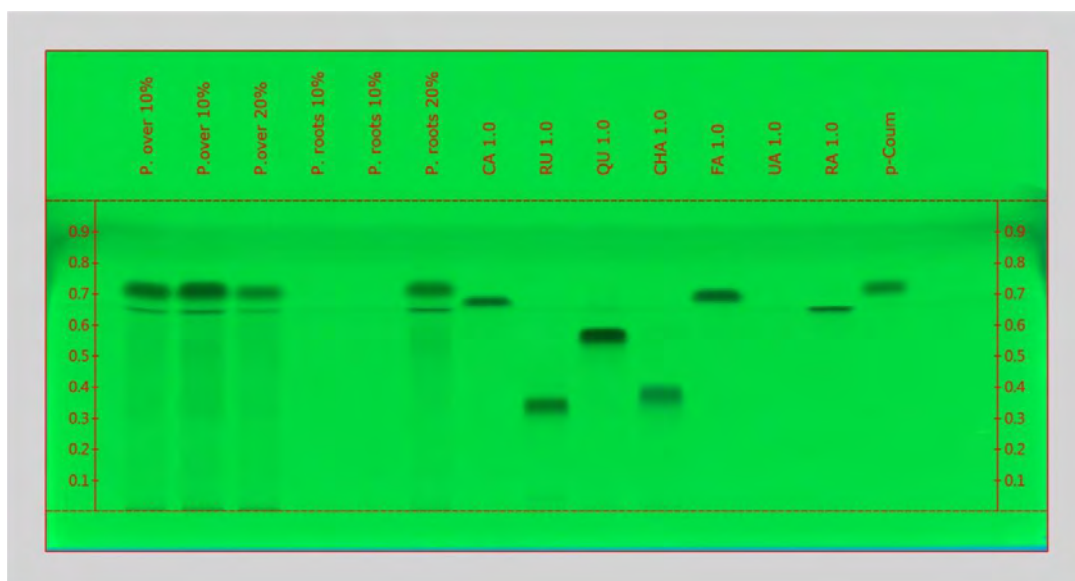
Συμπερασματικά λοιπόν, με τη χρήση της HPTLC υπολογίστηκε κατά προσέγγιση η περιεκτικότητα της *Melissa officinalis* σε ροσμαρινικό οξύ η οποία ήταν $4,9\% \pm 0,65$, σε καφεϊκό η οποία ήταν $0,6\% \pm 0,14$ και p-κουμαρικό οξύ, η οποία ήταν $0,1\% \pm 0,01$.

3.1.6 Εκτίμηση ποιοτικού προσδιορισμού συγκεκριμένων βιοδραστικών ουσιών του εκχυλίσματος της *Prunella vulgaris* με τη βοήθεια της HPTLC

Από την ποιοτική ανίχνευση στο φυτό *Prunella vulgaris* των παρακάτω βιοδραστικών ουσιών: ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, p-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, ουρσολικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, κερσετίνη και ρουτίνη προέκυψε το συμπέρασμα ότι στην *Prunella vulgaris* διαφαίνεται το ροσμαρινικό οξύ, και πιο συγκεκριμένα στο σύστημα EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 50:10:7:1 v/v, το οποίο βρίσκεται στην μεγαλύτερη ποσότητα. Οι υπόλοιπες βιοδραστικές ουσίες δεν μπορούν να διαφανούν καθώς η μικρή περιεκτικότητα και η σύνδεσή τους με άλλα μόρια παρεμποδίζουν την ανίχνευσή τους. Στην **Εικόνα 12** και **Εικόνα 13** διαφαίνονται τα παραπάνω.



Εικόνα 12. Ανεπτυγμένη πλάκα στο σύστημα διαλυτών DCM:MeOH:H₂O σε αναλογία 70:30:4 v/v στα 254 nm.



Εικόνα 13. Ανεπτυγμένη πλάκα στο σύστημα διαλυτών EtOAc:MeOH:H₂O:FA σε αναλογία 50:10:7:1 v/v στα 254 nm.

3.1.7 Εκτίμηση ποσοτικού προσδιορισμού του συνολικού περιεχομένου των υδατανθράκων του εκχυλίσματος της *Prunella vulgaris* με τη μέθοδο Phenol-Sulfuric acid

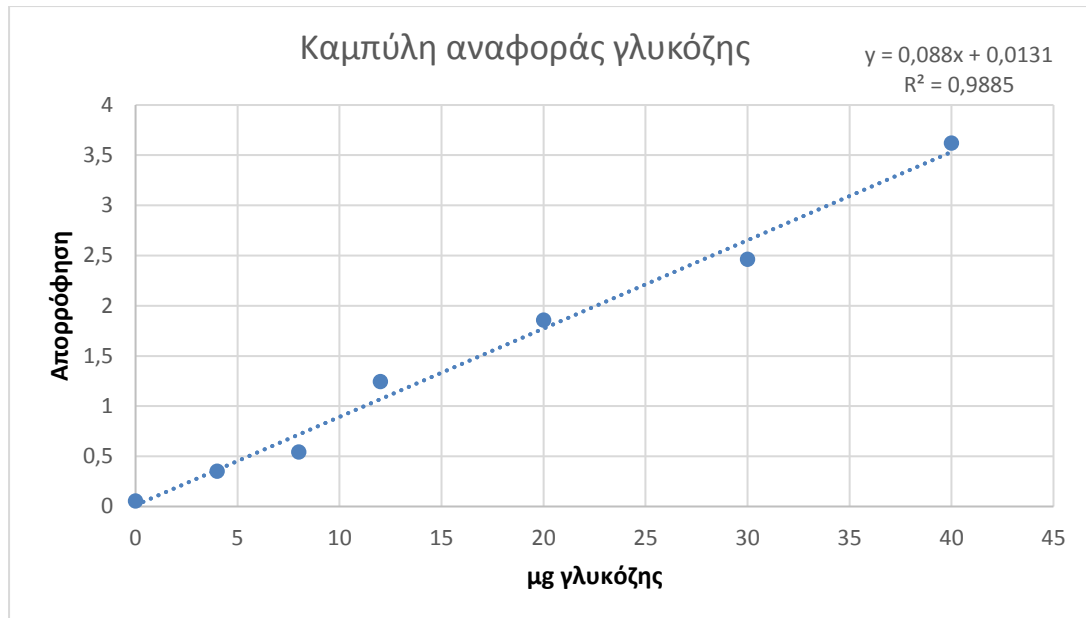
Ο ποσοτικός προσδιορισμός του πολυσακχαρίτη της *Prunella vulgaris* επιτυγχάνεται με τη χρήση καμπύλης αναφοράς του σακχάρου της γλυκόζης. Η επιλογή της γλυκόζης ως σάκχαρο αναφοράς έγινε καθώς έπειτα από βιβλιογραφική μελέτη ο πολυσακχαρίτης που έχει την αντιερπητική δράση αποτελείται σε μεγαλύτερο ποσοστό από γλυκόζη (Xu *et al*, 1999).

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς δημιουργείται από τις μετρήσεις της απορρόφησης στα 490 nm γνωστών συγκεντρώσεων γλυκόζης, οι οποίες προκύπτουν με διαδοχικές αραιώσεις από το αρχικό διάλυμα. Προκύπτει έτσι η συνάρτηση (6) $y=0,088x+0,0131$ με $R^2 = 0,9885$. Με τη βοήθεια αυτής πλέον μπορούν οι απορροφήσεις των δειγμάτων να αναχθούν προς τις συγκεντρώσεις γλυκόζης και κατά επέκταση στη τιμή που εκφράζει το συνολικό περιεχόμενο υδατανθράκων και άρα να μας δώσει μια εικόνα του περιεχομένου του φυτού σε πολυσακχαρίτη.

Πίνακας 18. Διακρίνονται τα μg γλυκόζης που τοποθετήθηκαν ανά πηγάδι με σκοπό να δημιουργηθεί η καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης.

Standards	μL διαλύματος stock που τοποθετήθηκαν στο πηγάδι	mg/mL γλυκόζης	μg γλυκόζης ανά πηγάδι
1	0	2	0
2	2	2	4
3	4	2	8
4	6	2	12

5	8	2	16
6	10	2	20
7	15	2	30
8	20	2	40



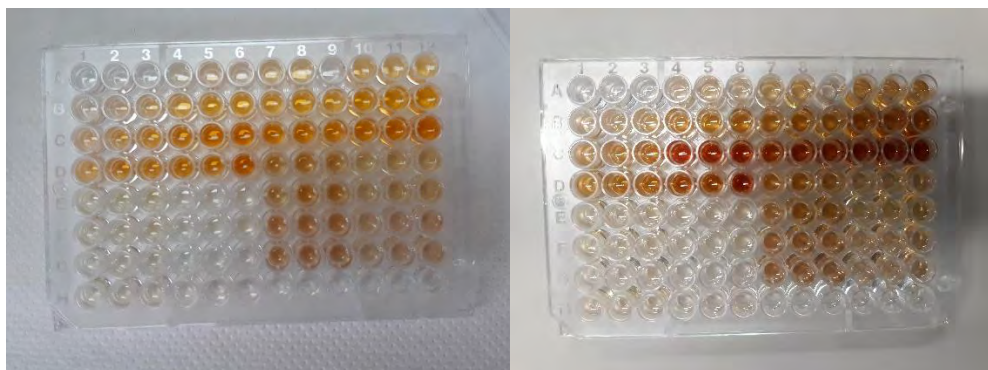
Διάγραμμα 10. Καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης.

Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς της γλυκόζης πραγματοποιείται ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του συνόλου των υδατανθράκων εκφρασμένων σε % γλυκόζη στο φυτό *Prunella vulgaris*, τόσο των εναέριων τμημάτων όσων και των ριζών των εκχυλισμάτων 10% και 20%, όπως φαίνεται στον **Πίνακας 19**:

Πίνακας 19. Υπολογισμός του συνολικού ποσοστού (Μέσος όρος \pm Sdev) των υδατανθράκων της *Prunella vulgaris* εκφρασμένα σε γλυκόζη. Όπου P. over: εκχύλισμα εναέριων τμημάτων και όπου P.roots: εκχύλισμα ριζών της *Prunella vulgaris*.

Εκχύλισμα <i>Prunella vulgaris</i>	μg γλυκόζης	% γλυκόζη	Average%	Sdev
P. over. 10% 1 mg/mL	5,195833497	10,39167		
P. over. 10% 0.5 mg/mL	3,400378812	13,60152	11,51692	1,807218
P. over. 10% 0.25 mg/mL	1,319696937	10,55758		
P. over. 20% 1 mg/mL	5,6734848	11,34697		
P. over. 20% 0.5 mg/mL	3,495833337	13,98333	11,74747	2,064944
P. over. 20% 0.25 mg/mL	1,239015165	9,912121		
P. roots 10% 1 mg/mL	5,519318177	11,03864		
P. roots 10% 0.5 mg/mL	3,560984882	14,24394	11,55278	2,474481
P. roots 10% 0.25 mg/mL	1,171969704	9,375758		
P. roots 20% 1 mg/mL	4,907196988	9,814394		
P. roots 20% 0.5 mg/mL	3,033333341	12,13333	11,30177	1,291098

Προκύπτει έτσι πως το περιεχόμενο του εκχυλίσματος τόσο των εναέριων τμημάτων όσο και των ριζών του φυτού σε υδατάνθρακες είναι περίπου 11,5%. Να υπογραμμιστεί σε αυτό το σημείο ότι μέσα στο σύνολο αυτό είναι και ο ζητούμενος πολυσακχαρίτης. Έτσι η παραπάνω δοκιμή μας επιτρέπει να έχουμε μια γενική εικόνα ύπαρξης αυτού και της αντίστοιχης ποσότητάς του.



Εικόνα 14. Διακρίνεται η χρωματική αλλαγή κατά τη δοκιμασία της φαινόλης-θειικού οξέος πριν (δεξιά φωτογραφία) και μετά (αριστερή φωτογραφία).

3.2 Μελέτη μορφοποίησης του αντιερπητικού προϊόντος

3.2.1 Δοκιμές διάλυσης της χιτοζάνης σε ασκορβικό, οξικό και γαλακτικό οξύ

Έπειτα από δοκιμές για διάλυση της χιτοζάνης στο οξικό, γαλακτικό και ασκορβικό οξύ, το τελευταίο κρίθηκε ακατάλληλο καθώς οξειδωνόταν εντόνως και αποκτούσε σκούρο πορτοκαλί χρώμα. Επίσης οι δοκιμές 4 και 5 του **Πίνακας 20** ήταν αποτυχημένες καθώς ο διαλύτης στη συγκεκριμένη περιεκτικότητα οξέος δεν κατάφερε να διαλύσει την αντίστοιχη ποσότητα χιτοζάνης.

Η μορφοποίηση του προϊόντος στηρίχθηκε στο οξικό οξύ ενώ το γαλακτικό οξύ κρίθηκε το καταλληλότερο καθώς ήταν εκείνο που κατάφερε να διαλύσει τη χιτοζάνη χωρίς όμως την έντονη οσμή του οξικού οξέος και είναι αυτό που επιλέχθηκε για τη τελική μορφοποίηση του προϊόντος.

Πίνακας 20. Παρουσιάζεται η διάλυση της χιτοζάνης σε διαφορετικές περιεκτικότητες και υδατικά διαλύματα οξέων με σκοπό να βρεθεί ο βέλτιστος συνδυασμός. Να σημειωθεί πως τα ιζώδη μετρούνται στις εξής συνθήκες: 0,6 rpm, spindle 21 σε θερμοκρασία 22°C (Chen *et al.*, 2007). Εξαιρέση αποτελεί η μέτρηση εννιά η οποία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

Αριθμός Δοκιμής	Συγκέντρωση χιτοζάνης (CS)	Διαλύτης	Συγκέντρωση διαλύτη	pH διαλύτη πριν την διάλυση της CS	pH διαλύματος αμέσως μετά την διάλυση της CS	pH διαλύματος μετά το φιλτράρισμα (8-10 μm)	Ιζώδες διαλύματος
1	1% CS	οξικό οξύ	1%	2,59	4,11	4,15	83,3 cps στο 0,1%
2	2% CS	οξικό οξύ	1%	2,57	4,52	4,58	1750 cps στο 0,1%
3	1% CS	ασκορβικό οξύ	1%	2,7	4,8	4,83	(Υδαρές) X
4	2% CS	ασκορβικό οξύ	1%	2,7	6,0 (αποτυχημένη μορφή τζελ)	X	X
5	3% CS	ασκορβικό οξύ	1%	2,7	6,1 (αποτυχημένη μορφή τζελ)	X	X
6	2% CS	ασκορβικό οξύ	0.2 M	2,3	3,84	3,71	(Υδαρές) X
7	3% CS	ασκορβικό οξύ	0.2 M	2,33	4,33	4,4	(Υδαρές) X
8	2% CS	γαλακτικό οξύ	1%	2,45	5,37	5,39	2250 cps στο 2,7%
9	3% CS	γαλακτικό οξύ	4%	2,00	3,30	3,31	5250 cps στο 6,3%

3.2.2 Έλεγχος σταθερότητας των προϊόντων μορφοποίησης

Δοκιμάστηκαν διάφορες παραλλαγές συνταγών για τη μορφοποίηση του αντιερπητικού προϊόντος, τα συμπεράσματα σταθερότητας των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω ενώ οι αναλυτικοί πίνακες των δεδομένων βρίσκονται στο **Παράρτημα 1**. Όλες οι μελέτες σχηματισμού των φιλμ από τα παραγόμενα προϊόντα, έγιναν για ίσες επιφάνειες, κυκλικές με ακτίνα περίπου ένα εκατοστό. Ακολουθούν φωτογραφίες μικροσκοπίου οι οποίες αποδίδουν την μορφολογία του φιλμ αλλά και του προϊόντος πριν την εφαρμογή του. Παρατίθενται επίσης τα συγκριτικά διαγράμματα της αντιρριζικής τους ικανότητας και του ολικού φαινολικού περιεχομένου τους.

Το σχηματιζόμενο προϊόν, CS-ALL 1, κρίνεται μη σταθερό λόγω των έντονων μεταβολών που παρατηρήθηκαν στο πέρασ ενός μήνα. Το pH μεταβάλλεται εντός αποδεκτών ορίων, όπως και η οσμή. Όσον αφορά το χρώμα του, οι μεταβολές είναι εντονότερες ενώ οι αλλαγές στην υφή του αρχικού τζελ καθώς και η απώλεια του

ιξώδους του το καθιστούν ακατάλληλο για περαιτέρω μελέτη. Η αντιρριζική ικανότητά του και το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζουν ελαφρά μείωση στο πέρας της μελέτης σταθερότητας. Από τη μελέτη σχηματισμού φιλμ σε ragafilm προέκυψε το μεγαλύτερο πρόβλημα που ήταν ότι ο σχηματισμός των φιλμ ξεπερνούσε τα 20 λεπτά και δεν εμφάνιζε καλή προσκολλητική ικανότητα στην επιφάνεια και άρα δεν θα ήταν εύχρηστο.

Σκοπός της δεύτερης δοκιμής ήταν να ελεγχθεί το κατά πόσο επιτρέπει τον σχηματισμό του φιλμ, πόσο επηρεάζει τη διάρκεια σχηματισμού του καθώς και τη δομή του η ποσότητα των εκχυλισμάτων και κατά επέκταση η παρουσία του νερού. Ένας άλλος παράγοντας ήταν ο έλεγχος της οσμής του προϊόντος, καθώς κυριαρχούσε η έντονη μυρωδιά του οξικού οξέος και του αιθέριου ελαίου του θυμαριού. Για το λόγο αυτό προστέθηκε ο αποσμητής με σκοπό να παρατηρηθεί τόσο η επίδρασή του στην οσμή όσο και ο τρόπος που επηρεάζει τη σύσταση στο σύνολό της. Το σχηματιζόμενο προϊόν, CS-ALL 2, κρίνεται μη σταθερό λόγω των έντονων μεταβολών που παρατηρήθηκαν στο πέρας ενός μήνα. Το pH μεταβάλλεται εντός αποδεκτών ορίων. Όσον αφορά το χρώμα του και την οσμή του, οι μεταβολές είναι εντονότερες ενώ οι αλλαγές στην υφή του αρχικού τζελ και η απώλεια του ιξώδους του το καθιστούν ακατάλληλο για περαιτέρω μελέτη. Η αντιρριζική ικανότητά του και το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζουν μείωση στο πέρας της μελέτης σταθερότητας. Μάλιστα το φαινολικό φορτίο παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) κατά τη σύγκριση της αρχικής και της τελικής μέτρησης. Οι δοκιμές σχηματισμού των φιλμ ξεπερνούσαν και εδώ τα 20 λεπτά και δεν εμφάνιζαν καλή προσκολλητική ικανότητα.

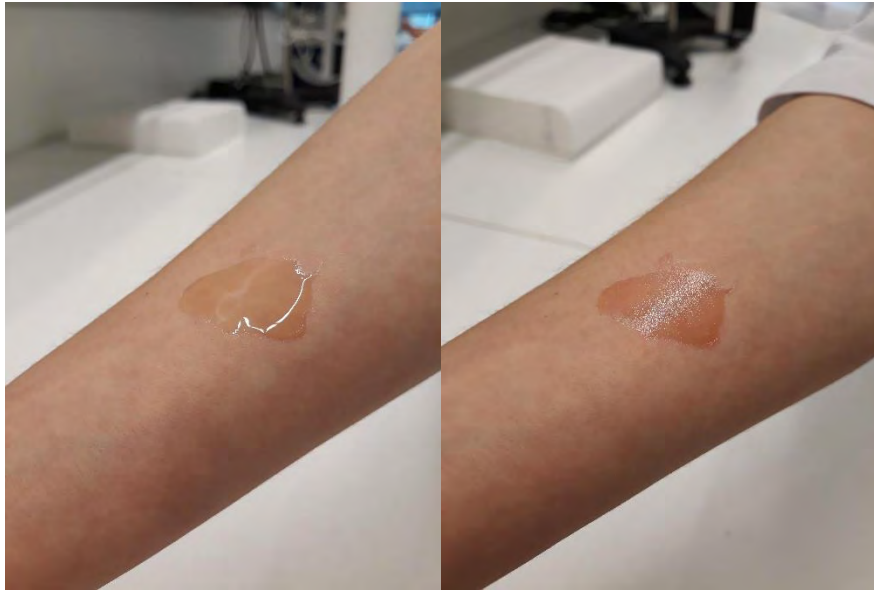
Σκοπός της τρίτης δοκιμής ήταν αρχικώς να μειωθεί κατά πολύ η προσθήκη του εκχυλίσματος (και άρα του ύδατος) ώστε τα προκύπτοντα φιλμ να είναι καλύτερης μορφής, καθώς είχε παρατηρηθεί ο σχηματισμός σταγονιδίων στην επιφάνεια τους μετά το πέρας κάποιων ημερών. Η αρχική προσθήκη επίσης της πρόπολης, έγινε καθώς παρατηρήθηκε ότι είναι αυτή που απαιτεί τον περισσότερο χρόνο ανάδευσης για να υπάρξει ένα ομοιογενές αποτέλεσμα ενώ επίσης δεν προστέθηκε το αιθέριο έλαιο για να παρατηρηθεί το κατά πόσο η παρουσία του επηρεάζει το ιξώδες του τελικού προϊόντος. Το σχηματιζόμενο προϊόν, CS-ALL 3, κρίνεται μη σταθερό λόγω των έντονων μεταβολών που παρατηρήθηκαν στο πέρας ενός μήνα. Και πάλι το pH μεταβάλλεται εντός αποδεκτών ορίων. Όσον αφορά το χρώμα του και την οσμή του, οι μεταβολές είναι εντονότερες ενώ οι αλλαγές στην υφή του αρχικού τζελ και η μεγάλη μείωση του ιξώδους του το καθιστούν απορριπτέο. Η αντιρριζική ικανότητά του και το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζουν μείωση στο πέρας της μελέτης σταθερότητας. Μάλιστα το φαινολικό φορτίο παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) κατά τη σύγκριση της αρχικής και της τελικής μέτρησης. Οι δοκιμές σχηματισμού των φιλμ ξεπερνούσαν και εδώ τα 20 λεπτά και δεν εμφάνιζαν καλή προσκολλητική ικανότητα.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα στην εφαρμογή του προϊόντος ήταν ότι ο χρόνος σχηματισμού του φιλμ ήταν αρκετά μεγάλος με συνέπεια να μειώνει την πρακτικότητα του σκευάσματος. Για το λόγο αυτό ακολουθήθηκε διαφορετική συνταγή η οποία συμπεριείχε νερό (υπερκάθαρο) και αιθανόλη ώστε να υπάρξει γρηγορότερη εξάτμιση

του διαλύτη και άρα μειωμένος χρόνος σχηματισμού φιλμ. Το σχηματιζόμενο προϊόν, CS-ALL 4, φαίνεται να δίνει καλύτερα αποτελέσματα καθώς η μορφολογία/εμφάνισή του είχε τις λιγότερες μεταβολές μέχρι στιγμής στο πέρασμα του χρόνου. Οι μεταβολές στο χρώμα του ήταν σχετικά έντονες καθώς στις υψηλότερες θερμοκρασίες σκούραινε σταδιακά ενώ όσον αφορά την οσμή του παρουσιάζει εξασθένηση στις ίδιες θερμοκρασίες. Το pH φαίνεται να έχει μεγαλύτερη διακύμανση αλλά το ιξώδες διατηρείται σχετικά υψηλό παρά το ότι μειώνεται. Η αντιρριζική ικανότητά του και το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζουν ελαφρά μείωση στο πέρας της μελέτης σταθερότητας. Οι δοκιμές σχηματισμού των φιλμ δεν ξεπερνούσαν τα 3 λεπτά και ταυτόχρονα εμφάνιζαν καλή προσκολλητική ικανότητα.

