



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



**ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ



ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ποιοτικός χαρακτηρισμός εκχυλισμάτων φύλλων *Vitis vinifera* με
χρωματογραφικές μεθόδους, έρευνα αγοράς για την ανάπτυξη νέου
δερμοκαλλυντικού με εκχύλισμα φύλλων αμπέλου.**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ Ζουμπουλάκης Παναγιώτης,
Αναπληρωτής Καθηγητής**

ΛΕΝΗ ΜΑΡΙΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

A.M.:00062

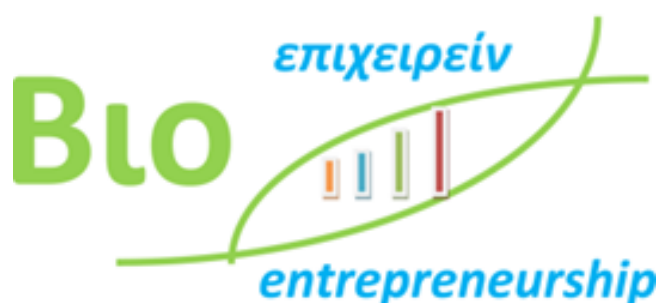
ΑΘΗΝΑ, 2020



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY
NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY



**INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES
IN**



MASTER THESIS

Qualitative characterization of *Vitis vinifera* leaf extracts with chromatographic methods, market research for the development of a new skincare product with vine leaves extract.

SUPERVISOR: ZOUMPOULAKIS PANAGIOTIS
Associate Professor

LENI MARIA EVANGELIA
A.M.: 00062
ATHENS, 2020

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	Αν. Καθηγητής	
Παπαδημητρίου Βασιλική	Ερευνήτρια Β'	
Σκαμνάκη Βασιλική	Επίκουρη καθηγήτρια	

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας κ. Ζουμπουλάκη Παναγιώτη, Αν.Καθηγητή στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής για τη βοήθειά του καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους, την κ. Παπαδημητρίου Βασιλική, Ερευνήτρια Β' του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και την κ. Σκαμνάκη Βασιλική, Επίκουρη Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρία APIVITA S.A. για την ευκαιρία που μου έδωσαν και την φιλοξενία στα εργαστήριά της. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του τμήματος Έρευνας και Ανάπτυξης της APIVITA, Δρ. Κ. Γαρδίκη , αλλά και τα μέλη της ομάδας του Μπόκα Βάνα και Σπανίση Ελένη που υπήρξαν πολύτιμο στήριγμα και καθοδηγητές μου καθόλη τη διάρκεια παραμονής μου στα εργαστήρια της APIVITA. Χωρίς αυτές, η παρούσα διπλωματική δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί.

Δε θα μπορούσα να ξεχάσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου και την άψογη συνεργασία μας. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω την Εύα και το Θοδωρή, που ήταν δίπλα μου από την πρώτη μέρα, την Αγγελική, τη Μαρία, την Εύα, την Ελισάβετ, τη Γεωργία, το Δημήτρη, το Γιάννη, την Κατερίνα και την Ηρώ. Σας ευχαριστώ για την όμορφη ατμόσφαιρα και τη φιλοξενία.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς την οικογένεια, τους φίλους μου και όσους με αγαπούν και τους αγαπώ για την ψυχολογική αλλά και έμπρακτη στήριξη που μου προσφέρουν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ.....	4
ΣΚΟΠΟΣ.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
I. <i>Vitis Vinifera</i>	6
II. Δραστικές ενώσεις, αντιοξειδωτική δράση και χρήση στη βιομηχανία.....	8
III. Εκχύλιση.....	9
Διαβροχή.....	10
Εκχύλιση με υπέρηχους.....	11
IV. Χρωματογραφία.....	12
Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC).....	13
Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	15
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
I. Υλικά.....	18
II. Μέθοδοι.....	18
Ξήρανση και Τεφροποίηση.....	18
Εκχύλιση α΄ ύλης.....	18
Εκχύλιση με απλή διαβροχή (maceration).....	19
Εκχύλιση με υπερήχους (UAE – Ultrasound Assisted Extraction).....	19
HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography).....	20
<i>In vitro</i> Αξιολόγηση.....	20
Ικανότητα δέσμευσης ελεύθερης ρίζας (DPPH•).....	20
Ικανότητα δέσμευσης ελεύθερης ρίζας (ABTS).....	21
Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου - TPC (Folin – Ciocalteu).....	22
Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών - TFC (AlCl ₃).....	23
Μέτρηση pH και Σημείου Διάθλασης (R.I.).....	23
IX. Μικροβιολογική ανάλυση.....	24
X. HPLC.....	26
XI. Πειραματική Πορεία.....	27
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	28
I. Μελέτη πρώτης ύλης.....	28
Lost on Drying, Τέφρα.....	28
HPTLC στα εκχυλίσματα της πρώτης ύλης.....	29

II. Επιλογή τρόπου εκχύλισης	31
III. Εκχύλιση με υπερήχους	32
IV. Αξιολόγηση εκχυλισμάτων με UAE και διαβροχή	34
R.I. και pH.....	35
Μικροβιολογικός έλεγχος.....	35
HPTLC screening.....	37
HPLC screening.....	40
V. <i>