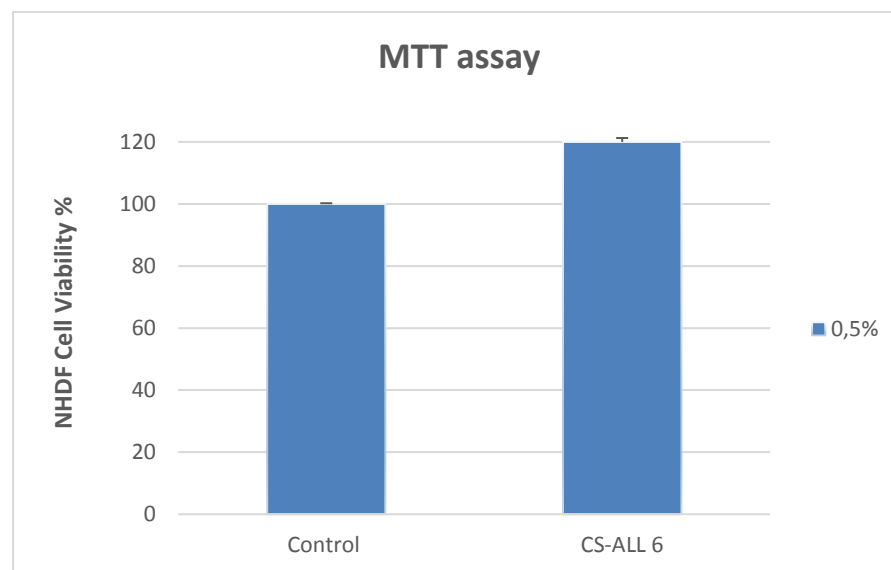
Το σχηματιζόμενο προϊόν, CS-ALL 5, φαίνεται να δίνει ακόμα καλύτερα αποτελέσματα καθώς η μορφολογία/εμφάνισή του είχε λίγες μεταβολές στο πέρασμα του χρόνου. Οι μεταβολές στο χρώμα του ήταν σχετικά έντονες καθώς στις υψηλότερες θερμοκρασίες σκούραινε σταδιακά ενώ όσον αφορά την οσμή του παρουσιάζει εξασθένηση στις ίδιες θερμοκρασίες. Το pH φαίνεται να βρίσκεται σε αποδεκτά όρια μεταβολής ενώ το ιξώδες παρόλο που μειώνεται διατηρείται σε υψηλά επίπεδα. Η αντιρριζική ικανότητά του και το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζουν μείωση στο πέρας της μελέτης σταθερότητας. Μάλιστα το φαινολικό φορτίο παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) κατά τη σύγκριση της αρχικής και της τελικής μέτρησης. Οι δοκιμές σχηματισμού των φιλμ δεν ξεπερνούσαν τα 3 λεπτά και ταυτόχρονα εμφάνιζαν καλή προσκολλητική ικανότητα.

Το σχηματιζόμενο προϊόν, CS-ALL 6, φαίνεται να δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα καθώς η μορφολογία/εμφάνισή του είχε και τις λιγότερες μεταβολές στο πέρασμα του χρόνου. Οι μεταβολές στο χρώμα του ήταν σχετικά ήπιες με ελαφρά και σταδιακή αύξηση της έντασης στις υψηλότερες θερμοκρασίες ενώ όσον αφορά την οσμή του παρουσιάζει εξασθένηση στις ίδιες θερμοκρασίες. Το pH φαίνεται να βρίσκεται σε αποδεκτά όρια μεταβολής ενώ το ιξώδες παρόλο που μειώνεται διατηρείται σε υψηλά επίπεδα. Η αντιρριζική ικανότητά του και το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο παρουσιάζουν ελαφρά μείωση στο πέρας της μελέτης σταθερότητας. Ταυτόχρονα το προϊόν αυτό παρουσιάζει τα βέλτιστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, δηλαδή συνδυάζει ευχάριστη οσμή και τον σχηματισμό του φιλμ σε κάτω από 4 λεπτά για εφαρμογή σε περιοχή κύκλου με ακτίνα 2 εκατοστά σε όλες τις θερμοκρασίες και σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Τέλος δίνει διάφανο και ελαφρώς κιτρινωπό φιλμ με καλή προσκολλητική ικανότητα.



Εικόνα 15. Διακρίνεται ο σχηματισμός του φιλμ. Στην αριστερή εικόνα φαίνεται η εφαρμογή του τζελ σε χρόνο μηδέν και στη δεξιά εικόνα φαίνεται το σχηματιζόμενο φιλμ έπειτα από έξι λεπτά.

Επίσης όπως έχει ήδη αναφερθεί η δοκιμή του CS-ALL 6 ήταν αυτή που πληρούσε τα περισσότερα επιθυμητά χαρακτηριστικά, οπότε και μελετήθηκε ως προς τη κυτταροτοξικότητά της.

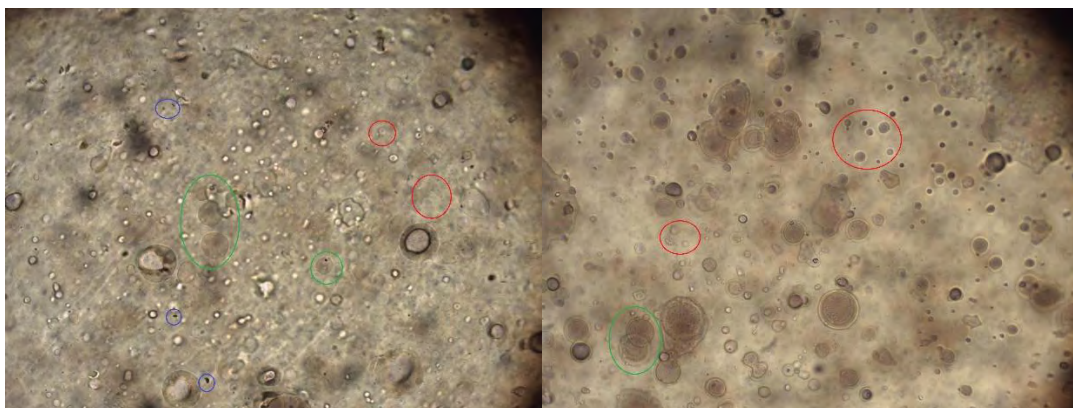


Διάγραμμα 11. Παρουσίαση αποτελεσμάτων βιωσιμότητας των κυττάρων NHDF έπειτα από MTT δοκιμή για το CS-ALL 6.

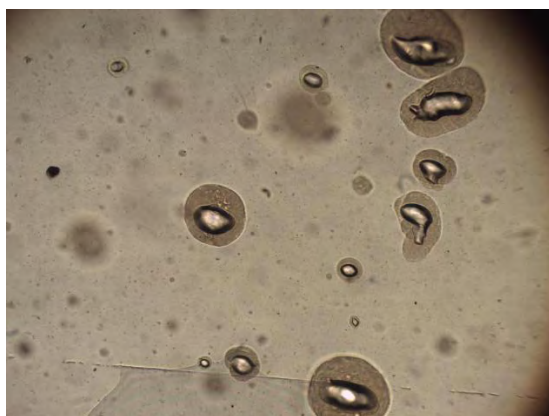
Ελέγχθηκε η κυτταροτοξικότητα του CS-ALL 6 σε primary ανθρώπινους ινοβλάστες (NHDF) σε ποσότητα 0,5%. Η υψηλότερη τιμή του προϊόντος σε σχέση με το control όσον αφορά τη βιωσιμότητα των κυττάρων δείχνει πως η εφαρμογή του CS-ALL 6 δρα θετικά στο μεταβολισμό των κυττάρων ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό τους και κατ' επέκταση τη βιωσιμότητά τους.

3.2.2.1 Φωτογραφίες μικροσκοπίου σύγκρισης των CS-ALL

Οι φωτογραφίες μικροσκοπίου των σχηματιζόμενων φιλμ ελήφθησαν σε χρόνο $T=0$ αμέσως μετά την παρασκευή των προϊόντων CS-ALL. Για τις δοκιμές CS-ALL 4 - CS-ALL 6, οι οποίες ήταν οι περισσότερο υποσχόμενες, ελήφθησαν και από τα τζελ πριν το σχηματισμό των φιλμ. Να σημειωθεί ότι σε κύκλο χρώματος μπλε επισημαίνονται τα σωματίδια πρόπολης, σε κόκκινο τα σταγονίδια εκχυλισμάτων και με πράσινο αυτά των αιθέριων ελαίων. Τα παραπάνω επισημαίνονται όπου υπάρχει η δυνατότητα διάκρισης.



Εικόνα 16. Στα αριστερά διακρίνεται η επιφάνεια του φιλμ του CS-ALL 1 και στα δεξιά του CS-ALL 2.



Εικόνα 17. Διακρίνεται η επιφάνεια του φιλμ του CS-ALL 3.



Εικόνα 18. Στα αριστερά διακρίνεται η επιφάνεια του φιλμ του CS-ALL 4 και στα δεξιά η επιφάνεια του αντίστοιχου τζελ.



Εικόνα 19. Στα αριστερά διακρίνεται η επιφάνεια του φιλμ του CS-ALL 5 και στα δεξιά η επιφάνεια του αντίστοιχου τζελ.

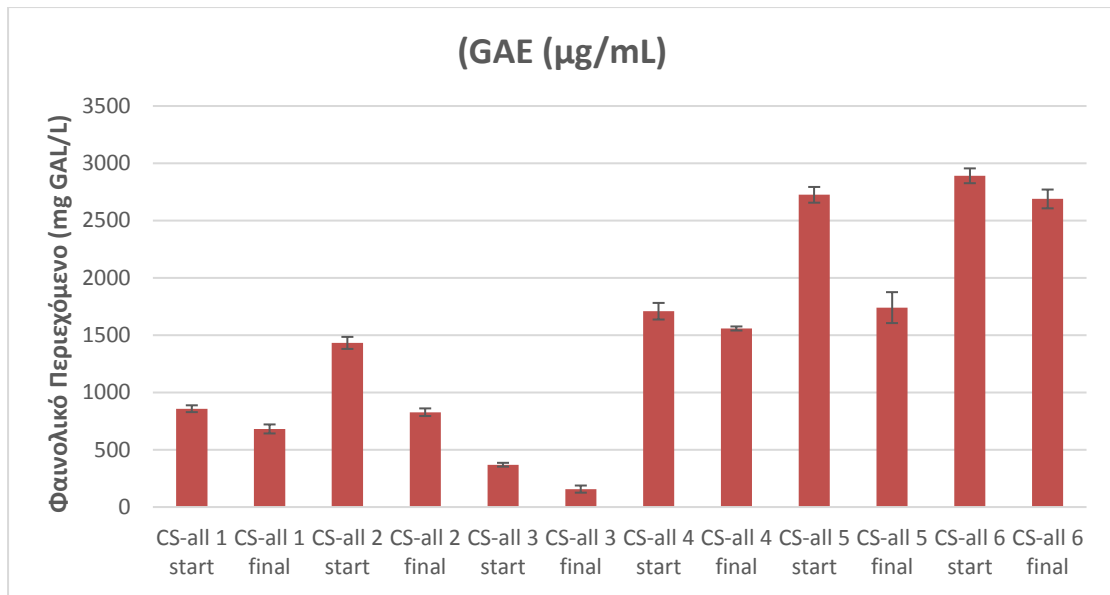


Εικόνα 20. Στα αριστερά διακρίνεται η επιφάνεια του φιλμ του CS-ALL 6 και στα δεξιά η επιφάνεια του αντίστοιχου τζελ.

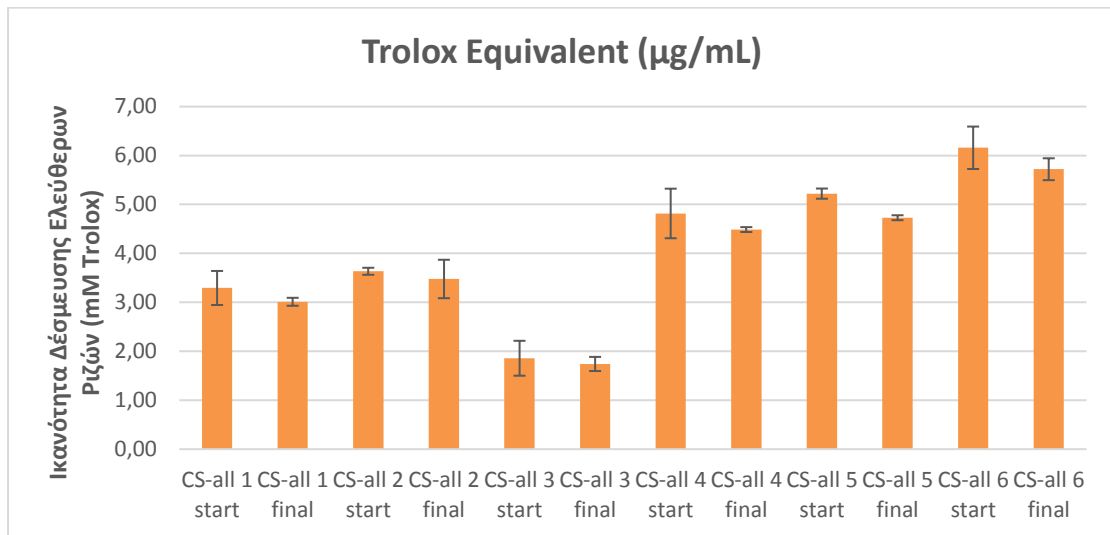
Μια γενική παρατήρηση είναι πως οι τελευταίες δοκιμές και ειδικά αυτή του CS-ALL 6 εμφανίζουν ομοιότητα μεταξύ του σχηματιζόμενου φιλμ και του αντίστοιχου τζελ από το οποίο προήλθε. Επίσης οι τελευταίες δοκιμές δίνουν μια πιο ομοιόμορφη επιφάνεια το οποίο παρατηρείται και οπτικά αλλά επιβεβαιώνεται και από την εικόνα του μικροσκοπίου.

3.2.2.II Σύγκριση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου και της ικανότητας δέσμευσης των ελευθέρων ριζών των CS-ALL

Σκοπός της σύγκρισης είναι να εντοπιστεί η πιο αποδοτική συνταγή όσον αφορά τη περιεκτικότητα σε συνολικό φαινολικό περιεχόμενο καθώς μέσα σε αυτό ανήκουν και οι υδροξυκιναμικές ουσίες των οποίων η αντιερπητική δράση ζητείται. Στη συνέχεια δίνεται και το συγκριτικό διάγραμμα της αντιρριζικής ικανότητας των προϊόντων CS-ALL.



Διάγραμμα 12. Σύγκριση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου και κατά επέκταση των υδροξυκινηματικών ουσιών μεταξύ των προϊόντων CS-ALL.



Διάγραμμα 13. Σύγκριση της ικανότητας δέσμησης ελεύθερων ριζών μεταξύ των προϊόντων CS-ALL.

4. ΜΕΛΕΤΗ ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΕΡΠΗΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Η μελέτη σκοπιμότητας αποτελεί την ανάλυση στοιχείων και πληροφοριών για το πόσο επιτυχώς μπορεί να ολοκληρωθεί ένα νέο εγχείρημα, προσμετρώντας κρίσιμους παράγοντες που επρόκειτο να επηρεάσουν την έκβαση. Παρακάτω δίνεται η σύνοψη της μελέτης σκοπιμότητας του μελετώμενου αντιερπητικού προϊόντος ενώ στο **Παράρτημα 2** υπάρχει η αναλυτική μορφή της, με όλες τις λεπτομέρειες.

Το αντιερπητικό προϊόν της παρούσας εργασίας αποτελεί μια λύση στον επιχειλίο έρπητα. Η ανάγκη της αγοράς εντοπίζεται συγκεκριμένα στην ανεπαρκή συνδυαστική και πολλαπλή αποτελεσματικότητα για την αντιμετώπιση του επιχειλίου έρπητα από ένα φυσικό προϊόν, εύκολης εφαρμογής, εταιρείας με ισχυρή εμπιστοσύνη των καταναλωτών, του οποίου η παρουσία θα είναι γνωστή λόγω του brand και θα διατίθεται μέσω πολλών αλλά εξειδικευμένων καναλιών διανομής. Υπάρχουν αρκετά προϊόντα τα οποία εμφανίζουν ικανοποιητικά χαρακτηριστικά σε έναν όμως από τους στόχους. Δεν υπάρχει ένα προϊόν που να συνδυάζει την αποτελεσματική αντιμετώπιση των συμπτωμάτων, την ταυτόχρονη καταστολή του ιού, το οποίο παράλληλα να εφαρμόζεται απλά, ανώδυνα και γρήγορα και να προσφέρει μια διακριτική λύση στο σύγχρονο άνθρωπο. Δεν έχει, προς το παρόν, συνδυαστεί επιτυχώς η αποτελεσματικότητα με την πρακτικότητα και τη διακριτική λύση στο αισθητικό πρόβλημα.

Το αντιερπητικό προϊόν της παρούσας εργασίας έχει τη μορφή τζελ, είναι χρώματος μπεζ και λειτουργεί ως υγρό επίθεμα. Η σύσταση του περιέχει το πολυμερές χιτοζάνη, υδατικά εκχυλίσματα *Melissa officinalis* και *Prunella vulgaris*, βάμμα πρόπολης, αιθέρια έλαια *Thymus vulgaris* και *Mentha piperita* και βρίσκεται σε συσκευασία των 7 g η οποία διαθέτει στην άκρη εφαρμογής μεταλλική σφαίρα. Η μεταλλική σφαίρα αποσκοπεί στην πιο ομοιόμορφη κατανομή του προϊόντος στην παθούσα περιοχή ανώδυνα και εύκολα ενώ ταυτόχρονα προσφέρει μαζί με την βοήθεια του αιθέριου ελαίου της *Mentha piperita* την αίσθηση δροσιάς. Έπειτα από την εφαρμογή του στην παθούσα περιοχή σχηματίζει διάφανο υποκίτρινο φιλμ, ελκυστικής υφής, εντός 1-2 λεπτών, ανάλογα με την ποσότητα εφαρμογής, το οποίο παραμένει ακέραιο για μεγάλο χρονικό διάστημα ανακουφίζοντας άμεσα τα συμπτώματα του κνησμού και του καύσου, προστατεύοντας μηχανικά τη πληγή, αποτρέποντας τη μικροβιακή / ιική μόλυνση των γύρω περιοχών, επιτρέποντας την «αναπνοή» της περιοχής, δηλαδή τη φυσιολογική ανταλλαγή όλων των απαραίτητων ουσιών, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί πηγή διανομής θεραπευτικών αντιερπητικών παραγόντων. Το συγκριτικό πλεονέκτημά του είναι ο συνδυασμός των εξής χαρακτηριστικών:

- Της συνεργιστικής δράσης των προαναφερθέντων συστατικών για άμεση ανακούφιση των συμπτωμάτων, αντιερπητική δράση και ταχύτερη επούλωση
- Της εύκολης, ανώδυνης εφαρμογής χωρίς την άμεση επαφή με τα χέρια και τον κίνδυνο της περαιτέρω μόλυνσης
- Του αισθητικού αποτελέσματος και των ευχάριστων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών
- Των φυσικών πρώτων υλών της ελληνικής γης
- Το ότι είναι φιλικό προς το περιβάλλον

- Και τέλος της εμπιστοσύνης των καταναλωτών στην APIVITA.

Όσον αφορά τον ανταγωνισμό υπάρχουν τρεις μεγάλες κατηγορίες προϊόντων:

1. Οι ανθικές φαρμακευτικές κρέμες: αποτελούν την ενδεδειγμένη φαρμακευτική λύση στο πρόβλημα. Με εξαίρεση την Fenivir Tinted η οποία έχει χρώμα για την κάλυψη της ερυθρότητας, οι υπόλοιπες είναι λευκού-υποκίτρινου χρώματος δίνοντας ένα όχι και τόσο αισθητικό αποτέλεσμα.
2. Τα επιθέματα: ο συνήθης τρόπος δράσης είναι η παρεμπόδιση ανάπτυξης της πληγής, η δημιουργία νέου δέρματος κάτω από το επίθεμα και η ταυτόχρονη απορρόφηση εκκριμάτων. Πολλά μάλιστα είναι εμπλουτισμένα με διάφορα φυτικά εκχυλίσματα. Το μειονέκτημα τους είναι ο σχετικά δύσκολος τρόπος εφαρμογής και αφαίρεσής τους. Μια καινούρια τεχνολογία είναι τα υγρά επιθέματα που σε κάποιες περιπτώσεις συμπεριέχουν και άλλες ουσίες και τα οποία ξεπερνούν τα προβλήματα εφαρμογής των αυτοκόλλητων επιθεμάτων.
3. Οι φυτικές κρέμες: είναι εμπλουτισμένες με εκχυλίσματα, αιθέρια έλαια, επούλωτικές και αναπλαστικές βιταμίνες, αντηλιακά φίλτρα και άλλα συστατικά.

Δεν θα πρέπει να αμεληθεί ο έμμεσος ανταγωνισμός ο οποίος αντιπροσωπεύεται στη συγκεκριμένη περίπτωση από τον θεσμό του “Do It Yourself” (DIY) σε πολλά θέματα περιποίησης ακόμα και θεραπείας παθήσεων. Με μια γρήγορη αναζήτηση στο ίντερνετ μπορεί κάποιος να συναντήσει πολλά «σπιτικά γιατροσόφια» που υπόσχονται ανακούφιση και γρηγορότερη επούλωση του επιχείλιου έρπητα με αποτέλεσμα αρκετοί καταναλωτές να στρέφονται σε αυτά αλλά με αντίθετα από τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

Η στοχευμένη σκιαγράφηση του αντιπροσωπευτικού καταναλωτή, όσον αφορά τις ανάγκες και τα χαρακτηριστικά του, θα προσδώσει τρομερό συγκριτικό πλεονέκτημα τόσο στο νέο προϊόν όσο και στην εταιρεία. Ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση των δυναμικών πελατών είναι η κατηγοριοποίηση στα ακόλουθα τρία επίπεδα:

1. Total Available Market (TAM): είναι το σύνολο που περιλαμβάνει όλους όσους θα επιθυμούσε η εταιρεία να προσεγγίσει με το συγκεκριμένο αντιερπητικό προϊόν χωρίς κανένα γεωγραφικό περιορισμό, δηλαδή όσοι έχουν επιχείλιο έρπητα. Το μερίδιο αυτό της αγοράς ανέρχεται προσεγγιστικά στα 769,85 εκατομμύρια ευρώ.
2. Served Available Market (SAM): αποτελεί υποσύνολο του TAM, στο οποίο στοχεύει κυρίως η εταιρεία, δηλαδή όσοι έχουν επιχείλιο έρπητα σε ευρωπαϊκό επίπεδο και χρησιμοποιούν κάποια θεραπεία με σκοπό την αποτελεσματική αντιμετώπισή του. Το μερίδιο αγοράς του SAM φτάνει κατά προσέγγιση τα 153,97 εκατομμύρια ευρώ.
3. Share Of the Market (SOM): αποτελεί υποσύνολο του SAM, το οποίο μπορεί ρεαλιστικά να προσεγγίσει η εταιρεία άμεσα και σε βραχυπρόθεσμο ορίζοντα και το μερίδιο αγοράς του ανέρχεται στο ποσό των 13,86 εκατομμυρίων ευρώ σε εύρος πενταετίας με μεσοσταθμική αύξηση της τάξης του 9% το διάστημα αυτό. Το εκτιμώμενο ύψος των πωλήσεων κατά την πρώτη πενταετία ανέρχεται στα 138,60 εκατομμύρια ευρώ, με τιμή προϊόντος 10,00 ευρώ / τεμάχιο

Για τον υπολογισμό των παραπάνω αντλήθηκαν στοιχεία από την έρευνα του “Future Market Insights” για το μέγεθος της αγοράς των προϊόντων για τον επιχειρίλιο έρπητα του έτους 2017.

Η ανάλυση της αγοράς του κλάδου είναι ένα ακόμη καθοριστικό στοιχείο στην μελέτη σκοπιμότητας. Πέραν από τη συμπεριφορά και τις τάσεις που ακολουθούν οι καταναλωτές, οι οποίες συνοψίζονται στην περιβαλλοντική συνείδηση, την προαγωγή της υγείας τους, το εισόδημα, το φύλο, την ηλικία, την εποχικότητα, τη μόδα, τη πιστότητα στη μάρκα (brand loyalty) και τέλος την επιλογή καινοτόμων προϊόντων που προάγουν την αειφόρο βιωσιμότητα και έχουν αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα, πολύ σημαντικός παράγοντας που πρέπει να εξεταστεί είναι το μέγεθος και οι συνθήκες της αγοράς. Σύμφωνα με έρευνα του “Future Market Insights” η παγκόσμια αγορά για τη θεραπεία του επιχειρίλιου έρπητα αναμένεται να αυξηθεί με CAGR 4,6% την περίοδο 2017-2027.

Το αντιερπητικό προϊόν θα μπορεί να προωθηθεί στην αγορά μέσω των ήδη υφιστάμενων καναλιών διανομής προϊόντων της APIVITA, τα οποία είναι:

1. Τα φαρμακεία και οι φαρμακαποθήκες
2. Η επιλεκτική διανομή σε αλυσίδες και καταστήματα καλλυντικών
3. Τα experience stores που ανήκουν στην APIVITA και αποτελούν σημεία άμεσης διανομής
4. Τα travel retails
5. Το e-commerce

Από την οικονομική μελέτη που διεξήχθη προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

1. Η παραγωγή του νέου αντιερπητικού προϊόντος έχει μικρές απαιτήσεις όσον αφορά τον επιπρόσθετο εξοπλισμό όπως την αγορά ενός βιομηχανικής κλίμακας συμπυκνωτή, με στόχο την συμπύκνωση των εκχυλισμάτων πριν την εισαγωγή τους στο προϊόν. Η εταιρεία θα μπορούσε να πραγματοποιήσει την παραπάνω αγορά με δικούς της πόρους.
2. Το κόστος του τελικού συσκευασμένου προϊόντος ανέρχεται στα 1,861 ευρώ ενώ η τελική τιμή πώλησης στα 10,00 ευρώ.
3. Υπολογίζοντας το νεκρό σημείο προκύπτει ότι η εταιρεία για να αποκομίσει κέρδος θα πρέπει να διαθέσει περισσότερα από 15530 προϊόντα σε διάστημα ενός έτους.

Τέλος διερευνήθηκε το νομικό πλαίσιο του προϊόντος, το οποίο χαρακτηρίστηκε ως ιατροτεχνολογικό προϊόν. Το παρόν διάστημα, όσον αφορά τη νομοθεσία που διέπει αυτά τα προϊόντα, είναι μεταβατικό και μέχρι την ημερομηνία εφαρμογής του νέου κανονισμού (ΕΕ) 2017/745 για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα στις 26 Μαΐου του 2020 θα πρέπει να έχουν ολοκληρωθεί όλες οι απαραίτητες ενέργειες συμμόρφωσης. Η εξειδικευμένη γνώση τόσο για την κατάταξη του αντιερπητικού προϊόντος όσο και για τις απαραίτητες νομοθετικές απαιτήσεις απαιτεί την ανάθεση των παραπάνω διεργασιών σε έναν Contract Research Organization (CRO) ώστε να δοθούν οι κατάλληλες κατευθύνσεις.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η παρασκευή ενός αντιερπητικού προϊόντος. Αρχικώς μελετήθηκαν τα εκχυλίσματα τα οποία θα ενσωματώνονταν στην τελική σύνθεση. Από την ποσοτικοποίηση των αντιερπητικών δραστικών ουσιών του εκχυλίσματος των εναέριων τμημάτων της *Melissa officinalis*, με τη χρήση της HPLTC, προέκυψε ότι το φυτό περιείχε ροσμαρινικό, καφεϊκό και ρ-κουμαρικό οξύ σε ποσοστό $4,9 \pm 0,65$, $0,6 \pm 0,14$ και $0,1 \pm 0,01$ αντίστοιχα. Από την ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου σε υδατάνθρακες του εκχυλίσματος των εναέριων τμημάτων και των ριζών του φυτού της *Prunella vulgaris* με τη μέθοδο της φαινόλης-θειικού οξέος προέκυψε ότι η περιεκτικότητά του σε αυτό ανερχόταν σε περίπου 11,5%, υποδεικνύοντας έτσι την ύπαρξη του πολυσακχαρίτη με πιθανή αντιερπητική δράση ενώ από την ποιοτική ανίχνευση του φυτού με τη χρήση της HPLTC σε συγκεκριμένες βιοδραστικές ουσίες ανιχνεύθηκε το ροσμαρινικό οξύ. Τα εκχυλίσματα των εναέριων τμημάτων των δύο παραπάνω φυτών κρίθηκαν σταθερά με καλή αντιρριζική ικανότητα η οποία συνάδει με το υψηλό φαινολικό περιεχόμενο. Επιπλέον τα εκχυλίσματα δεν έδειξαν κυτταροτοξικότητα. Από τις έξι δοκιμές για το τελικό προϊόν, η πιο πολλά υποσχόμενη κρίθηκε η CS-ALL 6, η σύσταση της οποίας αποτελούνταν από υπερκάρθαρο νερό 47,5%, αιθανόλη 40%, χιτοζάνη 3%, γαλακτικό οξύ 4%, 1,3-προπανεδιόλη 2%, τα δραστικά συστατικά [*M. officinalis*: *P. vulgaris*: πρόπολη σε αναλογία 1:1:1] σε ποσοστό 3% και τέλος τα αιθέρια έλαια *Thymus vulgaris* και *Mentha piperita* σε ποσοστά 0,35% και 0,15% αντίστοιχα. Το υδατικό διάλυμα γαλακτικού οξέος κρίθηκε ως ο καταλληλότερος διαλύτης έπειτα από μια σειρά δοκιμών μεταξύ αυτού και των υδατικών διαλυμάτων οξικού και ασκορβικού οξέος καθώς δεν είχε την έντονη μυρωδιά του πρώτου ενώ παρέμενε σταθερό, χωρίς να οξειδώνεται, σε σύγκριση με το δεύτερο. Η παρασκευή του CS-ALL 6 επιτεύχθηκε με τη χρήση του Silverson σε χρονικό διάστημα, μόλις τριών ωρών και 55 λεπτών. Το προϊόν αυτό εμφάνιζε ικανοποιητικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, ικανότητα σχηματισμού φιλμ σε εύρος κάτω των πέντε λεπτών-εξαρτώμενο πάντα από την εφαρμοζόμενη ποσότητα- και δυναμικό ενίσχυσης της κυτταρικής βιωσιμότητας. Η ενδεικτική τιμή του ανέρχεται στα 10,00 ευρώ και συνδυάζει την πληθώρα των χαρακτηριστικών που επιθυμεί ο καταναλωτής: 1) αντιική δράση 2) διακριτικό αισθητικό αποτέλεσμα 3) άμεση ανακούφιση συμπτωμάτων 4) ταχύτερη επούλωση 5) εύκολη και γρήγορη εφαρμογή 6) αποφυγή μεταδοτικής μόλυνσης των γύρω περιοχών 7) άνεση κατά την εφαρμογή 8) εμπιστοσύνη στο brand 9) ευρεία διάθεση στα κανάλια διανομής. Τέλος ανήκει στην κατηγορία των ιατροτεχνολογικών προϊόντων και θα πρέπει να συμμορφώνεται με την αντίστοιχη νομοθεσία.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Αν και έχουν γίνει τα αρχικά στάδια μελέτης του νέου αντιερπητικού προϊόντος, με απώτερο σκοπό να βγει στην αγορά, απαιτείται περαιτέρω έρευνα ώστε να συμπληρωθεί με περισσότερα στοιχεία τα οποία θα αποδεικνύουν την αποτελεσματική δραστικότητα του έναντι του ιού HSV-1. Κρίνεται απαραίτητη η μελέτη της αντιερπητικής δράσης του προϊόντος σε κυτταροσειρές μολυσμένες με τον HSV-1, η πιθανή διευκρίνιση του μηχανισμού δράσης και η σύγκριση αυτής της δράσης με κάποια πρότυπη αντιική ουσία με αποδεδειγμένη δράση, για παράδειγμα την ακυκλοβίρη. Είναι επίσης χρήσιμη η διευκρίνιση του βέλτιστου συνδυασμού των ποσοτήτων των εκχυλισμάτων, αιθέριων ελαίων και της πρόπολης καθώς και των περιεχόμενων δραστικών συστατικών τους ώστε να υπάρχει το επιθυμητό αντιερπητικό αποτέλεσμα αλλά χωρίς κυτταροτοξικότητα. Ένα ακόμη σημείο διευκρίνισης αποτελεί και ο καθορισμός της ποσότητας του προϊόντος που πρέπει να εφαρμοστεί στο σημείο των ερπητικών ελκών ώστε να επιφέρει την επιθυμητή δράση. Απαιτείται επίσης η *in vitro* μελέτη διάχυσης των περιεχόμενων στο φιλμ δραστικών ουσιών, με τη βοήθεια του κυττάρου Franz, με σκοπό να διευκρινιστεί το προφίλ απελευθέρωσης αυτών. Έπεται η *ex vivo* μελέτη διαπερατότητας των συστατικών για τη μελέτη της επίδρασης του δερματικού φραγμού στο σχηματιζόμενο φιλμ και τέλος η διεξαγωγή της μελέτης απορρόφησης των συστατικών από το δέρμα. Έλεγχοι για την εκτίμηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του φιλμ όπως το πόσο εύκαμπτο και ευπροσάρμοστο στις κινήσεις είναι, οι μηχανικές ιδιότητες του φιλμ, ο καθορισμός της διαπερατότητας των υδρατμών, η ικανότητα παραμονής του φιλμ στο δέρμα, η χημική ομοιογένεια του και η πιθανή ενσωμάτωση αντηλιακών φίλτρων αποτελούν πρόκληση βελτίωσης δίνοντας στο προϊόν ακόμα μεγαλύτερο προβάδισμα στην αγορά. Επόμενο στάδιο αποτελεί η διαχείριση του νομικού πλαισίου που διέπει το προϊόν χαρακτηριζόμενο ως ιατροτεχνολογικό και οι απαραίτητες κινήσεις που πρέπει να επακολουθήσουν για τη τελική εμπορική αξιοποίησή του.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Altiok D., Altiok E., Tihminlioglu F., (2010) Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 2227–2236.
- Aranaz I., Acosta N., Civera C., Elorza B., Mingo J., Castro, C., ... Caballero, A. H., (2018) Cosmetics and cosmeceutical applications of chitin, chitosan and their derivatives. *Polymers*, 10, 213.
- Arceusz A., Wesolowski M., (2013) Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 83, 215–220.
- Astani A., Navid M. H., Schnitzler P., (2014) Attachment and Penetration of Acyclovir-resistant Herpes Simplex Virus are Inhibited by *Melissa officinalis* Extract, *Phytotherapy Research*, 28, 1547-1552.
- Astani A., Reichling J., Schnitzler P., (2012) *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of herpes simplex virus *in vitro*. *Chemotherapy*, 58, 70–77.
- Azuma K., Izumi R., Osaki T., Ifuku S., Morimoto M., Saimoto, H., ... Okamoto, Y., (2018) *Chitin, Chitosan, and Its Derivatives for Wound Healing: Old and New Materials*. *Journal of Functional Biomaterials*, 9, 38.
- Bai Y., Xia B., Xie W., Zhou Y., Xie J., Li, H., ... Li, C., (2016) Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Prunella*. *Food Chemistry*, 204, 483–496.
- Bankova V., Galabov A. S., Antonova D., Vilhelmova N., Di Perri, B., (2014) Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine*, 21, 1432–1438.
- Bansal S., Shaikh, S., Desai R., Ahmad I., Puri P., Prasad P., ... Gundre, D., (2017) Spectrum of lip lesions in a tertiary care hospital: An epidemiological study of 3009 indian patients. *Indian Dermatology Online Journal*, 8, 115-119.
- Bayaah Ahmad, S. N., (2018) Female Consumers' Attitude towards Natural Beauty Products: Malaysian Perspective. *The International Journal of Social Sciences and Humanities Invention*, 5, 5099–5102.
- Ceole L. F., Companhoni M. V. P., Sanches Lopes S. M., de Oliveira A. J. B., Gonçalves R. A. C., Dias Filho B. P., ... Ueda-Nakamura, T., (2018) Anti-herpes activity of polysaccharide fractions from *Stevia rebaudiana* leaves. *Natural Product Research*, 1–5.
- Chen Y., Zhu Z., Guo Q., Zhang L., Zhang X., (2012) Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Prunella vulgaris* L. related to plant parts and phenological stages. *Biological Research*, 45, 171–175.
- Chen P., Hwang Y. H., Kuo T., Liu F. H., Lai Y., Hsieh H. J., (2007) Improvement in

- the properties of chitosan membranes using natural organic acid solutions as solvents for chitosan dissolution. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 27, 23–28.
- Chiu L. C. M., Zhu W., Ooi V. E. C., (2004) A polysaccharide fraction from medicinal herb *Prunella vulgaris* downregulates the expression of herpes simplex virus antigen in Vero cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 63–68.
- Cseke J. L., Kirakosyan A., Kaufman B.P., Warber L. S., Duke A. J., Brielamnn L. H. (2006), *Natural Products from Plants*, 27-30, 2nd edn, Taylor & Francis Group, LLC, USA.
- Cunningham A., Griffiths P., Leone P., Mindel A., Patel R., Stanberry L., Whitley R., (2012) Current management and recommendations for access to antiviral therapy of herpes labialis. *Journal of Clinical Virology*, 53, 6-11.
- Demir C., Malyer, H., (2011) Determination of phenolic compounds in *Prunella L.* by liquid chromatography-diode array detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 1227–1230.
- El-Seedi H. R., El-Said A. M. A., Khalifa S. A. M., Göransson U., Bohlin, L., Borg-Karlson A. K., Verpoorte R., (2012) Chemistry, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10877–10895.
- European Medicines Agency, (2013) Assessment report on *Melissa officinalis* L., folium,(EMA/HMPC/169746/2012),Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC).
- Fatahzadeh M., Schwartz R. A., (2007) Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57, 737–763.
- Foutsizoglou S., (2017) Anatomy of the ageing lip. *The PFMA Journal*, 4, 2–4.
- Gaby, A. R., (2006). Natural remedies for Herpes simplex. *Alternative Medicine Review*, 11, 93–101.
- Galeotti N., Ghelardini C., Di, L., Mannelli C., Mazzanti G., Baghiroli L., Bartolini A., (2001) Local Anaesthetic activity of (+)- and (-) menthol, *Planta Med*, 67, 174–176.
- Ghosh T., Chattopadhyay K., Marschall M., Karmakar P., Mandal P., Ray, B., (2009) Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology*, 19, 2–15.
- Haitang X., Lie M., Haifei S., Changyou G., Chunmao H., (2007) Chitosan-hyaluronic acid hybrid film as a novel wound dressing: *in vitro* and *in vivo* studies. *Polymers for advanced technologies* 18, 869-875.
- Hazem A., Pitică-Aldea I. M., Popescu C., Matei L., Dragu D., Economescu M., ... Lupuliasa, D., (2017) The antiviral/virucidal effects of alcoholic and aqueous extracts with propolis. *Farmacia*, 65, 868–876.

- Homa F. L., Brown, J. C., (1997) Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Reviews in Medical Virology*, 7, 107–122.
- Jagur-Grodzinski, J., (2006). Nanostructured polyolefins / clay composites : role of the molecular interaction at the interface. *Polymers for Advanced Technologies*, 17, 395–418.
- Jayakumar R., Prabakaran M., Kumar P. T. S., Nair S. V, Tamura H., (2011) Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotechnology Advances*, 29, 322-337.
- Jin F., Zhuo C., He Z., Wang H., Liu W., Zhang R., Wang Y., (2015) Anti-herpes simplex virus activity of polysaccharides from *Eucheuma gelatinae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 453–460.
- Kathe K., Kathpalia, H., (2017) Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12, 487–497.
- Khan M. T. H., Ather A., Thompson K. D., Gambari, R., (2005) Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*, 67, 107–119.
- Khurshid K., Naseem M., Zafar M. S., Najeeb S., Zohaib S., (2017) Propolis: A natural biomaterial for dental and oral health care. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 4, 265– 274.
- Kuete V., Karaosmanoğlu O., Sivas H., (2017) Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*, 271–297.
- Kumar M., (2000) A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1–27.
- Kurokawa M., Shimizu T., Takeshita Y., Takamori Y., Kai H., Sawamura R., ... Shiraki, K., (2011) Efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-9.
- Κανονισμός (ΕΕ) 201/745 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 5^{ης} Απριλίου 2017 για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα, για την τροποποίηση της οδηγίας 2001/83/ΕΚ, του κανονισμού (ΕΚ) αριθμ. 178/2002 και του κανονισμού (ΕΚ) αριθμ. 1223/2009 και για την κατάργηση των οδηγιών του Συμβουλίου 90/385/ΕΟΚ και 93/45/ΕΟΚ.
- Mettenleiter T. C., (2004) Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Research*, 106, 167–180.
- Moradi M., Tajik H., Razavi Rohani S. M., Oromiehie A. R., Malekinejad H., Aliakbarlu J., Hadian, M., (2012) Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT - Food*

Science and Technology, 46, 477–484.

- Murray R. P., Rosenthal S. K., Phaller A. M., (2008) *Medical Microbiology* (Πρωτόπαπας Θ., Αστρέχα Δ., Γουδέλη Α., Καλόσακα Κ. μεταφρ.), 545-555, 5th edn, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού, Αθήνα.
- Nicola A. V., McEvoy A. M., Straus S. E., (2003) Roles for Endocytosis and Low pH in Herpes Simplex Virus Entry into HeLa and Chinese Hamster Ovary Cells. *Journal of Virology*, 77, 5324–5332.
- Opstelten W., Neven A. K., Eekhof J., (2012) Treatment and prevention of herpes labialis. *Canadian Family Physician*, 4, 1683-1687.
- Oh D. W., Kang J. H., Lee H. J., Han S. D., Kang M. H., Kwon Y. H., ... Park, C. W., (2017) Formulation and *in vitro* / *in vivo* evaluation of chitosan-based film forming gel containing ketoprofen. *Drug Delivery*, 24, 1056–1066.
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H., (2010) Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122, 161–166.
- Oryan A., Alemzadeh E., Moshiri A., (2018) Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 98, 469–483.
- Patil S., (2016) Proposed classification for the lip lesions (Dr. Patil's classification). *International Journal of Medicine and Public Health*, 6, 56.
- Patrulea V., Ostafe V., Borchard G., Jordan O., (2015) Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 417–426.
- Pergolizzi J. V., Taylor R., LeQuang J. A., Raffa R. B., (2018) The role and mechanism of action of menthol in topical analgesic products. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2018, 1-7.
- Psotová J., Kolář M., Soušek J., Švagera Z., Vičar, J., Ulrichová, J., (2003) Biological Activities of Prunella vulgaris Extract. *Phytotherapy Research*, 17, 1082–1087.
- Ramchandani M., Kong M., Tronstein E., Selke S., Mikhaylova A., Magaret A., ... Wald, A. (2017). Herpes Simplex Virus Type 1 shedding in tears and nasal and oral mucosa of healthy adults. *Journal of Sexually Transmitted Disease*, 43, 756–760.
- Rechia L. M., de Jesus Morona J. B., Zepon, K. M., Soldi V., Kanis L. A., (2010) Mechanical properties and total hydroxycinnamic derivative release of starch/glycerol/Melissa officinalis extract films. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46, 491–497.
- Romanazzi G., Gabler F. M., Margosan D., Mackey B. E., Smilanick J. L., (2009) Effect of Chitosan Dissolved in Different Acids on Its Ability to Control Postharvest Gray Mold of Table Grape. *Phytopathology*, 99, 1028–1036.

- Ryu S. Y., Lee C. K., Lee C. O., Kim H. S., Zee O. P. (1992) Antiviral triterpenes from *Prunella vulgaris*. *Archives of Pharmacal Research*, 15, 242–245.
- Satyal P., Murray B. L., Mcfeeters R. L., Setzer W. N., (2016) Essential Oil Characterization of *Thymus vulgaris* from Various Geographical Locations, *Foods*, 5, 1–12.
- Schnitzler P., Koch C., Reichling, J., (2007) Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop, and sandalwood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 1859–1862.
- Schnitzler P., Neuer A., Nolkemper S., Zundel C., Hans N., Sensch K. H. Reichling J., (2009) Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds, *Phytotherapy research*, 24, 20-28.
- Schuhmacher A., Reichling J., Schnitzler, P., (2003) Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*, *Phytomedicine*, 10, 504–510.
- Sezer A. D., Hatipoğlu F., Cevher E., Oğurtan Z., Baş A. L., Akbuğa J., (2007) Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and *in vitro* / *in vivo* evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 2, 1-8.
- Sharifi-Rad J., Salehi B., Schnitzler P., Ayatollahi S. A., Kobarfard F., Fathi M., Eisazadeh M., Sharifi-Rad M., (2017) Susceptibility of herpes simplex virus type 1 to monoterpenes thymol, carvacrol, p-cymene and essential oils of *Sinapis arvensis* L., *Lallemantia royleanna* Benth. and *Pulicaria vulgaris*. *Cellular and Molecular Biology (Noisy le Grand)*, 63, 41-46.
- Silva-Carvalho R., Baltazar F., Almeida-Aguiar C., (2015) Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–29.
- Singh B. B., Udani J., Vinjamury S. P., Der-Martirosian C., Gandhi S., Khorsan R., ... Singh, V., (2005) Safety and effectiveness of an L-lysine, zinc, and herbal-based product on the treatment of facial and circumoral herpes. *Alternative Medicine Review*, 10, 123–127.
- Singh R., Shushni M. A. M., Belkheir A., (2015) Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*, 8, 322–328.
- Siripatrawan U., Harte B. R., (2010) Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24, 770–775.
- Siripatrawan U., Noipha S., (2012) Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27, 102–108.
- Siripatrawan U., Vitchayakitti W., (2016) Improving functional properties of chitosan

- films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, 61, 695–702.
- Sogias I. A., Khutoryanskiy V. V., Williams A. C., (2010) Exploring the factors affecting the solubility of chitosan in water. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211, 426–433.
- Spear P. G., (2004) Herpes simplex virus: Receptors and ligands for cell entry. *Cellular Microbiology*, 6, 401–410.
- Szilagyi J. F., Cunningham, C., (1991) Identification and characterization of a novel non-infectious herpes simplex virus-related particle. *Journal of General Virology*, 72, 661–668.
- Taofiq O., González-Paramás A. M., Barreiro M. F., Ferreira I. C. F. R., McPhee, D. J., (2017) Hydroxycinnamic acids and their derivatives: Cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. *Molecules*, 22, 281.
- Tongnuanchan P., Benjakul, S., Prodpran T., (2012) Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry*, 134, 1571–1579.
- Wang W., Wang S. X., Guan H. S., (2012) The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: An overview. *Marine Drugs*, 10, 2795–2816.
- Whitley R. J., Roizman B., (2001) Herpes simplex virus infections review. *Lancet*, 357, 1513–1518.
- Wu J., Liu H., Ge S., Wang S., Qin Z., Chen L., ... Zhang Q., (2015) The preparation, characterization, antimicrobial stability and invitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. *Food Hydrocolloids*, 43, 427–435.
- Xu H. X., Lee S. H. S., Lee S. F., White R. L., Blay J., (1999) Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Research*, 44, 43–54.
- Yildirim A., Duran G. G., Duran N., Jenedi K., Bolgul B. S., Miraloglu M., Muz, M., (2016) Antiviral Activity of Hatay Propolis Against Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. *Medical Science Monitor*, 22, 422–430.
- Zhang Y., But P. P. H., Ooi V. E. C., Xu H. X., Delaney G. D., Lee S. H. S., Lee, S. F., (2007) Chemical properties, mode of action, and *in vivo* anti-herpes activities of a lignin-carbohydrate complex from *Prunella vulgaris*. *Antiviral Research*, 75, 242–249.
- Zivanovic S., Chi S., Draughon A., (2005) Antimicrobial Activity of Chitosan Films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70, 45–51.

Ηλεκτρονικές πηγές

WHO: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>

(Euro+Med (2006-): Euro+Med PlantBase - the information resource for Euro Mediterranean plant diversity. Published on the Internet <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed> / [accessed 15/5/2019]

<https://www.blistex.com/lip-tips/what-are-lips/>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Δίνονται οι πίνακες με τα δεδομένα από τη μελέτη σταθερότητας των δειγμάτων CS-ALL σε πλήρη ανάλυση.

Πίνακας 21. Μελέτη σταθερότητας της δοκιμής CS-ALL 1. Ένδειξη¹: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για καθίζηση της πρόπολης, μείωση ιξώδους και αλλοίωσης της υφής. Ένδειξη²: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για σχηματισμό ιζήματος πρόπολης, μείωση του ιξώδους, αλλοίωσης της υφής και εμφάνισης ιχνών λαδιών στην επιφάνεια. Ένδειξη³: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για αύξηση της έντασης του χρώματος. Όπου N.T.: Not Tested. Τα ιξώδη μετρούνται στις εξής συνθήκες: 0,6 grm, spindle 21 σε θερμοκρασία 22°C (Chen *et al.*, 2007). Όπου X, η αλλοίωση ήταν τέτοια που δεν επέτρεπε την μέτρηση.

CS-ALL 1	Παράμετροι	Εμφάνιση	Χρώμα	Οσμή	pH	Ιξώδες	DPPH (mM Trolox equiv.)	TPC (mg G/L)
Εβδομάδα								
T=0		Υδαρές τζελ	Μπεζ-ανοιχτό καφέ	Έντονη θυμαριού και πρόπολης	5,00	83,3 cps στο 0,1%	Αραίωση 1:10 3,29	Αραίωση 1:10 858
1η	5-7 °C	9	9	9	4,93	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	8 ¹	9	9	4,95	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	8 ¹	9	9	4,97	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	8 ¹	9	9	4,95	N.T.	N.T.	N.T.
	45 °C	8 ¹	8 ³	9	4,93	N.T.	N.T.	N.T.
	50 °C	8 ¹	8 ³	9	4,91	N.T.	N.T.	N.T.
2η	5-7 °C	8 ¹	9	9	4,99	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	7 ¹	9	9	5,04	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	7 ¹	9	9	5,01	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	7 ¹	8 ³	9	5,00	N.T.	N.T.	N.T.
	45 °C	7 ¹	8 ³	9	4,97	N.T.	N.T.	N.T.
	50 °C	7 ¹	8 ³	9	5,02	N.T.	N.T.	N.T.
3η	5-7 °C	7 ¹	9	9	4,96	X	N.T.	N.T.
	25 °C	6 ¹	9	9	5,00	X	Αραίωση 1:10 3,01	Αραίωση 1:10 682
	UV	6 ¹	9	9	4,96	X	N.T.	N.T.
	38 °C	6 ²	7 ³	9	4,93	X	N.T.	N.T.
	45 °C	6 ²	7 ³	9	4,93	X	N.T.	N.T.
	50 °C	6 ²	7 ³	9	4,93	X	N.T.	N.T.

Πίνακας 22. Μελέτη σταθερότητας της δοκιμής CS-ALL 2. Ένδειξη¹: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για μείωση ιξώδους και εμφάνισης ιχνών λαδιών στην επιφάνεια. Ένδειξη²: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για μείωση ιξώδους και εμφάνισης ιχνών λαδιών και νερών στην επιφάνεια. Ένδειξη³: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για μείωση ιξώδους, εμφάνισης ιχνών λαδιών και νερών στην επιφάνεια καθώς και ιζήματος πρόπολης. Ένδειξη⁴: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την αύξηση της έντασης του χρώματος. Ένδειξη⁵: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την εξασθένηση της οσμής. Όπου N.T.: Not Tested. Τα ιξώδη μετρούνται στις εξής συνθήκες: 0,6 rpm, spindle 21 σε θερμοκρασία 22°C (Chen *et al.*, 2007). Όπου X, η αλλοίωση ήταν τέτοια που δεν επέτρεπε την μέτρηση. Τιμές στο προϊόν με τον ίδιο λατινικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

CS-ALL 2	Παράμετροι	Εμφάνιση	Χρώμα	Οσμή	pH	Ιξώδες	DPPH (mM Trolox equiv.)	TPC (mg GAL)
Εβδομάδα		Υδαρές τζελ	Μπεζ-ανοιχτό καφέ	Έντονη θυμαριού-πρόπολης	4,61	1917 cps στο 2,2%	Αραίωση 1:10 3,63	Αραίωση 1:10 1433 ^a
T=0								
1η	5-7 °C	8 ¹	9	8 ⁵	4,59	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	8 ¹	9	9	4,64	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	9	9	8 ⁵	4,64	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	8 ¹	8 ⁴	8 ⁵	4,56	N.T.	N.T.	N.T.
	45 °C	8 ¹	7 ⁴	8 ⁵	4,53	N.T.	N.T.	N.T.
	50 °C	8 ¹	6 ⁴	8 ⁵	4,56	N.T.	N.T.	N.T.
2η	5-7 °C	8 ¹	9	8 ⁵	4,59	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	8 ¹	8 ⁴	9	4,58	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	8 ¹	8 ⁴	8 ⁵	4,58	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	7 ¹	6 ⁴	8 ⁵	4,50	N.T.	N.T.	N.T.
	45 °C	7 ¹	6 ⁴	8 ⁵	4,51	N.T.	N.T.	N.T.
	50 °C	7 ¹	9	8 ⁵	4,51	N.T.	N.T.	N.T.
3η	5-7 °C	8 ²	8 ⁴	8 ⁵	4,63	1167 cps στο 1,4%	N.T.	N.T.
	25 °C	8 ²	8 ⁴	9	4,64	250 cps στο 0,3%	Αραίωση 1:10 3,48	Αραίωση 1:10 828 ^a
	UV	8 ²	8 ⁴	8 ⁵	4,63	333,3 cps στο 0,4%	N.T.	N.T.
	38 °C	7 ³	6 ⁴	8 ⁵	4,52	X	N.T.	N.T.
	45 °C	7 ³	6 ⁴	8 ⁵	4,52	X	N.T.	N.T.
	50 °C	7 ³	6 ⁴	8 ⁵	4,53	X	N.T.	N.T.

Πίνακας 23. Μελέτη σταθερότητας της δοκιμής CS-ALL 3. Ένδειξη¹: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για σχηματισμό ιζήματος πρόπολης και μείωσης του ιξώδους. Ένδειξη²: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για σχηματισμό ιζήματος πρόπολης, μείωση του ιξώδους και εμφάνισης ιχνών λαδιών και νερών στην επιφάνεια. Ένδειξη³: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την αύξηση της έντασης του χρώματος και τη μετατροπή του σε σκούρο. Ένδειξη⁴: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την μείωση της έντασης της οσμής. Όπου N.T.: Not Tested. Τα ιξώδη μετρούνται στις εξής συνθήκες: 0,6 grm, spindle 21 σε θερμοκρασία 22°C (Chen *et al.*, 2007). Όπου X, η αλλοίωση ήταν τέτοια που δεν επέτρεπε την μέτρηση. Τιμές στο προϊόν με τον ίδιο λατινικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

CS-ALL 3	Παράμετροι	Εμφάνιση	Χρώμα	Οσμή	pH	Ιξώδες	DPPH (mM Trolox equiv.)	TPC (mg GA/L)
Εβδομάδα								
T=0		Τζελ	Διάφανο μελί με κομματάκια πρόπολης	Πρόπολης	4,59	2417 cps στο 2,9%	Αραίωση 1:10 1,86	Αραίωση 1:10 369 ^a
1η	5-7 °C	8 ¹	9	9	4,58	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	8 ¹	9	9	4,58	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	8 ¹	9	9	4,56	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	8 ¹	8 ³	9	4,54	N.T.	N.T.	N.T.
	45 °C	8 ¹	8 ³	8 ⁴	4,55	N.T.	N.T.	N.T.
	50 °C	8 ¹	8 ³	8 ⁴	4,52	N.T.	N.T.	N.T.
2η	5-7 °C	8 ¹	9	9	4,57	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	8 ¹	8 ³	9	4,53	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	8 ¹	8 ³	9	4,59	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	7 ¹	7 ³	8 ⁴	4,53	N.T.	N.T.	N.T.
	45 °C	7 ¹	7 ³	8 ⁴	4,46	N.T.	N.T.	N.T.
	50 °C	7 ¹	7 ³	8 ⁴	4,52	N.T.	N.T.	N.T.
3η	5-7 °C	7 ²	9	8 ⁴	4,51	833,3 cps στο 1%	N.T.	N.T.
	25 °C	7 ²	8 ³	8 ⁴	4,51	166,7 cps στο 0,2%	Αραίωση 1:10 1,74	Αραίωση 1:10 157 ^a
	UV	7 ²	8 ³	8 ⁴	4,54	416,7 cps στο 0,5%	N.T.	N.T.
	38 °C	6 ²	7 ³	8 ⁴	4,53	X	N.T.	N.T.
	45 °C	6 ²	7 ³	8 ⁴	4,49	X	N.T.	N.T.
	50 °C	6 ²	7 ³	8 ⁴	4,51	X	N.T.	N.T.

Πίνακας 24. Μελέτη σταθερότητας της δοκιμής CS-ALL 4. Ένδειξη¹: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση μείωσης του ιξώδους και την εμφάνιση ιχνών λαδιών στην επιφάνεια. Ένδειξη²: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για αύξηση της έντασης του χρώματος. Ένδειξη³: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την εξασθένηση της οσμής. Ένδειξη*: περιγράφει την τάση για αλλοίωση του μεταλλικού καπακιού της συσκευασίας stability. Όπου N.T.: Not Tested. Τα ιξώδη μετρούνται στις εξής συνθήκες: 0,6 rpm, spindle 21 σε θερμοκρασία δωματίου (Chen *et al.*, 2007). Όπου X, η αλλοίωση ήταν τέτοια όπου δεν επέτρεπε την μέτρηση.

CS-ALL 4	Παράμετροι	Εμφάνιση	Χρώμα	Οσμή	pH	Ιξώδες	DPPH (mM Trolox equiv.)	TPC (mg GA/L)
Εβδομάδα								
T=0		Παχύρευστο τζελ	Διαυγές χρυσαφί	Έντονη οξικού-θυμαριού	4,02	22917 cps στο 27,5%	Αραίωση 1:10 4,82	Αραίωση 1:10 1709
1η	5-7 °C	9	9	9	4,15	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	9	9	9	4,19	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	9	9	9	4,15	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	9	8 ²	9	4,17	N.T.	N.T.	N.T.
	45 °C	9	8 ²	9	4,14	N.T.	N.T.	N.T.
	50 °C	8 ^{1*}	8 ²	9	4,21	N.T.	N.T.	N.T.
2η	5-7 °C	9	9	9	4,09	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	9	9	9	4,07	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	9	8 ²	9	4,09	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	8 ^{1*}	7 ²	8 ³	4,06	N.T.	N.T.	N.T.
	45 °C	8 ^{1*}	7 ²	8 ³	4,09	N.T.	N.T.	N.T.
	50 °C	8 ^{1*}	7 ²	8 ³	4,19	N.T.	N.T.	N.T.
3η	5-7 °C	9	9	9	4,10	23583 cps στο 28,3%	N.T.	N.T.
	25 °C	9	9	9	4,10	12917 cps στο 15,5%	Αραίωση 1:10 4,49	Αραίωση 1:10 1559
	UV	9	8 ²	9	4,10	14333 cps στο 17,2%	N.T.	N.T.
	38 °C	8 ^{1*}	7 ²	8 ³	4,14	8000 cps στο 9,6%	N.T.	N.T.
	45 °C	8 ^{1*}	7 ²	8 ³	4,13	7250 cps στο 8,7%	N.T.	N.T.
	50 °C	7 ^{1*}	7 ²	8 ³	4,29	X	N.T.	N.T.

Πίνακας 25. Μελέτη σταθερότητας της δοκιμής CS-ALL 5. Ένδειξη¹: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για αλλοίωση της υψής και δημιουργία συμπαγούς τζελ χωρίς ροή. Ένδειξη²: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για αύξηση της έντασης του χρώματος. Ένδειξη³: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για εξασθένηση της οσμής. Ένδειξη*: περιγράφει την τάση για αλλοίωση του μεταλλικού καπακιού της συσκευασίας stability. Όπου N.T.: Not Tested. Τα ιξώδη μετρούνται στις εξής συνθήκες: 0,6 rpm, spindle 21 σε θερμοκρασία δωματίου (Chen *et al.*, 2007). Όπου X, η αλλοίωση ήταν τέτοια που δεν επέτρεπε την μέτρηση. Τιμές στο προϊόν με τον ίδιο λατινικό εκθέτη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0,05).

CS-ALL 5	Παράμετροι	Εμφάνιση	Χρώμα	Οσμή	pH	Ιξώδες	DPPH (mM Trolox equiv.)	TPC (mg GA/L)
Εβδομάδα								
T=0		Τζελ υψηλού ιξώδους	Διαυγές καφετί	Έντονη οξικού-πρόπολης-θυμαριού	4,59	27333 cps στο 32,8%	Αραίωση 1:10 5,22	Αραίωση 1:10 2725 ^a
1η	5-7 °C	9	9	9	4,60	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	9	9	9	4,52	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	9*	9	9	4,60	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	9*	8 ²	8 ³	4,65	N.T.	N.T.	N.T.
	45 °C	9*	8 ²	8 ³	4,63	N.T.	N.T.	N.T.
	50 °C	8 ^{1*}	8 ²	8 ³	4,67	N.T.	N.T.	N.T.
2η	5-7 °C	9	9	9	4,59	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	9*	9	9	4,57	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	9	9	9	4,60	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	9*	8 ²	8 ³	4,59	N.T.	N.T.	N.T.
	45 °C	9*	8 ²	8 ³	4,60	N.T.	N.T.	N.T.
	50 °C	8 ^{1*}	8 ²	8 ³	4,93	N.T.	N.T.	N.T.
3η	5-7 °C	9	9	9	4,62	19083 cps στο 2,8%	N.T.	N.T.
	25 °C	9*	9	9	4,60	8250 cps στο 9,9%	Αραίωση 1:10 4,73	Αραίωση 1:10 1741 ^a
	UV	9	9	9	4,64	8167 cps στο 9,8%	N.T.	N.T.
	38 °C	9*	7 ²	8 ³	4,66	16500 cps στο 19,8%	N.T.	N.T.
	45 °C	8 ^{1*}	7 ²	8 ³	4,68	20250 cps στο 24,3%	N.T.	N.T.
	50 °C	7 ^{1*}	7 ²	8 ³	4,80	X	N.T.	N.T.

Πίνακας 26. Μελέτη σταθερότητας της δοκιμής CS-ALL 6. Ένδειξη¹: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για εμφάνιση ιχνών λαδιών και νερών στην επιφάνεια και σταδιακή αλλοίωση της υφής η οποία δεν είναι έντονη. Ένδειξη²: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για αύξηση της έντασης του χρώματος. Ένδειξη³: ο αριθμός μεταβολής περιγράφει την τάση για εξασθένηση της οσμής. Ένδειξη*: περιγράφει την τάση για αλλοίωση του μεταλλικού καπακιού της συσκευασίας stability. Όπου N.T.: Not Tested. Τα ιξώδη μετρούνται στις εξής συνθήκες: 0,3 rpm, spindle 21 σε θερμοκρασία δωματίου (Chen *et al.*, 2007).

CS-ALL 6	Παράμετροι	Εμφάνιση	Χρώμα	Οσμή	pH	Ιξώδες	DPPH (mM Trolox equiv.)	TPC (mg GA/L)
Εβδομάδα		Τζελ υψηλού ιξώδους	Αδιαφανές μπεζ ανοιχτό	Θυμαριού-μέντας	4,12	102000 cps στο 61%	Αραίωση 1:10 6,16	Αραίωση 1:10 2891
T=0								
1η	5-7 °C	9	9	9	4,04	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	9	9	9	4,06	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	9	9	9	4,08	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	9*	8 ²	8 ³	4,06	N.T.	N.T.	N.T.
	45 °C	9*	8 ²	8 ³	4,03	N.T.	N.T.	N.T.
	50 °C	8 ^{1*}	8 ²	8 ³	4,01	N.T.	N.T.	N.T.
2η	5-7 °C	9	9	9	4,07	N.T.	N.T.	N.T.
	25 °C	9	9	9	4,06	N.T.	N.T.	N.T.
	UV	9	9	9	4,08	N.T.	N.T.	N.T.
	38 °C	8*	8 ²	8 ³	4,08	N.T.	N.T.	N.T.
	45 °C	8*	8 ²	8 ³	4,07	N.T.	N.T.	N.T.
	50 °C	8 ^{1*}	8 ²	8 ³	4,07	N.T.	N.T.	N.T.
3η	5-7 °C	9	9	9	4,07	52333 cps στο 34,1%	N.T.	N.T.
	25 °C	9	9	9	4,06	50833 cps στο 30,5%	Αραίωση 1:10 5,72	Αραίωση 1:10 2689
	UV	9	9	9	4,08	64667 cps στο 38,8%	N.T.	N.T.
	38 °C	8 ^{1*}	8 ²	8 ³	4,09	40667 cps στο 24,4%	N.T.	N.T.
	45 °C	8 ^{1*}	8 ²	8 ³	4,10	51000 cps στο 30,6%	N.T.	N.T.
	50 °C	7 ^{1*}	8 ²	8 ³	4,13	87333 cps στο 52,4%	N.T.	N.T.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Στο παράρτημα αυτό δίδεται η μελέτη σκοπιμότητας του αντιερπητικού προϊόντος σε πλήρη έκταση.

2.1 Εισαγωγή

Η μελέτη σκοπιμότητας αποτελεί την ανάλυση στοιχείων και πληροφοριών για το πόσο επιτυχώς μπορεί να ολοκληρωθεί ένα νέο εγχείρημα, προσμετρώντας κρίσιμους παράγοντες που επρόκειτο να επηρεάσουν την έκβαση όπως οι οικονομικοί, οι τεχνολογικοί, οι νομικοί καθώς και παράγοντες προγραμματισμού και λειτουργίας (TELOS: Technical-Economic-Legal-Operational-Scheduling). Μέσω της διαδικασίας αυτής εντοπίζονται νέες ευκαιρίες αλλά και πιθανά προβλήματα, διερευνάται η χρονική καταλληλότητα του λανσαρίσματος, δίνονται εναλλακτικές λύσεις, σταθμίζονται τα μειονεκτήματα με τα πλεονεκτήματα και γίνεται στοχοθέτηση με σκοπό την εστίαση στην επίτευξη του εγχειρήματος.

2.2 Επισκόπηση Επιχείρησης - Εσωτερικό περιβάλλον

Η επιλογή ανάπτυξης κάθε νέου προϊόντος αποτελεί μια στρατηγική απόφαση. Η APIVITA υιοθετεί μια σύγχρονη προσέγγιση κατά τη διαδικασία λήψης αποφάσεων ενσωματώνοντας σε αυτή τις αξίες, την ηθική και τις κοινωνικές προσδοκίες προκειμένου να εξαλειφθεί οποιαδήποτε απορρέουσα περιβαλλοντική επιβάρυνση και να προαχθεί η οικονομική, κοινωνική και περιβαλλοντική αξία, όπως χαρακτηριστικά αναφέρεται στην έκθεση Βιώσιμης Ανάπτυξης του 2017. Υποστηρίζοντας την Βιώσιμη Ανάπτυξη δίνει ιδιαίτερη έμφαση στα εξής ουσιαστικά θέματα, όσον αφορά την ανάπτυξη νέων προϊόντων: 1) την καινοτομία, 2) τις πρώτες ύλες 3) τον οικολογικό σχεδιασμό 4) τις κοινωνικές επιπτώσεις αυτού 5) την προστασία της βιοποικιλότητας και την κλιματική αλλαγή καθώς και 6) την κανονιστική συμμόρφωση.

Η APIVITA κατέχει ηγετική θέση στον τομέα της φροντίδας των χειλιών έχοντας αναπτύξει τη σειρά των lip care. Προέκταση αυτού του τομέα θα ήταν η δραστηριοποίησή της σε μια πολύ συχνά εντοπιζόμενη πάθηση των χειλιών, τον επιχείλιο έρπητα, με ένα εξειδικευμένο προϊόν που θα προσεγγίζει ολιστικά την αποτελεσματική αντιμετώπιση και το αισθητικό πρόβλημα ταυτόχρονα.

Μάλιστα δυο από τα ήδη υπάρχοντα προϊόντα της εταιρείας προσφέρουν υποστήριξη στην αντιμετώπιση του επιχείλιου έρπητα: το lip care πρόπολης και η κρέμα πρόπολης. Το lip care εμπλουτισμένο με βάλσαμο και πρόπολη για πλούσια ενυδάτωση και προστασία των χειλιών και η κρέμα πρόπολης, τόσο για γενική χρήση όσο και ειδική στον επιχείλιο έρπητα, με σύνθεση παρόμοια με αυτή του προτεινόμενου προϊόντος δηλαδή πρόπολη, εκχύλισμα *P.vulgaris*, βιταμίνες και αιθέρια έλαια, χρησιμοποιούνται ήδη στην αντιερπητική θεραπεία. Ένα ειδικό φυσικό προϊόν όμως με εύκολη εφαρμογή και η ταυτόχρονη ευαισθητοποίηση του κοινού για το συγκεκριμένο πρόβλημα, ώστε να γίνει προστάθεια εξάλειψης του στίγματος αλλά

και ενημέρωσης για τη σωστή αντιμετώπισή του, θα καταστήσουν την εταιρεία συνώνυμο της θεραπείας στη συνείδηση των παθόντων.

Η APIVITA είναι μια ελληνική εταιρεία φυσικών καλλυντικών που δημιουργήθηκε το 1972 από δύο φαρμακοποιούς τον κύριο Νίκο και την κυρία Νίκη Κουτσιανά, οι οποίοι εμπνεύστηκαν από την κοινωνία της μέλισσας, τη βιοποικιλότητα της ελληνικής φύσης και την ολιστική προσέγγιση του Ιπποκράτη για την υγεία, την ευεξία και την ομορφιά. Οι αξίες αυτές συνεχίζουν να αποτελούν τον πυρήνα των δράσεων της εταιρείας και μαζί με την κοινωνική υπευθυνότητα, την παράδοση, την καινοτομία και την αειφόρο ανάπτυξη δρουν σαν πυξίδα σε όλο το φάσμα των δραστηριοτήτων της εταιρείας. Μάλιστα η στρατηγική της συνεργασία με τον ισπανικό όμιλο PUIG ώθησε ακόμη περισσότερο τη διεθνή ανάπτυξή της και την εξαγωγική της δραστηριότητα έχοντας παρουσία σε Ισπανία, Πορτογαλία, Ρουμανία, Χονγκ Κονγκ, Κύπρο, Ιταλία, Βουλγαρία, Ουγγαρία, Ηνωμένο Βασίλειο, Βέλγιο, Ουκρανία, Κροατία, Ιρλανδία, Τυνησία και Λετονία. Η γκάμα των προϊόντων της είναι ευρεία καλύπτοντας την περιποίηση του προσώπου, του σώματος, των μαλλιών, των χειλιών, των παιδιών και των βρεφών, των ανδρών, την προστασία από τον ήλιο, την αρωματοθεραπεία, τη στοματική υγιεινή, τα μελισσοκομικά προϊόντα και τα βιολογικά βότανα καθώς τέλος και τις κατηγορίες των Hotel & Spa και Personal. Όλα με φυσικές συνθέσεις σε ποσοστό 85% έως 100%, αποκλείοντας τη χρήση επιβαρυντικών ουσιών, τόσο για την υγεία όσο και για το περιβάλλον, και ακολουθώντας καινοτόμες πράσινες πρακτικές παραγωγής, η εταιρεία κατέχει πληθώρα πατεντών και επενδύει συνεχώς στην έρευνα και την ανάπτυξη.

2.3 Παρουσίαση προϊόντος

2.3.1 Το πρόβλημα και η λύση

Παρά την κατακόρυφη αύξηση της ποιότητας της ζωής, το πρόβλημα του επιχείλιου έρπητα παραμένει έντονο παγκοσμίως. Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. το 2012 εκτιμήθηκε ότι περισσότεροι από 3,7 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως κάτω από την ηλικία των 50 ή διαφορετικά το 67% του πληθυσμού έχουν μολυνθεί από τον HSV-1. Υπάρχουν φυσικά τροποποιήσεις στο παραπάνω ποσοστό ανάλογα με την ηλικία, τη φυλή, τη γεωγραφική περιοχή και την κοινωνικοοικονομική κατάσταση (Fatahzadeh & Schwartz, 2007). Μάλιστα αναφέρεται πως το ένα τρίτο των μολυσμένων με τον HSV-1 ασθενών υποφέρει από επαναλαμβανόμενα επεισόδια (Opstelten *et al.*, 2012). Το 2012 118 εκατομμύρια μολυσμένοι άνθρωποι εκδήλωσαν συμπτώματα του ιού HSV-1, τονίζοντας, ακόμα μια φορά, τη σημασία του ως παγκόσμιο πρόβλημα υγείας (Ramchandani *et al.*, 2017). Αυτό σημαίνει πως το πρόβλημα του επιχείλιου έρπητα, μιας που δεν μπορεί να ξεπεραστεί, ταλαιπωρεί ένα σημαντικό ποσοστό ανθρώπων οι οποίοι αναζητούν την καλύτερη λύση. Τα συμπτώματα που βιώνουν οι ασθενείς στα επαναλαμβανόμενα επεισόδια χαρακτηρίζονται από πόνο, αίσθημα καύσου, κνησμού, μυρμηγκιάσματος τα οποία διαρκούν για περίπου 6 ώρες μέχρι να εμφανιστούν τα πρώτα κυστίδια. Συνήθως διαρκούν για περίπου 48 ώρες και έπειτα μετατρέπονται σε φλύκταινες ή αλλιώς ψυχρά έλκη τα οποία έπειτα από 72-96 ώρες αποκτούν κρούστα. Τα έλκη θεραπεύονται τελείως μέσα σε 8-10 μέρες. Ο πόνος είναι ισχυρότερος στην έναρξη των συμπτωμάτων και υποχωρεί μετά το πέρας των 96-120 ωρών (Whitley & Roizman, 2001). Αυτό που έπειτα κυριαρχεί είναι το αισθητικό πρόβλημα που οδηγεί σε αμηχανία, ψυχολογική δυσφορία και κοινωνικό στίγμα ειδικά στη σύγχρονη εποχή

της εικόνας (Fatahzadeh & Schwartz, 2007). Ένα άλλο στοιχείο που πρέπει να ληφθεί υπόψη για τη συχνότητα των επανεμφάνισων του επιχείλιου έρπητα είναι οι παράγοντες που τις προκαλούν. Ερεθίσματα όπως πυρετός, έμμηνος ρήση, ορμονικές διαταραχές, αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα, επιδράσεις του περιβάλλοντος όπως ακραίες θερμοκρασίες, έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και ακόμα πιο συγκεκριμένα επιδράσεις του σύγχρονου τρόπου ζωής όπως ψυχολογικό στρες και κούραση εντείνουν τα επαναλαμβανόμενα επεισόδια, με αποτέλεσμα το πρόβλημα του επιχείλιου έρπητα να διεισδύει στην καθημερινή ζωή (Cunningham *et al.*, 2012).

Το πρόβλημα εντοπίζεται συγκεκριμένα στην ανεπαρκή συνδυαστική και πολλαπλή αποτελεσματικότητα για την αντιμετώπιση του επιχείλιου έρπητα από ένα φυσικό προϊόν εύκολης εφαρμογής εταιρείας με ισχυρή εμπιστοσύνη των καταναλωτών του οποίου η παρουσία θα είναι γνωστή λόγω του brand και θα διατίθεται μέσω πολλών αλλά εξειδικευμένων καναλιών διανομής. Υπάρχουν αρκετά προϊόντα τα οποία εμφανίζουν ικανοποιητικά χαρακτηριστικά σε έναν όμως από τους στόχους. Δεν υπάρχει ένα προϊόν που να συνδυάζει την αποτελεσματική αντιμετώπιση των συμπτωμάτων, την ταυτόχρονη καταστολή του ιού το οποίο παράλληλα να εφαρμόζεται απλά, ανώδυνα και γρήγορα και να προσφέρει μια διακριτική λύση στο σύγχρονο άνθρωπο. Δεν έχει, προς το παρόν, συνδυαστεί επιτυχώς η αποτελεσματικότητα με την πρακτικότητα και τη διακριτική λύση στο αισθητικό πρόβλημα.

Το αντιερπητικό προϊόν της παρούσας εργασίας έχει τη μορφή τζελ, είναι χρώματος μπεζ και λειτουργεί ως υγρό επίθεμα. Η σύστασή του περιέχει το πολυμερές χιτοζάνη, υδατικά εκχυλίσματα των εναέριων τμημάτων της *Melissa officinalis* και *Prunella vulgaris*, βάμμα πρόπολης, αιθέρια έλαια *Thymus vulgaris* και *Mentha piperita* και βρίσκεται σε συσκευασία των 7 g η οποία διαθέτει στην άκρη εφαρμογής μεταλλική σφαίρα. Η μεταλλική σφαίρα αποσκοπεί στην πιο ομοιόμορφη κατανομή του προϊόντος στην παθούσα περιοχή ανώδυνα και εύκολα ενώ ταυτόχρονα προσφέρει μαζί με την βοήθεια του αιθέριου ελαίου της *Mentha piperita* την αίσθηση δροσιάς. Έπειτα από την εφαρμογή του στην παθούσα περιοχή θα σχηματίζει διάφανο υποκίτρινο φιλμ ελκυστικής υφής εντός 1-2 λεπτών, ανάλογα με την ποσότητα εφαρμογής, και το οποίο θα παραμένει ακέραιο για μεγάλο χρονικό διάστημα ανακουφίζοντας άμεσα τα συμπτώματα του κνησμού και του καύσου, προστατεύοντας μηχανικά την πληγή, αποτρέποντας τη μικροβιακή/ϊική μόλυνση των γύρω περιοχών, επιτρέποντας την «αναπνοή» της περιοχής, δηλαδή τη φυσιολογική ανταλλαγή όλων των απαραίτητων ουσιών, ενώ ταυτόχρονα θα αποτελεί πηγή διανομής θεραπευτικών αντιερπητικών παραγόντων. Το συγκριτικό πλεονέκτημά του είναι ο συνδυασμός των εξής χαρακτηριστικών:

- Της συνεργιστικής δράσης των προαναφερθέντων συστατικών για άμεση ανακούφιση των συμπτωμάτων, αντιερπητική δράση και ταχύτερη επούλωση
- Της εύκολης, ανώδυνης εφαρμογής χωρίς την άμεση επαφή με τα χέρια και τον κίνδυνο της περαιτέρω μόλυνσης
- Του αισθητικού αποτελέσματος και των ευχάριστων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών
- Των φυσικών πρώτων υλών της ελληνικής γης
- Το ότι είναι φιλικό προς το περιβάλλον

- Και τέλος της εμπιστοσύνης των καταναλωτών στην APIVITA.

5.3.2 SWOT Ανάλυση αντιερπητικού προϊόντος

	ΒΟΗΘΟΥΝ ΤΗΝ ΕΠΙΤΕΥΞΗ ΤΩΝ ΣΤΟΧΩΝ	ΕΜΠΟΔΙΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΠΙΤΕΥΞΗ ΤΩΝ ΣΤΟΧΩΝ
Εσωτερικοί παράγοντες	<p>STRENGTHS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Μοναδικότητα προϊόντος για ολιστική αντιμετώπιση του επιχείλιου έρπητα (ανακούφιση των συμπτωμάτων, αντιερπητική δράση, ταχύτερη επούλωση) • Διακριτικό αποτέλεσμα για αισθητική επιδιόρθωση • Ελαχιστοποίηση κινδύνου επιμόλυνσης άλλων περιοχών • Εύκολη, γρήγορη και πρακτική εφαρμογή • Ελκυστικό design-μορφή τζελ που μετατρέπεται σε φιλμ • Φυσικά συστατικά ελληνικής γης • Καινοτόμες τεχνολογίες φιλικές προς το περιβάλλον • Συμπληρωματικό προϊόν ως προς τα αντι-HSV-1 φάρμακα 	<p>WEAKNESSES</p> <ul style="list-style-type: none"> • Δυσκολία εύρεσης φυτικού υποστρώματος <i>Prunella vulgaris</i> • Δεν έχουν γίνει ενέργειες για διερεύνηση κατοχύρωσης πατέντας ή χρήσης trademark (™) των συστατικών • Υψηλό κόστος διαφήμισης και ενημέρωσης του κοινού για την κυκλοφορία νέου προϊόντος καθώς και υψηλό κόστος χρησιμοποιούμενου πολυμερούς • Πιθανή ύπαρξη αλλεργιών στα συστατικά
Εξωτερικοί παράγοντες	<p>OPPORTUNITIES</p> <ul style="list-style-type: none"> • Η αγορά φυσικών προϊόντων εμφανίζει μεγάλη ζήτηση παγκοσμίως • Ενίσχυση εξωστρέφειας προϊόντων με φυσικές πρώτες ύλες, χαρακτηριστικές της Ελλάδας • Οι καταναλωτές αναζητούν έναν πιο φυσικό τρόπο ζωής • Πιο ανεπτυγμένη η περιβαλλοντική ευαισθησία • Ο σύγχρονος τρόπος ζωής ωθεί την έξαρση επαναλαμβανόμενων κρουσμάτων με αυξημένα περιστατικά επιχείλιου έρπητα • Ο σύγχρονος τρόπος ζωής δίνει ιδιαίτερη βαρύτητα στην εξωτερική εμφάνιση και την παράλληλη εξοικονόμηση χρόνου • Η APIVITA είναι μια διεθνώς αναγνωρισμένη εταιρεία φυσικών προϊόντων που έχει κερδίσει την εμπιστοσύνη των καταναλωτών • Νέα δυναμική εταιρείας το λανσάρισμα προϊόντος για θεραπεία επιχείλιου έρπητα • Πιθανός αιφνιδιασμός του ανταγωνισμού για τη νέα τεχνολογία • Αύξηση ζήτησης του φυτού <i>Prunella vulgaris</i>, άνοιγμα για νέα καλλιέργεια και δημιουργία ευνοϊκών επιχειρηματικών συνθηκών 	<p>THREATS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Διαρκώς εξελισσόμενος ανταγωνισμός • Το πρώτο ιατροτεχνολογικό προϊόν της εταιρείας, εφαρμογή νομοθεσίας εξ ολοκλήρου από την αρχή-πιθανή καθυστέρηση λανσάριατος • Αλλαγές νομοθεσίας για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα, με πιο αυστηρούς κανονισμούς • Μη ευνοϊκό φορολογικό πλαίσιο • Υπολογισμός ποσοστού των ενδιαφερομένων που θα θεωρήσουν το προϊόν "είδος πολυτέλειας"

- Αύξηση ζήτησης προϊόντων περιποίησης από τον ανδρικό πληθυσμό
- Αξιοποίηση των καναλιών επιλεκτικής διανομής και των φαρμακείων ως χώροι που εμπιστεύονται οι καταναλωτές μέσω του marketing

Εικόνα 21. Ανάλυση SWOT για το αντιερπητικό προϊόν με σκοπό την εύρεση των δυνατών και αδύνατων σημείων καθώς και τις απειλές και τις ευκαιρίες του εξωτερικού περιβάλλοντος.

2.3.3 Ανταγωνισμός

Παρακάτω παρουσιάζονται οι τρεις μεγάλες κατηγορίες, οι φαρμακευτικές αντιικές κρέμες, τα επιθέματα (αυτοκόλλητα και σε υγρή μορφή) και τέλος οι φυτικές κρέμες με αντιερπητική δράση, των δυνητικών ανταγωνιστών οι οποίοι παρέχουν λύσεις για το πρόβλημα του επιχείλιου έρπητα. Να σημειωθεί πως η αναζήτηση των αντιερπητικών προϊόντων έγινε μέσω ελληνικών site online φαρμακείων καθώς επίσης για το σχηματισμό εικόνας της παγκόσμιας αγοράς χρησιμοποιήθηκαν οι σελίδες e-bay και amazon.

2.3.3.1 Αντιικές φαρμακευτικές κρέμες

Αμιγώς φαρμακευτικές αντιικές κρέμες σε σωληνάρια παρουσιάζονται στον **Πίνακα 27**. Αποτελούν την ενδεδειγμένη φαρμακευτική λύση στο πρόβλημα. Με εξαίρεση την Fenivir Tinted η οποία έχει χρώμα για την κάλυψη της ερυθρότητας, οι υπόλοιπες έχουν λευκό ως υποκίτρινο χρώμα δίνοντας ένα όχι και τόσο αισθητικό αποτέλεσμα. Οι τιμές είναι ενδεικτικές και αποτελούν την «ενδεικτική λιανική τιμή» (Ε.Λ.Τ.) για τα Zovirax και Fenivir τα οποία ανήκουν στα ΜΗ.ΣΥ.ΦΑ.. Να σημειωθεί πως τα Zoviduo και Healip ανήκουν στην αόριστη λίστα φαρμάκων. Οι τιμές αντλήθηκαν από τον «Γαληνό» και επιβεβαιώθηκαν από το σύστημα μηχανογράφησης FARMACONET της CSA έπειτα από την πιο πρόσφατη αναβάθμιση στις 21 Ιουνίου 2019.

Πίνακας 27. Διακρίνονται οι φαρμακευτικές αντιικές κρέμες, η εταιρεία που τα παρασκευάζει, τα συστατικά τους, ο τρόπος δράσης, η ποσότητα ανά συσκευασία και η ενδεικτική λιανική τιμή τους.

Brand	Προϊόν	Συστατικά	Τρόπος δράσης	Ποσότητα συσκευασίας	Τιμή €
GlaxoSmithKline	Zovirax	Ακυκλοβίρη 5%	Αναστολή της ειδικής DNA-πολυμεράσης	2 g	4,24
GlaxoSmithKline	Zoviduo	Ακυκλοβίρη 50 mg/g και υδροκορτιζόνη 10mg/g	Αναστολή της ειδικής DNA-πολυμεράσης και περιορισμός τοπικής φλεγμονής	2 g	7,40

Omega Pharma Hellas	Fenivir	Πενκυκλοβίρη 1%	Αναστολή σύνθεσης DNA του ιού	2 g	6,99
Omega Pharma Hellas	Fenivir Tinted	Πενκυκλοβίρη 1% με χρώμα	Αναστολή σύνθεσης DNA του ιού	2 g	7,79
Jenson Pharmaceutical	Healip cream	Δοκοσανόλη 10%	Αναστολή της ενδοκυτταρικής πρόσληψης και του πολ/σμου του ιού	2 g	10,86

Δεν έχουν αναφερθεί οι γενόσημες αντιικές κρέμες που εντοπίζονται στις αγορές του εξωτερικού. Η πρόσβαση σε αυτές είναι σίγουρα πιο χρονοβόρα και δαπανηρή, χωρίς πολλές φορές να υπόκεινται στις απαραίτητες εγκρίσεις από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων (ΕΟΦ). Τέτοια παραδείγματα είναι: η Hascovir, η ApoHealth Cold sore cream, η Blistex και η Virasolb με δραστική την ακυκλοβίρη και η Vectavir με δραστική την πενκυκλοβίρη. Εμφανίζεται επίσης και η Virasolve με σύσταση 0,5% ιδοξουριδίνη, 2% υδροχλωρική λιγνοκαΐνη και 0,5% χλωριούχο βενζαλκόνιο.

2.3.3.II Επιθέματα

Όσον αφορά τα επιθέματα είναι μια μεγάλη κατηγορία προϊόντων. Ο συνήθης τρόπος δράσης είναι η παρεμπόδιση ανάπτυξης της πληγής, η δημιουργία νέου δέρματος κάτω από το επίθεμα και η ταυτόχρονη απορρόφηση εκκριμάτων. Έχουν αναπτυχθεί πολλά επιθέματα τα οποία είναι εμπλουτισμένα με διάφορα φυτικά εκχυλίσματα τα οποία είτε έχουν αντιερπητική δράση είτε καταπραϋντική και επουλωτική. Το μειονέκτημα που εμφανίζουν είναι ο σχετικά δύσκολος τρόπος εφαρμογής και αφαίρεσης τους καθώς απαιτείται καθρέπτης, επαφή με τα χέρια και καλό πλύσιμο τους πριν και μετά, κάτι που εμποδίζει την εφαρμογή τους σε οποιοδήποτε μέρος ενώ αυξάνει τον κίνδυνο περαιτέρω επιμόλυνσης. Επίσης η αφαίρεση μπορεί σε αρκετές περιπτώσεις να αποδειχθεί επίπονη διαδικασία. Μια καινούρια τεχνολογία είναι τα υγρά επιθέματα που σε κάποιες περιπτώσεις συμπεριέχουν και άλλες ουσίες, όπως ο ψευδάργυρος. Τα συγκεκριμένα ξεπερνούν τα προβλήματα εφαρμογής των αυτοκόλλητων επιθεμάτων. Παρακάτω δίνεται ο αντίστοιχος πίνακας με τα κυκλοφορούντα προϊόντα της αγοράς.

Πίνακας 28. Διακρίνονται τα αντιερπητικά επιθέματα (αυτοκόλλητα και υγρά), η εταιρεία που τα παρασκευάζει, τα συστατικά τους, η ποσότητα ανά συσκευασία και η ενδεικτική λιανική τιμή τους.

Brand	Προϊόν	Συστατικά	Ποσότητα συσκευασίας	Τιμή €
HRA pharma	Compeed	Καρβοξυλ-μεθυλ-κελουλόζη με σταυροειδείς δεσμούς νατρίου/συγκολλητικές ρητίνες/ελαστομερές/ φιλμ πολυουρεθάνης	15 επιθέματα	10,58
HRA pharma	Compeed Total Care Night	<i>Tanacetum parthenium</i> , PFETM και τεχνολογία "Hydrocolloid-075"	12 επιθέματα	10,34
Hansaplast	Hansaplast SOS	τεχνολογία υδροκολλοειδούς	12 επιθέματα	8,32
GlaxoSmithKline	Zovirax InvisiSeal patch	τεχνολογία υδροκολλοειδούς	16 επιθέματα	12,00
Vican	Carnation coldsore patch	τεχνολογία υδροκολλοειδούς με φυσικό αντισηπτικό	10 επιθέματα	9,81
Stirixis	Stirixis	δίσκος πολυουρεθάνης εμποτισμένος με εκχύλισμα <i>Melaleuca artemifolia</i>	15 επιθέματα	3,35
Vitorgan	Pharmalead patch	δίσκος πολυουρεθάνης εμποτισμένος με αιθέριο έλαιο <i>Melaleuca artemifolia</i>	15 επιθέματα	7,25
Hartmann	Dermaplast Effect	τεχνολογία υδροκολλοειδούς	16 επιθέματα	7,71
Real care	Herpes patch	τεχνολογία υδροκολλοειδούς	15 επιθέματα	4,50
Master aid	Herpes patch	δίσκος πολυουρεθάνης με εκχύλισμα <i>Calendula officinalis</i>	15 επιθέματα	9,80
PharmMed	Herpatch Herpes Cold Sore Serum	Συμπολυμερή στυρενίου/ακρυλικού, πολυβινυλακόλη με ψευδάργυρο	5 mL	10,00
Laboratoires Urgo	Urgo filmogel	παράγωγα κυτταρίνης και καρβοξυλικών οξέων	3 mL	10,69

Να σημειωθεί πως ανάλογης λογικής επιθέματα βρέθηκαν και στα site e-bay και alibaba απλώς επειδή δεν παρουσίαζαν καινούρια χαρακτηριστικά και είναι πιο δύσκολα προσβάσιμα γίνεται μια απλή αναφορά μερικών από αυτά εδώ: t-med herpes patch, Pharmadoc Herpes Patch Protective Invisible, SOS herpes lip patch κ.ά..

2.3.3.III Φυτικές κρέμες με αντιερπητική δράση

Οι φυτικές κρέμες με αντιερπητική δράση είναι εμπλουτισμένες με εκχυλίσματα, αιθέρια έλαια, επουλωτικές και αναπλαστικές βιταμίνες, αντηλιακά φίλτρα και άλλα συστατικά που δρουν ευεργετικά στον επιχείλιο έρπητα σε διάφορους συνδυασμούς που διακρίνονται στον **Πίνακας 29**. Συνήθως δίνουν ένα πιο διακριτικό αισθητικό αποτέλεσμα, καλή αποτελεσματικότητα και ικανοποιούν το τμήμα των καταναλωτών που επιλέγουν τα φυσικά προϊόντα με οικολογική συνείδηση. Αρνητικό μπορεί να αποτελέσει η δυσκολία εύρεσης αυτών στα σημεία πώλησης, είτε αυτά είναι τα φαρμακεία είτε τα online καταστήματα και η έλλειψη ενημέρωσης ή/και εμπιστοσύνης που μπορεί να δείξουν οι καταναλωτές σε εταιρίες με τις οποίες δεν είναι εξοικειωμένοι.

Πίνακας 29. Διακρίνονται οι φυτικές αντιικές κρέμες, η εταιρεία που τα παρασκευάζει, η ποσότητα ανά συσκευασία και η ενδεικτική λιανική τιμή τους. Όσα προϊόντα εμφανίζουν * υπάρχουν διαθέσιμα μόνο στο εξωτερικό και εντοπίστηκαν μέσω e-bay και Alibaba. Όσα προϊόντα φέρουν την ένδειξη¹ εμφανίζουν κάποιο κοινό συστατικό, το οποίο υπογραμμίζεται στην αντίστοιχη στήλη, με το αντιερπητικό σκεύασμα που προτείνεται ώστε να γίνεται αποτελεσματικότερη σύγκριση.

Brand	Προϊόν	Συστατικά	Ποσότητα συσκευασίας	Τιμή €
Sorefix	Sorefix Resque cream	Συμπολυμερή, φυσικά ενυδατικά έλαια, βιταμίνη E, με αντηλιακό δείκτη	6 mL	7,06
Sorefix	Sorefix Prevent balm	Συμπολυμερή, μελισσοκέρι, ψευδάργυρος	10 mL	10,08
Merck Apaisyl	Herp Apaisyl creme ¹	Βαζελίνη και εκχύλισμα <u>πρόπολης</u>	2 g	9,88
SAMCOS	Herbolip balm ¹	<u>Πρόπολη</u> , έλαιο τειόδεντρου, λάδι ελιάς	10 mL	7,51
A.vogel	Bio-propolis Care ¹	Εκχύλισμα <u>πρόπολης</u>	2 g	9,70
Vitorgan	Pharma-lead cream ¹	<u>Βάμμα πρόπολης</u> , έλαιο τειόδεντρου και γερανιού	50 mL	8,40
Hubner	Silicea cold sore lip gel	Γέλη πυριτίου	2 g	9,00
Fadopharm	Synergy dermat herpes ¹	Τζελ με αιθέριο έλαιο τειόδεντρου και <u>θυμαριού</u> , εκχύλισμα εχινάκειας και αντηλιακά φίλτρα	15 mL	10,10

Avene	Baume Cicalfate	Σουκραλφάτη, ψευδάργυρο	10 mL	7,70
Bioturm	Silver lotion No.36	“Micro silver” και ψευδάργυρο	150 mL	21,90
Bioturm	Lip Care Acute	Micro silver με έλαιο γαρυφάλλου και εκχύλισμα βανίλιας	7,5 mL	8,90
Cymex	Cream for cold sores ¹	<u>Πρόπολη</u>	5 g	7,90
Specchiasol	<i>Propoli cream</i> ¹	<u>Πρόπολη</u> , έλαια, βιταμίνες E και D	100 mL	9,57
Bonjela	<i>Bonjela Cold Sore Cream</i> ^{*1}	UV-Active™, αιθέρια έλαια (μεταξύ άλλων και <u>μέντας</u>) καθώς και χημικές δραστικές ουσίες	2 g	7,01
Mentholatum	<i>Propovir</i> ^{*1}	<u>πρόπολη</u>	2 g	13,45
Nyal	Nyal Cold Sore Cream ^{*1}	<u>Μινθόλη</u> , καμφορά	10 g	10,83
Quantum Health	Lip Clear® Lysine+® ^{*1}	<u>Μινθόλη</u> , λυσίνη, καλέντουλα, ελαιόλαδο, <u>πρόπολη</u> , οξείδιο του ψευδαργύρου	7 g	9,35
LomaHerpan	Lomaherpan Cream ^{*1}	<u>Εκχύλισμα <i>Melissa officinalis</i></u>	5 g	7,61
ProdecoPharma	GSE Herpex1 Crema ^{*1}	Εκχυλίσματα από σπόρο γκρέιπφρουτ, <u><i>Melissa officinalis</i></u> και <i>Porphyra umbilicalis</i> , ελαιόλαδο και βιταμίνη C	15 mL	9,90
ProdecoPharma	GSE Herpex1 Stick ^{*1}	<u>Εκχυλίσματα από <i>Melissa officinalis</i>, <i>Prunella vulgaris</i>,</u>	5,7 mL	11,90

γκρέιπφρουτ, πράσινο
τσάι και βιταμίνη Ε

Επιπλέον έγινε μια προσπάθεια αναζήτησης προϊόντων με τις ίδιες δραστικές που χρησιμοποιούνται στο παρόν αντιερπητικό προϊόν. Στην κατηγορία των φυτικών κρεμών κυριαρχεί η πρόπολη σαν δραστικό συστατικό. Όσον αφορά τα υπόλοιπα συστατικά εντοπίστηκαν αντιερπητικά προϊόντα με αιθέριο έλαιο μέντας και μεμονωμένης μινθόλης καθώς και με αιθέριο έλαιο θυμαριού όπως επίσης με εκχυλίσματα *Melissa officinalis* και *Prunella vulgaris*. Έχει εντοπιστεί και η λογική του σχηματισμού φιλμ στην παθούσα περιοχή. Τα παραπάνω φαίνονται με υπογράμμιση στους παραπάνω πίνακες.

Πίνακας 30. Matrix ανταγωνιστικών χαρακτηριστικών που αποτελούν το Unique Selling Point (USP) του νέου προϊόντος σε σχέση με τον ανταγωνισμό.

Προϊόντα/ Χαρακτηριστικά	Νέο προϊόν	Αντική κρέμα	Αντική κρέμα με χρώμα	Επιθέματα	Επιθέματα με δραστική ουσία	Υγρά επιθέματα	Υγρά επιθέματα με δραστική ουσία	Φυτικές κρέμες
Αντική δράση	x	x	x		x		x	x
Διακριτικό αισθητικό αποτέλεσμα	x		x	x	x	x	x	
Αποτελεσματικότητα	x	x	x		x		x	x
Άμεση ανακούφιση συμπτωμάτων	x							
Ταχύτερη επούλωση	x			x	x	x	x	
Εύκολη εφαρμογή	x	x	x			x	x	x
Γρήγορη εφαρμογή	x	x	x			x	x	x
Αποφυγή μεταδοτικής μόλυνσης	x			x		x	x	
Άνεση κατά την εφαρμογή	x			x	x	x	x	
Αντηλιακά φίλτρα								x
Γνωστό brand	x	x	x	x	x			
Φυσικό προϊόν	x			x	x		x	x

Στον παραπάνω πίνακα τα προϊόντα έχουν μπει ομαδοποιημένα σε κατηγορίες για να είναι απλούστερη η παρακολούθηση των χαρακτηριστικών και η σύγκρισή τους με το μειονέκτημα να μην υπάρχει μεγάλη ακρίβεια για την ιδιαιτερότητα του κάθε προϊόντος. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά είναι χρήσιμες οι εξής διευκρινίσεις: η αποτελεσματικότητα αναφέρεται στην ύπαρξη αντιικού παράγοντα του οποίου μάλιστα η δράση θα διατηρείται σε υψηλά επίπεδα (π.χ. δεν θα εμφανίζεται ανθεκτικότητα στις μεταλλαγμένες μορφές του ιού). Ο διαφορετικός μηχανισμός δράσης σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης του ιού και ο συνδυασμός ουσιών βοηθά την αύξηση της αποτελεσματικότητας. Η άνεση κατά την εφαρμογή έχει να κάνει με την ελκυστική υφή και τη διατήρηση της ουσίας στην παθούσα περιοχή χωρίς να αφήνει λιπαρότητα ή να απομακρύνεται εύκολα με την τριβή. Τέλος η ευρεία διάθεση μέσω των καναλιών είναι ένα θέμα προς συζήτηση, καθώς πολλά ηλεκτρονικά καταστήματα φαρμακείων αλλά και φυσικά σημεία ισχυρίζονται τη διάθεση τέτοιων προϊόντων χωρίς όμως να ισχύει πάντα, καθώς η αναγνωρισιμότητα του brand από τους καταναλωτές είναι καθοριστικός παράγοντας για την είσοδο του προϊόντος στη γκάμα των προϊόντων ενός φαρμακείου ή καταστήματος λιανικής. Τέλος όσον αφορά τα αντηλιακά φίλτρα είναι επιδίωξη για το νέο προϊόν ίσως σε μετέπειτα στάδιο μελέτης.

Δεν θα πρέπει να αμεληθεί ο έμμεσος ανταγωνισμός ο οποίος αντιπροσωπεύει την κάλυψη της ίδιας ανάγκης με διαφορετικό τρόπο. Κυριαρχεί πλέον ο θεσμός του (DIY) σε πολλά θέματα περιποίησης ακόμα και θεραπείας παθήσεων. Με μια γρήγορη αναζήτηση στο ίντερνετ μπορεί κάποιος να συναντήσει πολλά «σπιτικά γιατροσόφια» που υπόσχονται ανακούφιση και γρηγορότερη επούλωση του επιχείλιου έρπητα με αποτέλεσμα αρκετοί καταναλωτές να στρέφονται σε αυτά αλλά με αντίθετα από τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

Άλλο σημαντικό σημείο του ανταγωνισμού είναι η υιοθέτηση της λογικής του συγκεκριμένου αντιερπητικού προϊόντος και το λανσάρισμα μιας βελτιωμένης εκδοχής του από άλλη ανταγωνιστική εταιρεία. Μάλιστα επειδή το πεδίο ανταγωνισμού είναι ανοιχτό και μπορεί να έλθει από οποιαδήποτε από τις παραπάνω εταιρίες η μελλοντική επαγρύπνηση για τα τελευταία προϊόντα είναι εξαιρετικά σημαντική.

Κατά τη διεξαγωγή μελέτης του ανταγωνισμού είναι χρήσιμο το μοντέλο «Porter's Five Forces» με σκοπό την αναγνώριση και την ανάλυση των πέντε ανταγωνιστικών δυνάμεων που διαμορφώνουν την ανάπτυξη κάθε επιχείρησης και βοηθά στον καθορισμό των δυνατών σημείων καθώς και των αδυναμιών της όπως και την επιλογή της στρατηγικής της και κατά επέκταση του ανταγωνιστικού πλεονεκτημάτος της.

1. Ανταγωνισμός της εταιρείας: υφίστανται αρκετές εταιρείες φυσικών προϊόντων με κυριότερες ανταγωνιστικά εγχώρια να είναι ο «Κορρέζ» και η «Frezyderm». Σαφώς υπάρχουν πολλές ακόμα όπως η Freshline, Youthlab κ.ά. ενώ ο ανταγωνισμός αυξάνει στη διεθνή αγορά π.χ. Gaudalie, Darphin, Lierac, L'erbolario, Vichy, Natura Siberica κ.ά.. Στην περίπτωση του αντιερπητικού προϊόντος, το οποίο ανήκει στα ιατροτεχνολογικά προϊόντα ο ανταγωνισμός επεκτείνεται και σε εταιρείες οι οποίες προσφέρουν λύσεις στο συγκεκριμένο

πρόβλημα όπως έχουν αναφερθεί σε προηγούμενο τμήμα. Ο αριθμός των επιχειρήσεων που δραστηριοποιούνται στον κλάδο σε σύγκριση με το μέγεθος της αγοράς θεωρείται επαρκής για να καλύψει την ζήτηση, καθιστώντας έτσι έντονο τον ανταγωνισμό, ο οποίος εστιάζεται στην προσπάθεια αύξησης του μεριδίου αγοράς με ποικίλους τρόπους εις βάρος των υπόλοιπων ανταγωνιστών-εταιρειών. Μάλιστα επειδή οι επιχειρήσεις είναι αυξημένης και ίσης δυναμικότητας και μεγέθους, ο ανταγωνισμός αυξάνεται ακόμα περισσότερο. Σημαντική είναι η εστίαση στον αριθμό των ανταγωνιστών (οι οποίοι είναι αρκετοί) αλλά και στο ποιοι δρουν, σε ποιο ποσοστό αλλά και πού. Η ενδελεχής αναζήτηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών αλλά και διαφοροποιήσεων των προϊόντων δίνει σημαντικό πλεονέκτημα. Παρατηρείται μάλιστα διαφοροποίηση των προσφερόμενων προϊόντων στην ίδια κατηγορία. Το μεταβλητό κόστος και η εμπιστοσύνη των καταναλωτών στο brand είναι επίσης καθοριστικοί παράγοντες. Η πιστότητα στην μάρκα είναι ένα γεγονός που περιορίζει τη διαπραγματευτική δύναμη των πελατών. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά αναλύονται σε ξεχωριστές ενότητες της παρούσας εργασίας. Όσο μικρότερος είναι ο ανταγωνισμός τόσο μεγαλύτερη δύναμη έχει η εταιρεία στη διαμόρφωση τιμών και όρων για την επίτευξη αυξημένου αριθμού πωλήσεων και άρα κέρδους.

2. Πιθανή εισαγωγή στην αγορά νέων προϊόντων: Η παρασκευή του νέου προϊόντος εμπνεύρεται ειδική γνώση και τεχνολογία καθώς επίσης απαιτεί και εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό κάτι που αυξάνει το χρόνο εισαγωγής νέων παρόμοιων προϊόντων στην αγορά με αποτέλεσμα να προσφέρει πλεονέκτημα για την υφιστάμενη επιχείρηση. Μάλιστα το αυστηρό θεσμικό πλαίσιο που διέπει τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα σε συνδυασμό με τις πρόσφατες σχετικές νομοθετικές μεταβολές αποτελούν ένα ακόμα πιθανό εμπόδιο εισόδου στην αγορά των αντιεπιπητικών προϊόντων.
3. Διαπραγματευτική δύναμη προμηθευτών: σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν είναι ο αριθμός των προμηθευτών, το πόσο εξεζητημένα προϊόντα προσφέρουν (και αντίστοιχα χρειάζεται η εταιρεία) και η αντίστοιχα προσαρμοσμένη τιμή τους, η ικανότητα υποκατάστασης τους σε περίπτωση ανάγκης και όχι μόνο καθώς και το κόστος της αλλαγής αυτής. Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας είναι το μέγεθος των επιχειρήσεων των προμηθευτών που επιδρά στη διαπραγματευτική τους δύναμη. Όσο πιο μεγάλη εξάρτηση της εταιρείας για τους προμηθευτές της τόσο πιο μεγάλη πιθανότητα για μεγαλύτερη χρέωση. Στην εξεταζόμενη περίπτωση οι περιορισμένες επιλογές προμήθειας για την *Prunella vulgaris* και την χιτοζάνη αυξάνει τη σχέση εξάρτησης από συγκεκριμένους προμηθευτές με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο κόστος παραγωγής του τελικού προϊόντος.
4. Διαπραγματευτική δύναμη καταναλωτών: οι καθοριστικοί παράγοντες είναι ο αριθμός των πελατών, το μέγεθος της παραγγελίας τους, η ειδοποιός διαφορά μεταξύ των χαρακτηριστικών των ποικίλων προϊόντων και οι διακυμάνσεις στη τιμή που θα κρίνουν το πόσο εύκολα ή όχι ο καταναλωτής μπορεί να αντικαταστήσει τη χρήση του συγκεκριμένου προϊόντος. Η εμπιστοσύνη των τελικών καταναλωτών και η επιθυμία τους να πληρώσουν παραπάνω για να λάβουν ένα ποιοτικό, αποτελεσματικό και ολιστικό προϊόν με σεβασμό στο περιβάλλον αυξάνει τη δέσμευσή τους στην εταιρεία (και άρα περιορίζει τη διαπραγματευτική τους δύναμη) με αποτέλεσμα να αυξάνει τη δέσμευση και

των επιχειρήσεων-καταναλωτών (φαρμακεία, επιλεγμένα σημεία πώλησης κτλ.) στην περίπτωση της APIVITA. Όσο πιο πολλοί, μικροί και ανεξάρτητοι είναι οι καταναλωτές υπάρχει μεγαλύτερο περιθώριο για αυξημένη τιμολόγηση και αύξηση του κέρδους. Το USP του προϊόντος θα καθορίσει και τον αριθμό των καταναλωτών.

5. Απειλή από υποκατάστατα προϊόντα: οι κυριότεροι παράγοντες είναι η αποτελεσματικότητα του υποκατάστατου προϊόντος αλλά και το κόστος της αλλαγής. Πολύ κοντινά υποκατάστατα είναι για παράδειγμα τα «σπιτικά γιατροσόφια» με το χαμηλότερο κόστος, όπως έχει ήδη αναλυθεί, με συνέπεια την απώλεια δυνητικών πελατών οι οποίοι προτιμούν τις φυσικές λύσεις.

2.4 Ανάλυση αγοράς

2.4.1 Προφίλ καταναλωτή

Η στοχευμένη σκιαγράφηση του αντιπροσωπευτικού καταναλωτή όσον αφορά τις ανάγκες και τα χαρακτηριστικά του θα προσδώσει τρομερό συγκριτικό πλεονέκτημα τόσο στο νέο προϊόν όσο και στην εταιρεία, αποφεύγοντας τις δυνητικές απειλές για τις πωλήσεις. Χρησιμοποιείται, δηλαδή, σαν σημείο αναφοράς για τον καθορισμό των δραστηριοτήτων marketing και πωλήσεων που πρέπει να αναπτύξει η εταιρεία για να προσελκύσει τους πελάτες από την αγορά-στόχο.

Αποκωδικοποιώντας το προφίλ του αντιπροσωπευτικού καταναλωτή για το συγκεκριμένο αντιερπητικό προϊόν γίνεται αναφορά και στα δύο φύλα, μεσαίας με υψηλής οικονομικής τάξης και υψηλού μορφωτικού επιπέδου που ζει στους έντονους ρυθμούς της σύγχρονης πραγματικότητας και απαιτεί ένα πολυλειτουργικό προϊόν το οποίο θα αντιμετωπίζει ολιστικά το πρόβλημα με μια εφαρμογή. Το target group περιλαμβάνει όσους πέραν των ενοχλητικών συμπτωμάτων αντιμετωπίζουν και το κοινωνικό στίγμα που προκύπτει από το αισθητικό πρόβλημα και είναι πρόθυμοι να διαθέσουν ένα ποσό χρημάτων για ένα προϊόν που θα προσφέρει λύσεις σε περισσότερα επίπεδα. Βασικό χαρακτηριστικό του αντιπροσωπευτικού καταναλωτή επίσης θα είναι η προτίμηση των φυσικών λύσεων και η επιλογή προϊόντων που είναι απαλλαγμένα από τις επιπτώσεις βλαβερών πρόσθετων χημικών ουσιών ενώ παράλληλα θα είναι ευαισθητοποιημένος έναντι των περιβαλλοντικών προβλημάτων προσπαθώντας να αποφύγει την επιβάρυνση του περιβάλλοντος με κάθε δυνατό τρόπο. Τέλος είναι σημαντικό να είναι ενημερωμένος σχετικά με την κυκλοφορία και τις δυνατότητες που προσφέρει το προϊόν συνδυάζοντας τη δραστηριότητα εκχυλισμάτων, αιθέριων ελαίων και της πρόπολης καθώς δεν είναι λίγοι εκείνοι που έχουν απορρίψει τα επιθέματα λόγω έλλειψης πρακτικότητας (δυσκολία στη αφαίρεση, η αλλαγή απαιτεί περισσότερο χρόνο, τη χρήση καθρέπτη, καθαρισμό των χεριών πριν και μετά) όπως και την χρήση αντιικής φαρμακευτικής κρέμας λόγω της αντιαισθητικού αποτελέσματος. Ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση των δυνητικών πελατών είναι η κατηγοριοποίηση στα ακόλουθα τρία επίπεδα:

4. Total Available Market (TAM): είναι το σύνολο που περιλαμβάνει όλους όσους θα επιθυμούσε η εταιρεία να προσεγγίσει με το συγκεκριμένο αντιερπητικό προϊόν χωρίς κανένα γεωγραφικό περιορισμό, δηλαδή όσοι έχουν επιχείριο έρπητα.

5. Served Available Market (SAM): αποτελεί υποσύνολο του TAM, στο οποίο στοχεύει κυρίως η εταιρεία, δηλαδή όσοι έχουν επιχείλιο έρπητα σε ευρωπαϊκό επίπεδο και χρησιμοποιούν κάποια θεραπεία με σκοπό την αποτελεσματική αντιμετώπισή του.
6. Share Of the Market (SOM): αποτελεί υποσύνολο του SAM, το οποίο μπορεί ρεαλιστικά να προσεγγίσει η εταιρεία άμεσα και σε βραχυπρόθεσμο ορίζοντα.

Αντλώντας στοιχεία από την έρευνα του “Future Market Insights” για το μέγεθος της αγοράς των προϊόντων για τον επιχείλιο έρπητα του έτους 2017, υπολογίζεται ότι το TAM προσεγγίζει τα 769,85 εκατομμύρια ευρώ ενώ το μερίδιο της Ευρώπης, που αποτελεί το SAM, φτάνει τα 153,97 εκατομμύρια ευρώ. Το μερίδιο της αγοράς που θα μπορεί να προσεγγίσει η APIVITA, το οποίο αποτελεί το SOM, ανέρχεται στο ποσό των 13,86 εκατομμυρίων ευρώ σε εύρος πενταετίας με μεσοσταθμική αύξηση της τάξης του 9% το διάστημα αυτό. Το εκτιμώμενο ύψος των πωλήσεων στην πρώτη πενταετία ανέρχεται στα 138,60 εκατομμύρια ευρώ, με τιμή προϊόντος 10,00 ευρώ / τεμάχιο, η οποία υπολογίζεται αναλυτικά στην ενότητα 2.6.2..

Η καταγραφή του καταναλωτή-στόχου είναι μια πολυδιάστατη διαδικασία και θα πρέπει να δίνεται η ανάλογη προσοχή σε παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του προφίλ. Για παράδειγμα είναι πολύ σημαντικό να προσδιορισθεί η γεωγραφική περιοχή κατά την εξαγωγική δραστηριότητα της εταιρείας καθώς επηρεάζει πληθώρα παραγόντων από το πώς αντιλαμβάνεται ο καταναλωτής την έννοια του φυσικού προϊόντος, τα δημογραφικά στοιχεία για το ποσοστό των ανθρώπων με τη συγκεκριμένη πάθηση, το πόσο οι παράγοντες που ευνοούν την εμφάνιση του επιχείλιου έρπητα είναι κυρίαρχοι (υπεριώδη ακτινοβολία, έντονος ρυθμός ζωής, άγχος) μέχρι την γενικότερη επικρατούσα αντίληψη και νοοτροπία καθώς υπάρχουν έντονες διαφοροποιήσεις ανά τις ηπείρους.

Να υπογραμμιστεί πως παραπάνω έγινε προσπάθεια να προσδιορισθεί το προφίλ του τελικού καταναλωτή στον οποίο απευθύνεται το προϊόν. Δεν πρέπει όμως να παραγκωνιστεί το γεγονός πως η APIVITA μέσω των καναλιών διανομής που θα αναλυθούν παρακάτω απευθύνεται και σε πολλές επιχειρήσεις (όπως τα φαρμακεία, τις φαρμακαποθήκες και επιλεγμένα σημεία πώλησης π.χ. Hondos center, Notos Galleries, Attica κτλ.). Βέβαια εδώ τα πράγματα είναι απλούστερα καθώς, πάντα προσαρμοσμένα στα ελληνικά δεδομένα, η εταιρεία έχει κερδίσει την εμπιστοσύνη των φαρμακοποιών αλλά και των υπόλοιπων επιχειρήσεων οι οποίοι και αυτοί με τη σειρά τους θέλουν να προσφέρουν μια ευρεία γκάμα με τις καλύτερες επιλογές στους πελάτες τους, υποδεχόμενοι θερμά κάθε νέο προϊόν. Στο σημείο αυτό μια εξαιρετική χρήσιμη κατηγοριοποίηση των καταναλωτών είναι η εξής: 1) ο «ευεργετούμενος» από τη δράση του προϊόντος και αυτός που απαντά θετικά στην ερώτηση κατοχής προβλήματος 2) ο «χρήστης» του προϊόντος 3) ο «αγοραστής» του προϊόντος. Ο «παραγωγός» του προϊόντος θα πρέπει να ικανοποιεί όλες τις παραπάνω ομάδες. Στην μελετώμενη περίπτωση ο «ευεργετούμενος» θα είναι ο ασθενής ο οποίος έχει επιχείλιο έρπητα, ο «χρήστης» είναι και πάλι ο ασθενής καθώς θα είναι αυτός που θα εφαρμόζει το προϊόν και ο «αγοραστής» θα είναι είτε απευθείας ο ασθενής είτε οι επιχειρήσεις που μεσολαβούν στην λιανική πώληση, π.χ. φαρμακεία και επιλεγμένα σημεία πώλησης. Όσο καλύτερη η αναγνώριση των ομάδων αυτών, των προσδοκιών τους και του τρόπου με τον οποίο θα επιτευχθούν τα παραπάνω, τόσο περισσότερο

μπορεί να εστιάσει η εκάστοτε εταιρεία στην αύξηση της ικανοποίησής τους και να υιοθετήσει την καταλληλότερη στρατηγική.

2.4.2 Ανάλυση αγοράς και κλάδου – Εξωτερικό περιβάλλον

Αν και το αντιερπητικό προϊόν χαρακτηρίζεται ως ιατροτεχνολογικό προϊόν ή αλλιώς *medical device*, κι όχι καλλυντικό, η φυσική του σύσταση και το λανσάρισμά του από την APIVITA, εταιρεία φυσικών καλλυντικών, το τοποθετούν όσον αφορά τον ανταγωνισμό ανάμεσα στα φυσικά προϊόντα. Έτσι η αγορά και το περιβάλλον που θα διερευνηθούν θα είναι κατά κύριο λόγο αυτή των φυσικών προϊόντων.

Στην μελέτη του επικρατούντος εξωτερικού περιβάλλοντος, είναι χρήσιμο να αναφερθούν οι αλλαγές στη συμπεριφορά των καταναλωτών τα τελευταία χρόνια. Η περιβαλλοντική συνείδηση έχει αυξηθεί και αυτό αντανακλάται στην καταναλωτική συμπεριφορά οδηγώντας στην αύξηση των προϊόντων που είναι φιλικά προς το περιβάλλον. Ως μια τάση που έχει πλέον καθιερωθεί θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη από τα τμήματα *marketing* και πωλήσεων. Οι καταναλωτές επίσης επικεντρώνονται περισσότερο από ποτέ πριν στην προαγωγή της υγείας τους. Η επιλογή των οικολογικών προϊόντων γίνεται όχι μόνο για την προστασία του περιβάλλοντος αλλά και για την προαγωγή της υγείας και εφαρμόζεται σε όλους πλέον τους τομείς των αγαθών. Επίσης βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη ζήτηση είναι το διαθέσιμο εισόδημα, το φύλο και η ηλικία, η εποχικότητα, η μόδα και η πιστότητα στη μάρκα (*brand loyalty*). Σημαντικό ρόλο παίζουν και οι υποκειμενικοί παράγοντες του κάθε καταναλωτή. Μια συγκεκριμένη υποκειμενική πεποίθηση μπορεί να ελέγξει τη συμπεριφορά του καταναλωτή και να τον ωθήσει να δράσει με διαφορετικό τρόπο από αυτό που θα επιθυμούσε. Έτσι το περιβάλλον συμπεριλαμβανομένου των κοινωνικών πεποιθήσεων, των M.M.E. και των κοινωνικών μέσων δικτύωσης διαμορφώνουν σημαντικά την καταναλωτική τάση (Bayaah, 2018). Trends τα οποία ακολουθούν οι Ευρωπαίοι καταναλωτές είναι ότι:

1. προτιμούν τα προϊόντα εταιρειών που προάγουν την αειφόρο βιωσιμότητα και απαιτούν και πιστοποιήσεις που να το αποδεικνύουν
2. προτιμούν πιστοποιημένες πρώτες ύλες οι οποίες είναι οργανικές και προάγουν το δίκαιο εμπόριο
3. επιλέγουν καινοτόμα προϊόντα και
4. δραστικά συστατικά με αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα
5. δίνουν μεγαλύτερη προσοχή στη νομοθετική ασφάλεια και την προστασία του περιβάλλοντος.

Ένας άλλος παράγοντας μελέτης του εξωτερικού περιβάλλοντος είναι η οικονομική ανάπτυξη του τομέα των φυσικών προϊόντων. Ο τομέας των φυσικών προϊόντων έχει εγκαθιδρυθεί στις διεθνείς αγορές και εμφανίζει διαφορετικό αν και ολόένα και αυξανόμενο επίπεδο ανάπτυξης, κάτι που απαιτεί προσεκτική μελέτη και συνδυασμό πολλών παραμέτρων για να δοθεί μια ξεκάθαρη και αντιπροσωπευτική εικόνα. Για αυτόν ακριβώς το λόγο κρίθηκε σκόπιμο να παρουσιαστούν δεδομένα από την αγορά των φυσικών προϊόντων, των προϊόντων θεραπείας επιχείλιου έρπητα αλλά και της χιτοζάνης με σκοπό να δικαιολογηθεί η επιλογή της.

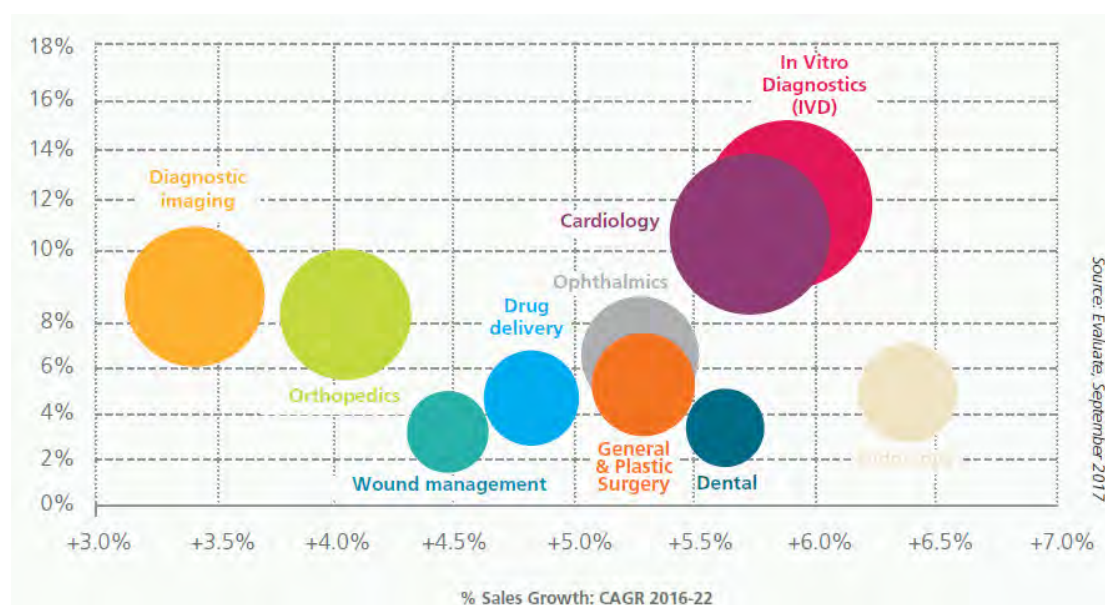
Η παγκόσμια αγορά των φυσικών προϊόντων περιποίησης προβλέπεται να φτάσει τα 25,11 δισεκατομμύρια US \$ (United State Dollars) μέχρι το 2025 σύμφωνα με τη νέα έκθεση της “Grand View Research” το 2018. Αναμένεται μάλιστα να καταγραφεί CAGR 9,4%. Αύξηση των δαπανών των τμημάτων Έρευνας και Ανάπτυξης για εισαγωγή βελτιωμένων εκχυλισμάτων προερχόμενων από φυτά και ζώα στα διάφορα προϊόντα αναμένεται να αυξήσει ακόμα περισσότερο τη ζήτηση. Επιπλέον κανονισμοί που προωθούν την χρήση οργανικών υλικών στη βιομηχανία προσωπικών προϊόντων θα εντείνουν ακόμα περισσότερο τη ζήτηση. Η αυξημένη επιλογή των οργανικών προϊόντων από τους καταναλωτές οδήγησε επίσης σε αύξηση της διαθεσιμότητας αυτών στα φαρμακεία, τα σουπερμάρκετ και τα malls. Επιπλέον η ανάπτυξη της online αγοράς όπου οι καταναλωτές προσεγγίζουν μια ευρεία γκάμα προϊόντων από οποιοδήποτε σημείο του κόσμου αποτέλεσε ένα έναυσμα για αύξηση της προσβασιμότητας σε αυτά τα προϊόντα και αναμένεται να είναι παράγοντας κλειδί για την ανάπτυξη της αγοράς την επόμενη χρονική περίοδο. Επιπλέον οι on-line αγορές έδωσαν στους καταναλωτές την ευκαιρία αυτής της πρόσβασης σε προϊόντα τα οποία διαφορετικά δεν θα μπορούσαν να αποκτήσουν καθιστώντας τα ιδιαίτερα δημοφιλή. Τα προϊόντα αυτά αντανακλούν το καλύτερο βιοτικό επίπεδο και κατά επέκταση την επιθυμία για υγεία, ευεξία και ομορφιά και η υιοθέτηση αυτών των πεποιθήσεων είναι ολοένα αυξανόμενη. Μια άλλη τάση που επικρατεί τα τελευταία χρόνια είναι η χρήση προϊόντων που δεν περιέχουν αρώματα, συντηρητικά, parabens, πετροχημικά, σκληρά καθαριστικά όπως sodium lauryl sulfate και άλλες βλαβερές προς το περιβάλλον και την υγεία ουσίες.

Το μεγαλύτερο μερίδιο αγοράς για το 2018 σε οργανικά προϊόντα το είχε η Βόρεια Αμερική (Ηνωμένες Πολιτείες, Καναδάς, Μεξικό) και αναμένεται να διατηρήσει την ηγετική θέση της και τα επόμενα χρόνια. Στην Ευρώπη οι χώρες με σημαντικό μερίδιο αγοράς είναι η Γερμανία, η Γαλλία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Ρωσία, η Ιταλία, η Ισπανία, η Ολλανδία και η Πολωνία. Οι αντίστοιχες χώρες στην Ασία είναι η Κίνα, η Ινδία, η Ιαπωνία, η Νότια Κορέα κ.ά. ενώ λιγότερες χώρες από την κεντρική και νότια Αμερική καθώς και από την Μέση Ανατολή και την Αφρική φαίνεται να συμβάλλουν στην διαμόρφωση της αγοράς των φυσικών προϊόντων. Ένα ακόμα στοιχείο που αποδεικνύει την άνθηση και την ωρίμανση της αγοράς των φυσικών προϊόντων είναι η αύξηση των πωλήσεων πολλών πιστοποιημένων εταιρειών φυσικών καλλυντικών με συνέπεια βέβαια να ανεβαίνει και ο πήχης των κριτηρίων και των απαιτήσεων των καταναλωτών.

Σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του μεριδίου της αγοράς έχουν τα κανάλια διανομής. Τα supermarkets/hypermarkets συμμετείχαν στο μερίδιο της αγοράς με 13,67 δισεκατομμύρια US \$ το 2018 και έπειτα ακολουθούσαν τα λεγόμενα “convenience stores” με 10,16 δισεκατομμύρια US \$ για την ίδια χρονιά. Αυτή η αύξηση αποδίδεται αρχικώς στη δυνατότητα άμεσης σύγκρισης και δοκιμής όλων των διαθέσιμων προϊόντων πριν την αγορά με τη ταυτόχρονη βοήθεια από τους ειδικούς των καταστημάτων για την επιλογή του καταλληλότερου προϊόντος και δευτερευόντως στην άμεση διάθεση των προϊόντων σε αντίθεση με τον χρόνο αναμονής κατά των ηλεκτρονικών παραγγελιών. Από την άλλη μεριά το πιο πολλά υποσχόμενο κανάλι για την επερχόμενη περίοδο αναμένεται να είναι τα ηλεκτρονικά καταστήματα με CAGR 4,47%. Η εύκολη πρόσβαση σε διαφορετικά brands φαίνεται να είναι ο σημαντικότερος λόγος επιλογής αυτού του καναλιού. Ο τρόπος αυτός εξυπηρετεί και τις εταιρείες

καθώς με χαμηλότερο ρίσκο επένδυσης δημιουργούν ευκαιρία αύξησης των εσόδων τους. Υπάρχουν διάφορα websites με online portals όπως Nykaa, Amazon, Jabong, Credo Beauty κ.ά.

Είναι εξίσου κρίσιμο όμως να διερευνηθεί και η αγορά των ιατροτεχνολογικών προϊόντων. Σύμφωνα με μελέτη του “Research and Markets” η παγκόσμια αγορά των ιατροτεχνολογικών προϊόντων αναμένεται να φτάσει τα 409,5 δισεκατομμύρια US \$ μέχρι το 2023 με CAGR 4,5% από το 2018 μέχρι το 2023. Οι σημαντικότερες ευρωπαϊκές αγορές βρίσκονται στην Γερμανία, την Γαλλία, το Ηνωμένο Βασίλειο, την Ιταλία και την Ισπανία. Η αγορά της Ευρώπης αποτελεί τη δεύτερη μεγαλύτερη αγορά μετά των Η.Π.Α. σύμφωνα με δεδομένα από την MedTech Europe 2018.

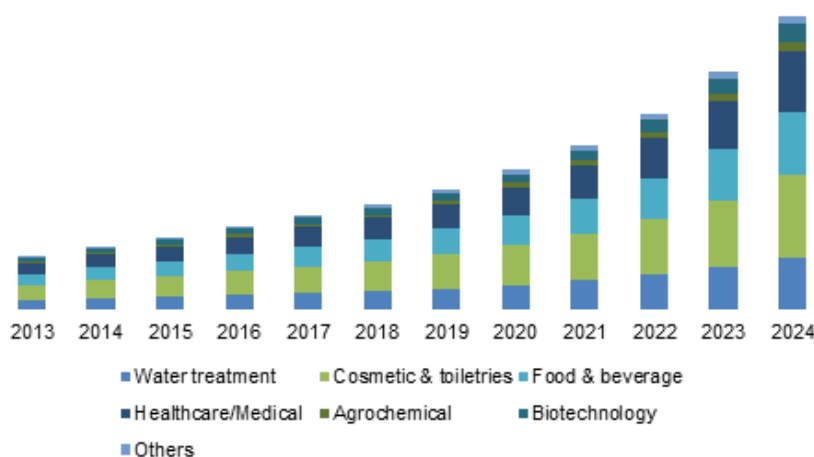


Εικόνα 22. Παρουσιάζεται η παγκόσμια αγορά ιατροτεχνολογικών προϊόντων κατά αντικείμενο και ρυθμό ανάπτυξης πωλήσεων κατά την περίοδο 2016-2022. Φαίνεται να προπορεύεται ο τομέας της διαγνωστικής, να ακολουθεί ο τομέας της καρδιολογίας και της διαγνωστικής απεικόνισης και να έπονται τομείς όπως ο ορθοπεδικός, ο οφθαλμικός, ο ενδοσκοπικός, της γενικής πλαστικής χειρουργικής, της οδοντιατρικής και της διαχείρισης τραύματος (MedTech, 2018).

Είναι πολύ σημαντικό να εξεταστεί όμως και το μέγεθος και οι συνθήκες της αγοράς όσον αφορά τη χρήση του προϊόντος δηλαδή την αντιερωτική θεραπεία. Σύμφωνα με έρευνα του “Future Market Insights” η παγκόσμια αγορά για τη θεραπεία του επιχειλίου έρπητα αναμένεται να αυξηθεί με CAGR 4,6% την περίοδο 2017-2027. Το 2017 η αγορά του επιχειλίου έρπητα προσέγγισε τα 869,3 εκατομμύρια US \$ (769,85 ευρώ) και αναμένεται να ξεπεράσει τα 1,3 δισεκατομμύρια US \$ (1,15 δισεκατομμύρια ευρώ) μέχρι το τέλος του 2027. Οι καινοτομίες στον τύπο και τον τρόπο δράσης των φαρμάκων καθώς και η συνεχόμενη αύξηση των γενόσημων όπως και οι διαφορετικές προσεγγίσεις στη θεραπεία θα ωθήσουν την αύξηση των επενδύσεων της Έρευνας και Ανάπτυξης καθώς και τις συγχωνεύσεις σημαντικών εταιρειών. Και πάλι διαφαίνεται η Βόρεια Αμερική στην κορυφή του μεριδίου της αγοράς με 35% το 2017 ενώ αναμένεται να το διατηρήσει και την επόμενη χρονική περίοδο. Ακολουθεί η Ευρώπη με μερίδιο αγοράς 20% το 2017. Βέβαια στην θεραπεία του επιχειλίου έρπητα εμπλέκονται κυρίως αμιγώς φαρμακευτικές εταιρείες όπως η Pfizer, η Mylan και η Abbott Laboratories. Ανάλογες μελέτες έχουν διεξαχθεί από την WiredRelease και της

Expresswire μέσω της COMTEX όπως και η “Research and Markets” διερευνώντας όλες το πεδίο θεραπείας του επιχείλου έρπητα και δείχνοντας αύξηση δραστηριότητας στο πεδίο σε παγκόσμιο επίπεδο.

Τέλος ένα άλλο σημείο που θα παίξει πολύ σημαντικό ρόλο στην επιλογή ή όχι της επένδυσης του αντιερπητικού προϊόντος είναι η διερεύνηση της αγοράς τη χιτοζάνης. Μεταξύ άλλων πολυμερών αρκετά φθηνότερων επιλέχθηκε να δοκιμασθεί η χιτοζάνη καθώς υπόσχεται όχι μόνο το σχηματισμό του φιλμ αλλά και την ταχύτερη επούλωση των τραυμάτων όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή. Η επένδυση λοιπόν σε μια τόσο ακριβή πρώτη ύλη ωθεί την έρευνα για το ρόλο που θα διαδραματίσει η χιτοζάνη τα επόμενα χρόνια στα προϊόντα επούλωσης και περιποίησης. Σύμφωνα με την έρευνα “Global Market Insights” η αγορά της χιτοζάνης ξεπέρασε τα 1,5 δισεκατομμύρια US \$ το 2017 και αναμένεται να αυξηθεί με περισσότερο από 20% CAGR την περίοδο 2018-2024.



Διάγραμμα 14. Διαφαίνονται οι τομείς τις αγοράς στις οποίες θα παίξει σημαντικό ρόλο η χιτοζάνη σαν υλικό με ποικίλες εφαρμογές καθώς και η αύξησή της στην αγορά (Global Market Insights, 2018).

Το υψηλό κόστος παραγωγής παραμένει ένας ανασταλτικός παράγοντας για την συνολική αύξηση στο πεδίο της αγοράς την προβλεπόμενη περίοδο, όμως τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της όπως η βιοαποικοδόμηση, η μη τοξικότητα και η ευρεία χρήση της σε πολλούς τομείς της υγείας φαίνεται τελικά να την καθιερώνουν. Μάλιστα η εφαρμογή της είναι ευρεία σε προϊόντα περιποίησης (από αντιγηραντικές κρέμες, προϊόντα μαλλιών, στοματικής υγιεινής, φορέας δραστικών ουσιών κ.ά.) μέχρι την επούλωση σοβαρών τραυμάτων (Aranaz *et al.*, 2018).

2.5 Κανάλια διανομής

Η APIVITA ως υφιστάμενη εταιρεία έχει αναπτύξει συγκεκριμένα κανάλια διανομής, τα οποία αριθμούνται παρακάτω:

1. Τα μεγάλα φαρμακεία, σε όλη τη χώρα τα οποία στις περισσότερες των περιπτώσεων τροφοδοτούνται με ολόκληρη την γκάμα των προϊόντων της

- εταιρείας και αποτελούν σημεία λιανικής πώλησης, καθώς και οι φαρμακαποθήκες
2. Επιλεκτική διανομή σε αλυσίδες και καταστήματα καλλυντικών τα οποία προμηθεύονται με σημαντικά brands, όπως το Hondos center, Attica, Notos Galleries κτλ.
 3. Τα experience stores που ανήκουν στην APIVITA και αποτελούν σημεία άμεσης διανομής
 4. Τα travel retails που ανήκουν και αυτά στην εταιρεία και αποτελούν σημεία άμεσης διανομής
 5. Το e-commerce
 6. Σε ξενοδοχεία και σπα ή αλλιώς “Hotel & spa” τα οποία προμηθεύει απευθείας με τα προϊόντα της για χρήση τους από τους πελάτες των ξενοδοχείων

Η εταιρεία με αυτόν τον τρόπο θα έχει τον πλήρη έλεγχο στον τρόπο προώθησής του και ένταξής του στην αγορά καθώς το ανθρώπινο δυναμικό που επανδρώνει τα τμήματα προώθησης θα μπορεί να αφουγκραστεί τις ανάγκες και τις απαιτήσεις των καταναλωτών και να δώσει τις ανάλογες πληροφορίες πίσω στην εταιρεία. Ταυτόχρονα θα υπάρχει δυνατότητα πιο εντατικής προώθησής του, με δοκιμή και άμεσα διαθέσιμο προσωπικό για την επίλυση οποιοδήποτε αποριών. Κάτι τέτοιο, βέβαια, απαιτεί δαπάνη χρόνου, χρημάτων και εκπαίδευσης ανθρώπινου δυναμικού που πρέπει σίγουρα να ληφθεί υπόψη.

2.6 Οικονομικά στοιχεία

2.6.1 Πηγές χρηματοδότησης και κεφαλαιακές ανάγκες

Η APIVITA είναι μια υφιστάμενη εταιρεία με πολύχρονη εμπειρία και ήδη καθιερωμένη γραμμή παραγωγής για 352 προϊόντα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι βασικές κεφαλαιακές ανάγκες όπως οι εγκαταστάσεις, τα εργαστήρια και ο απαραίτητος εξοπλισμός και το ανθρώπινο δυναμικό που απαιτείται για την υλοποίηση της παραγωγής νέων προϊόντων να υπάρχουν ήδη δίνοντας ένα αρχικό πλεονέκτημα τόσο στην εταιρεία όσο και στο δυνητικό προϊόν. Η παραγωγή του νέου αντιερπητικού προϊόντος έχει μικρές απαιτήσεις όσον αφορά τον επιπρόσθετο εξοπλισμό όπως την αγορά ενός βιομηχανικής κλίμακας συμπυκνωτή, με στόχο την συμπίκνωση των εκχυλισμάτων και της πρόπολης πριν την εισαγωγή τους στο προϊόν. Έπειτα από σχετική έρευνα, η αγορά ενός συμπυκνωτή για παράδειγμα της εταιρείας YNCHEM χωρητικότητας 50 λίτρων και βάρους 220 κιλών μεγάλης ισχύος, θα κόστιζε γύρω στα 16500 ευρώ συμπεριλαμβάνοντας το κόστος των μεταφορικών. Η εταιρεία θα μπορούσε να πραγματοποιήσει την παραπάνω αγορά με δικούς της πόρους.

2.6.2 Ανάλυση κόστους προϊόντος και περιθώριο κέρδους

Ο οικονομικός στόχος κάθε επιχείρησης είναι η μεγιστοποίηση των κερδών της. Για τον υπολογισμό των κερδών είναι χρήσιμο να οριστούν: 1) το συνολικό έσοδο ως το ποσό που εισπράττει μια επιχείρηση από την πώληση του προϊόντος ή των υπηρεσιών της 2) το συνολικό κόστος ως το ποσό που πληρώνει μια επιχείρηση για την αγορά των

εισροών που χρησιμοποιεί στην παραγωγή του αγαθού και 3) το κέρδος ως το σύνολο των εσόδων μείον το σύνολο του κόστους.

Το κόστος παραγωγής μιας επιχείρησης συμπεριλαμβάνει το σύνολο του κόστους ευκαιρίας που συνεπάγεται η παραγωγή του προϊόντος. Το κόστος παραγωγής μιας επιχείρησης περιλαμβάνει φανερά και αφανή κόστη. Το φανερό κόστος είναι το άμεσα πληρωτέο κόστος των συντελεστών παραγωγής και το αφανές κόστος δεν έχει άμεση πληρωμή.

Για να επιτευχθεί ο υπολογισμός του συνολικού κόστους του προϊόντος είναι σκόπιμο να υπολογισθεί πρώτα το κόστος παραγωγής των δύο εκχυλισμάτων της *Prunella vulgaris* και της *Melissa officinalis*. Για τα υπόλοιπα συστατικά καθώς και για την προτεινόμενη συσκευασία έχουν χρησιμοποιηθεί προσφορές από τους αντίστοιχους προμηθευτές.

2.6.2 | Υπολογισμός κόστους εκχυλισμάτων

Στους πίνακες που ακολουθούν καταγράφονται οι ποσότητες των συστατικών που απαιτούνται εκφρασμένες σε μονάδες βάρους (kg) και το κόστος αυτών ανά κιλό για την παραγωγή των δύο φυτικών εκχυλισμάτων. Έτσι υπολογίζεται το πόσο κοστίζει ένα κιλό εκχυλίσματος, το οποίο συνήθως είναι ένα πολύ μικρό ποσό. Το τελικό κόστος όμως των εκχυλισμάτων είναι αυξημένο καθώς πέρα από τις πρώτες ύλες απαιτούνται και άλλα αναλώσιμα όπως φίλτρα (συγκεκριμένα απαιτούνται τρία φίλτρα με κόστος πέντε ευρώ το καθένα, δηλαδή σύνολο δεκαπέντε) και συνυπολογίζονται παράγοντες όπως η απόσβεση της συσκευής φιλτραρίσματος (η οποία θα επιτευχθεί σε εύρος πενταετίας), η εργασία των ανθρώπων στον ποιοτικό και μικροβιολογικό έλεγχο για να εγκρίνουν τις προδιαγραφές του, η εργασία των ανθρώπων που γενικότερα ασχολήθηκαν με την παραγωγή αυτών κτλ.. Αρκετές φορές μάλιστα απαιτείται επιπλέον επεξεργασία όπως δεύτερο φιλτράρισμα με αποτελέσματα να διπλασιάζεται το κόστος. Ένα ακόμα στοιχείο που αυξάνει το κόστος των εκχυλισμάτων είναι η παραγωγή μικρών ποσοτήτων από το εκάστοτε εκχύλισμα, για λόγους όπως η επίτευξη αυξημένων ποιοτικών χαρακτηριστικών κάτι που επιτυγχάνεται με την εισαγωγή νεοπαραχθέντων εκχυλισμάτων στα προϊόντα καθώς επίσης και το αυξημένο κόστος αποθήκευσής τους. Οι παραπάνω παράγοντες οδηγούν στον συνυπολογισμό του ποσού των 43,75 ευρώ επιπλέον ανά κιλό στο κόστος του κάθε εκχυλίσματος το οποίο είναι ο μέσος όρος των δύο υψηλότερων ποσών που έχουν προκύψει στην εταιρεία κατά την παρασκευή εκχυλίσματος και καλύπτει γενναιόδωρα τις περισσότερες των περιπτώσεων. Ένα άλλο σημαντικό σημείο είναι οι μεγάλες απώλειες κατά την παρασκευή των εκχυλισμάτων καθώς το κάθε φίλτρο για παράδειγμα συγκρατεί ένα κιλό, με αποτέλεσμα οι απώλειες να φτάνουν τα τρία κιλά. Το φυτικό υλικό επίσης συγκρατεί ποσότητα του εκχυλίσματος με αποτέλεσμα η φύρα στο σύνολο να υπολογίζεται σε 20%, συμπεριλαμβανομένων όλων των παραγόντων. Τέλος τα εκχυλίσματα, πριν την ενσωμάτωσή τους στο προϊόν συμπυκνώνονται. Η απόδοση της συμπύκνωσης είναι περίπου 20% και αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα διαμόρφωσης του κόστους καθώς υπάρχουν μεγάλες απώλειες.

Πίνακας 31. Υπολογισμός κόστους του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος *Melissa officinalis*.

Εκχύλισμα <i>Melissa officinalis</i>				
Περιγραφή	Ποσότητα/kg	Μονάδα Μέτρησης	Κόστος αγοράς α' ύλης/kg (€)	Κόστος α' ύλης στο εκχύλισμα/kg (€)
γλυκερίνη	0,381	kg	1,320	0,503
υπερκάθαρο νερό	0,580	kg	0,000	0,000
φυτό <i>Melissa officinalis</i>	0,024	kg	13,000	0,317
microcare SB	0,010	kg	5,500	0,055
κιτρικό οξύ	0,004	kg	1,810	0,007
Σύνολο	1	kg		0,883
Πραγματικό Κόστος/kg				43,834
Κόστος μετά την συμπύκνωση (απόδοση 20%)				219,168

Πίνακας 32. Υπολογισμός κόστους του συμπυκνωμένου εκχυλίσματος *Prunella vulgaris*.

Εκχύλισμα <i>Prunella vulgaris</i>				
Περιγραφή	Ποσότητα/kg	Μονάδα Μέτρησης	Κόστος αγοράς α' ύλης/kg (€)	Κόστος α' ύλης στο εκχύλισμα/kg (€)
γλυκερίνη	0,381	kg	1,320	0,503
υπερκάθαρο νερό	0,580	kg	0,000	0,000
φυτό <i>Prunella vulgaris</i>	0,024	kg	101,740	2,482
microcare SB	0,010	kg	5,500	0,055
κιτρικό οξύ	0,004	kg	1,810	0,007
Σύνολο	1	kg		3,048
Πραγματικό Κόστος/kg				46,540
Κόστος μετά την συμπύκνωση (απόδοση 20%)				232,701

2.6.2 II Κόστος καθαρού προϊόντος

Στον Πίνακα 33 διακρίνονται οι ποσότητες των συστατικών του αντιερπητικού προϊόντος εκφρασμένες σε μονάδες βάρους (kg) και το κόστος αυτών ανά κιλό. Η φύρα υπολογίζεται σε χαμηλότερο ποσοστό αυτό του 10%.

Πίνακας 33. Υπολογισμός κόστους του καθαρού προϊόντος CS-ALL 6.

Καθαρό προϊόν CS-ALL				
Συστατικά προϊόντος	Ποσότητα/ kg	Μονάδα Μέτρησης	Κόστος αγοράς α' ύλης/kg (€)	Κόστος α' ύλης στο προϊόν/kg (€)
Υπερκάθαρο νερό	0,475	kg	0,400	0,190
Αιθανόλη	0,400	kg	1,350	0,540
Χιτοζάνη	0,030	kg	900,000	27,000
Γαλακτικό οξύ	0,040	kg	4,020	0,161
1,3-προπανεδιόλη	0,020	kg	6,980	0,140
Συμπυκνωμένο εκχύλισμα <i>M. officinalis</i>	0,010	kg	219,200	2,192
Συμπυκνωμένο εκχύλισμα <i>P. vulgaris</i>	0,010	kg	232,700	2,327
Βάμμα πρόπολης	0,010	kg	237,700	2,377
Αιθέριο έλαιο <i>T. vulgaris</i>	0,004	kg	270,000	0,945
Αιθέριο έλαιο <i>M. piperita</i>	0,002	kg	102,000	0,153
Σύνολο	1	kg		36,024
Πραγματικό κόστος/kg				40,023
Κόστος/τμχ (7 g)				0,280

2.6.2 III Κόστος τελικού προϊόντος

Σε αυτό το στάδιο, μαζί με το καθαρό προϊόν συνυπολογίζονται η συσκευασία που περιέχει το προϊόν η οποία μάλιστα είναι τυπωμένη με το επιθυμητό λογότυπο το οποίο συμπεριλαμβάνεται στο κόστος, το χάρτινο κουτί που περικλείει τη συσκευασία, το φύλλο οδηγιών και το χαρτοκιβώτιο το οποίο θα περιλαμβάνει τις χάρτινες συσκευασίες κατά τη μεταφορά του στα σημεία πώλησης. Εδώ υπολογίζεται και το πρότυπο κόστος άμεσης εργασίας/μονάδα, το πρότυπο κόστος σταθερών Γενικών Βιομηχανικών Εξόδων (ΓΒΕ)/ μονάδα και το πρότυπο μεταβλητό κόστος σταθερών ΓΒΕ/μονάδα στα 0,5 ευρώ. Εδώ περιέχονται τα έξοδα διανομής τα οποία ανέρχονται στα 0,1 ευρώ ανά τεμάχιο.

Πίνακας 34. Υπολογισμός κόστους του συσκευασμένου προϊόντος CS-ALL 6.

Συσκευασμένο προϊόν			
Περιγραφή	Ποσότητα	Μονάδα Μέτρησης	Ευρώ/τμχ
Αντιερπητικό προϊόν	1	TEM	0,280
Φύλλο οδηγιών	1	TEM	0,035
Σωληνάριο συσκευασίας	1	TEM	0,482
Κουτί συσκευασίας	1	TEM	0,340
Χαρτοκιβώτιο	0,020088		0,123
Κόστος διανομής	1	TEM	0,100
Πρότυπο κόστος	1	TEM	0,500
Σύνολο	1	TEM	1,861

2.6.2 IV Τιμή τελικού προϊόντος

Η τιμολογιακή πολιτική αποτελεί θέμα marketing καθώς επικοινωνεί με αυτόν τον τρόπο στους πελάτες την τοποθέτηση της επιχείρησης που αντικατοπτρίζει την γενικότερη φιλοσοφία της. Υπάρχουν βέβαια κάποιοι κανόνες που θα πρέπει να ακολουθούνται όπως: 1) να καλύπτει το μοναδιαίο κόστος 2) μπορεί να μην έχει ως κύρια προτεραιότητα την άμεση μεγιστοποίηση του κέρδους 3) θα πρέπει να βρίσκεται σε συμφωνία με τις απαιτήσεις και τις προσδοκίες των δυνητικών πελατών ενώ ταυτόχρονα θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη παράγοντες όπως: το επιθυμητό περιθώριο κέρδους, οι τιμές των ανταγωνιστών και η πραγματική αξία που προσφέρει στους πελάτες. Η τελική τιμή του αντιερπητικού προϊόντος διαμορφώνεται γύρω στα 10,00 ευρώ έχοντας λάβει υπόψη το κέρδος της εταιρείας, των φαρμακαποθηκών καθώς και των φαρμακείων και των υπόλοιπων καταστημάτων λιανικής.

Πίνακας 35. Υπολογισμός τιμής πώλησης του τελικού συσκευασμένου προϊόντος. Ένδειξη*: Στα καταστήματα λιανικής συμπεριλαμβάνονται τα φαρμακεία και τα σημεία επιλεκτικής διανομής.

Περιγραφή	Ποσότητα	Μονάδας Μέτρησης	Ευρώ/τμχ
Τελικό κόστος	1	TEM	1,861
Τιμή πώλησης από την APIVITA	1	TEM	7,444
Τιμή πώλησης από τις φαρμακαποθήκες	1	TEM	7,816
Τιμή πώλησης από τα καταστήματα λιανικής*	1	TEM	10,049

2.6.3 Νεκρό σημείο

Είναι εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο η Ανάλυση του Νεκρού Σημείου. Το Νεκρό Σημείο είναι το σημείο εκείνο των πωλήσεων με το οποίο μια επιχείρηση καλύπτει τόσο τα σταθερά όσο και τα μεταβλητά της έξοδα χωρίς να πραγματοποιεί ούτε κέρδος ούτε ζημία. Υπολογίζει τον αριθμό των προϊόντων που πρέπει να πωληθούν σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή ώστε να καλυφθεί εξ ολοκλήρου το κόστος παραγωγής. Είναι με άλλα λόγια το σημείο που ικανοποιεί την εξίσωση: Συνολικά Έσοδα=Συνολικά έξοδα. Η εύρεση του νεκρού σημείου επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του τύπου: $QNEΣ = \frac{ΣΚ}{P-M}$, όπου ΣΚ είναι το σταθερό κόστος, P είναι η τιμή πώλησης και M είναι το μεταβλητό κόστος. Ως σταθερό κόστος ορίζεται το κόστος που δεν επηρεάζεται από

τις μεταβολές του επιπέδου δραστηριότητας της λειτουργικής μονάδας και για την παραγωγή του μελετώμενου προϊόντος ανέρχεται στο ποσό των 86700 ευρώ, συμπεριλαμβανομένου των μισθών, το κόστος του συμπυκνωτή, της απόσβεσης των υπόλοιπων χρησιμοποιούμενων μηχανημάτων κτλ.. Ως μεταβλητό κόστος ορίζεται το κόστος που επηρεάζεται από τις μεταβολές του επιπέδου δραστηριότητας της λειτουργικής μονάδας και στην περίπτωση αυτή ανέρχεται στο ποσό των 1,861 ευρώ ενώ η τιμή πώλησης ανέρχεται στα 7,444 ευρώ. Εφαρμόζοντας τον τύπο, προκύπτει ότι η εταιρεία για να αποκομίσει κέρδος θα πρέπει να διαθέσει περισσότερα από 15530 προϊόντα ετησίως.

2.7 Νομικό πλαίσιο προϊόντος

Κατά τη διεξαγωγή της μελέτης σκοπιμότητας είναι απαραίτητο να διερευνηθεί και το νομικό πλαίσιο που διέπει το εκάστοτε προϊόν που είναι επιθυμητό να διατεθεί στην αγορά σε αρχικό πλάνο εγχώρια και σε δευτερεύον πλάνο σε αγορές του εξωτερικού. Το συγκεκριμένο αντιεμπνηκτικό προϊόν της εργασίας αυτής χαρακτηρίζεται ως ιατροτεχνολογικό προϊόν ή “medical device”.

Για να μπορεί μια εταιρεία να διαθέσει ιατροτεχνολογικά προϊόντα τόσο στο εσωτερικό όσο και στο εξωτερικό θα πρέπει να πληροί συγκεκριμένες προδιαγραφές και να ακολουθεί συγκεκριμένη νομοθεσία. Το παρόν διάστημα, όσον αφορά τη νομοθεσία που διέπει αυτά τα προϊόντα, είναι μεταβατικό και μέχρι την ημερομηνία εφαρμογής του νέου κανονισμού (ΕΕ) 2017/745 για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα στις 26 Μαΐου του 2020 θα πρέπει να έχουν ολοκληρωθεί όλες οι απαραίτητες ενέργειες συμμόρφωσης. Θα υπάρχουν βέβαια ορισμένες διατάξεις του κανονισμού που θα τεθούν σε ισχύ νωρίτερα και άλλες αργότερα. Σκοπός της εφαρμογής του νέου κανονισμού είναι η διαμόρφωση ενός ανθεκτικού, διαφανούς και βιώσιμου κανονιστικού πλαισίου, διεθνώς αναγνωρισμένου, που βελτιώνει την κλινική ασφάλεια και δημιουργεί συνθήκες δίκαιης πρόσβασης των κατασκευών στην αγορά. Σε αντίθεση με τις μέχρι τώρα υπάρχουσες και εφαρμοζόμενες οδηγίες, οι κανονισμοί δεν χρειάζεται να μεταφερθούν στο εθνικό δίκαιο με αποτέλεσμα να περιορίζονται οι κίνδυνοι των ασυμφωνιών ως προς την ερμηνεία στην αγορά της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ). Σε γενικές γραμμές παραμένουν ίδιες οι βασικές κανονιστικές απαιτήσεις όμως προστίθενται κάποιες νέες με μεγαλύτερη έμφαση στον κύκλο ζωής του προϊόντος για την ασφάλεια με βάση κλινικά δεδομένα.

2.7.1 Ορισμός ιατροτεχνολογικού προϊόντος

Ως «ιατροτεχνολογικό προϊόν» (Ι/Π) νοείται κάθε όργανο, συσκευή, εξοπλισμός, λογισμικό, εμφύτευμα, αντιδραστήριο, υλικό ή άλλο αντικείμενο το οποίο προορίζεται από τον κατασκευαστή να χρησιμοποιηθεί, μόνο του ή σε συνδυασμό, στον άνθρωπο για έναν ή περισσότερους από τους ακόλουθους συγκεκριμένους ιατρικούς σκοπούς:

- διάγνωση, πρόληψη, παρακολούθηση, πρόβλεψη, πρόγνωση, θεραπεία ή ανακούφιση ασθένειας,

- διάγνωση, παρακολούθηση, θεραπεία, ανακούφιση ή επανόρθωση τραύματος ή αναπηρίας,
- διερεύνηση, αντικατάσταση ή τροποποίηση της ανατομίας ή μιας φυσιολογικής ή παθολογικής λειτουργίας ή κατάστασης,
- παροχή πληροφοριών χάρη σε *in vitro* εξέταση δειγμάτων, προερχόμενων από το ανθρώπινο σώμα, συμπεριλαμβανομένων της αιμοδοσίας και της δωρεάς οργάνων και ιστών,

και του οποίου η κύρια επιδιωκόμενη δράση, εντός ή επί του ανθρώπινου σώματος, δεν επιτυγχάνεται με φαρμακολογικά ή ανοσολογικά μέσα ούτε μέσω του μεταβολισμού αλλά του οποίου η λειτουργία μπορεί να υποβοηθείται από τέτοια μέσα.

Τα ακόλουθα προϊόντα νοούνται επίσης ως ιατροτεχνολογικά προϊόντα:

- τεχνολογικά προϊόντα για τον έλεγχο ή την υποβοήθηση της σύλληψης,
- προϊόντα που προορίζονται ειδικά για τον καθαρισμό, την απολύμανση ή την αποστείρωση των τεχνολογικών προϊόντων που αναφέρονται στο άρθρο ένα, στην παράγραφο τέσσερα και εκείνων που αναφέρονται στο πρώτο εδάφιο του αντίστοιχου σημείου του κανονισμού.

2.7.2 Κατάταξη του αντιερπητικού προϊόντος σε κλάση

Τα τεχνολογικά προϊόντα κατατάσσονται στις κατηγορίες I, IIa, IIb και III, λαμβάνοντας υπόψη την προβλεπόμενη χρήση των τεχνολογικών προϊόντων και τους εγγενείς κινδύνους τους. Η ταξινόμηση πραγματοποιείται σύμφωνα με το παράρτημα VIII του σχετικού κανονισμού. Ανεξάρτητα από την κατηγορία στην οποία κατατάσσεται ένα προϊόν, πρέπει να διασφαλίζεται η καταλληλότητα και η ασφάλειά του όταν χρησιμοποιηθεί υπό τις προβλεπόμενες συνθήκες και για τους επιδιωκόμενους σκοπούς. Η κατάταξη κάθε I/Π στις κλάσεις I, II (IIa και IIb) και III βασίζεται γενικά: 1) στην επικινδυνότητά του, 2) στην προοριζόμενη και προγραμματισμένη χρήση του (intended purpose) και 3) στον μηχανισμό δράσης του (mode of action) (Κανονισμός 2017/745 για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα). Πιο συγκεκριμένα για την κατάταξη του αντιερπητικού προϊόντος η προσοχή θα μπορούσε να εστιαστεί στους εξής κανόνες ταξινόμησης: 3.5, 4, 14 και 21 του παραρτήματος VIII. Η κατάταξη ενός προϊόντος απαιτεί εξειδικευμένη γνώση και η APIVITA θα μπορούσε να αναθέσει την αποσαφήνιση της κλάσης του προϊόντος σε έναν Contract Research Organization (CRO) ώστε να δοθούν οι κατάλληλες κατευθύνσεις.

2.7.3 Υποχρεώσεις κατασκευαστών

Η APIVITA μέχρι στιγμής δεν έχει στην γκάμα των προϊόντων της κάποιο ιατροτεχνολογικό προϊόν και συνεπώς η απόφαση να επενδύσει σε αυτό θα την οδηγούσε σε υιοθέτηση του νέου κανονισμού και συμμόρφωση με τις ισχύουσες απαιτήσεις. Το παραπάνω είναι μια διαδικασία που απαιτεί χρόνο, εξειδικευμένο προσωπικό και οικονομικούς πόρους, καθώς μπορεί ακόμα να υπάρξουν και αλλαγές για αυστηρότερη συμμόρφωση των εγκαταστάσεων και των πρακτικών.

Σύμφωνα με το άρθρο 10, οι κατασκευαστές διαθέτουν συστήματα διαχείρισης κινδύνου (παράγραφος 2) και διαχείρισης της ποιότητας (παράγραφος 9), διενεργούν κλινικές αξιολογήσεις* (παράγραφος 3), καταρτίζουν τεχνικό φάκελο (παράγραφος 4) και εφαρμόζουν διαδικασία εκτίμησης της συμμόρφωσης και τοποθέτησης της σήμανσης συμμόρφωσης CE (παράγραφος 6), τηρούν τις σχετικές με το σύστημα UDI (Unique Device Identification, Σύστημα Αποκλειστικής Ταυτοποίησης Τεχνολογικού Προϊόντος) υποχρεώσεις (παράγραφος 7) και διατηρούν τον τεχνικό φάκελο, τη δήλωση συμμόρφωσης ΕΕ και, κατά περίπτωση, αντίγραφο οποιουδήποτε σχετικού πιστοποιητικού, καθώς και τροποποιητικά και συμπληρωματικά έγγραφα που εκδίδονται σύμφωνα με το άρθρο 56, στη διάθεση των αρμόδιων αρχών για διάστημα τουλάχιστον δέκα ετών από την ημερομηνία που τέθηκε σε κυκλοφορία το τελευταίο τεχνολογικό προϊόν που καλύπτεται από τη δήλωση συμμόρφωσης ΕΕ (παράγραφος 8). Οι κατασκευαστές είναι υπεύθυνοι για τα τεχνολογικά προϊόντα τους και αφού αυτά τεθούν σε κυκλοφορία στην αγορά (παράγραφοι 12, 13, 14). Πρέπει επίσης να εφαρμόζουν συστήματα κάλυψης της οικονομικής ευθύνης τους για κάθε βλάβη που προκλήθηκε από ελαττωματικό τεχνολογικό προϊόν (παράγραφος 16).

Κάθε κατασκευαστής κατονομάζει ένα πρόσωπο αρμόδιο για την κανονιστική συμμόρφωση (άρθρο 15). Αφού εκπληρώσουν όλες αυτές τις υποχρεώσεις, οι κατασκευαστές συντάσσουν δήλωση συμμόρφωσης (άρθρο 19) και εφαρμόζουν σήμανση CE στα προϊόντα τους (άρθρο 20). Περιγράφονται επίσης σαφώς οι υποχρεώσεις των εξουσιοδοτημένων αντιπροσώπων (άρθρο 11), των εισαγωγέων (άρθρο 13) και των διανομέων (άρθρο 14).

Ο κατασκευαστής θα πρέπει να είναι προσεκτικός με την επιλογή του κοινοποιημένου του οργανισμού βάσει του νέου κανονισμού, το κατά πόσο το αντικείμενο του ορισμού του θα καλύπτει όλα τα προϊόντα καθώς και το χρονοδιάγραμμα πιστοποίησης.

*Κλινική αξιολόγηση και απαιτήσεις: είναι σημαντικό να γίνει μια πιο αναλυτική αναφορά σε αυτό το σημείο καθώς αποτελεί μια από τις διαφοροποιήσεις σε σύγκριση με την παλαιότερη οδηγία, οδηγώντας σε αυστηρότερα μέτρα. Ο νέος κανονισμός ενισχύει τις απαιτήσεις κλινικής αξιολόγησης (άρθρο 61), θεσπίζοντας κάποιες από τις μεγαλύτερες αλλαγές σε σύγκριση με το προηγούμενο καθεστώς. Όπως προβλεπόταν και από τις οδηγίες, περιλαμβάνει τη συλλογή κλινικών δεδομένων που είναι ήδη διαθέσιμα στη βιβλιογραφία αλλά και την προετοιμασία των κλινικών ερευνών που τυχόν χρειάζονται. Η έννοια της ισοδυναμίας με άλλα τεχνολογικά προϊόντα για τα οποία ήδη υπάρχουν κλινικά δεδομένα μπορεί και πάλι να χρησιμοποιηθεί, αλλά μόνο σε περιορισμένο αριθμό περιπτώσεων, ενώ οι νέοι κανόνες είναι αυστηρότεροι (άρθρο 61 παράγραφοι 4, 5, 6). Το άρθρο 62 και το παράρτημα XV καθορίζουν τις νέες, ακριβέστερες απαιτήσεις για τις κλινικές έρευνες. Πλην ορισμένων εξαιρέσεων, τα εμφυτεύσιμα και τα κατηγορίας III ιατροτεχνολογικά προϊόντα θα πρέπει πλέον να υποβάλλονται σε κλινική έρευνα.

Για όλα τα τεχνολογικά προϊόντα κατηγορίας III και για τα τεχνολογικά προϊόντα κατηγορίας IIβ που προορίζονται για τη χορήγηση φαρμάκου (ή για την αφαίρεση φαρμάκου από τον οργανισμό), ο κατασκευαστής έχει τη δυνατότητα να ζητά από μια ομάδα Ευρωπαίων εμπειρογνομόνων μια προκαταρκτική αξιολόγηση της σχεδιαζόμενης στρατηγικής κλινικής ανάπτυξης (άρθρο 61 παράγραφος 2) (Κανονισμός 2017/745 για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα).

2.7.4 Δυο σημαντικά νέα χαρακτηριστικά

Πρώτον επιδιώκεται η ιχνηλασιμότητα των τεχνολογικών προϊόντων χάρη στο σύστημα αποκλειστικής ταυτοποίησης τεχνολογικού προϊόντος (σύστημα UDI) που βασίζεται σε διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές με σκοπό να αναβαθμίσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα των μετά τη διάθεση στην αγορά δραστηριοτήτων ή τεχνολογικών προϊόντων σχετικά με την ασφάλεια, χάρη στη βελτίωση της αναφοράς περιστατικών, στα στοχοθετημένα διορθωτικά μέτρα ασφάλειας κατά τη χρήση και στην καλύτερη παρακολούθηση από τις αρμόδιες αρχές. Στοχεύει επίσης στη μείωση των ιατρικών σφαλμάτων και στην καταπολέμηση των παραπονημένων τεχνολογικών προϊόντων, στη βελτίωση των προμηθειών και τη διάθεση των αποβλήτων (παράγραφος 41). Έτσι κάθε ιατροτεχνολογικό προϊόν –και κάθε συσκευασία, κατά περίπτωση– θα φέρει ένα UDI αποτελούμενο από δύο μέρη: αναγνωριστικό τεχνολογικού προϊόντος (Device Identifier) (UDI-DI) ειδικό για το συγκεκριμένο προϊόν, και αναγνωριστικό παραγωγής (Production Identifier) (UDI-PI) που ταυτοποιεί τη μονάδα όπου παρήχθη το προϊόν. Οι κατασκευαστές είναι υπεύθυνοι για την καταχώριση των απαραίτητων δεδομένων στην ευρωπαϊκή βάση δεδομένων (EUDAMED), στην οποία περιλαμβάνεται η βάση δεδομένων UDI. Η βάση δεδομένων χρησιμοποιείται και για την επικαιροποίησή τους.

Δεύτερον επιδιώκεται η δημιουργία ευρωπαϊκής βάσης δεδομένων για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα, EUDAMED, η οποία θα ενσωματώνει διάφορα ηλεκτρονικά συστήματα, για την αντιπαραβολή και επεξεργασία πληροφοριών σχετικά με τα τεχνολογικά προϊόντα στην αγορά και τους οικείους οικονομικούς φορείς, ορισμένες πτυχές της εκτίμησης της συμμόρφωσης, τους κοινοποιημένους οργανισμούς, τα πιστοποιητικά, τις κλινικές έρευνες, την επαγρύπνηση και την εποπτεία της αγοράς. Οι στόχοι της βάσης δεδομένων είναι να ενισχυθεί η συνολική διαφάνεια, μεταξύ άλλων μέσω της καλύτερης πρόσβασης του κοινού και των επαγγελματιών υγείας σε πληροφορίες, να αποφευχθούν οι απαιτήσεις πολλαπλής αναφοράς, να αναβαθμιστεί ο συντονισμός μεταξύ των κρατών μελών, να εξορθολογιστεί και να διευκολυνθεί η ροή πληροφοριών μεταξύ οικονομικών φορέων, κοινοποιημένων οργανισμών ή χορηγών και κρατών μελών, καθώς και μεταξύ των ίδιων των κρατών μελών και μεταξύ αυτών και της Επιτροπής (παράγραφος 44) (Κανονισμός 2017/745 για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα).

2.7.5 Διαδικτυακές πωλήσεις ιατροτεχνολογικών προϊόντων

Το κανάλι διανομής μέσω ίντερνετ είναι εξαιρετικά σημαντικό για την προώθηση των φυσικών προϊόντων όπως έχει ήδη αναλυθεί σε άλλη παράγραφο της εργασίας. Είναι υψίστης σημασίας η δυνατότητα χρησιμοποίησης αυτού του καναλιού για την προώθηση του αντιεμπνητικού ιατροτεχνολογικού προϊόντος. Ο νέος κανονισμός καλύπτει πλήρως τις διαδικτυακές πωλήσεις των ιατροτεχνολογικών προϊόντων και ρυθμίζει τυχόν ασάφειες (Κανονισμός 2017/745 για τα ιατροτεχνολογικά προϊόντα).

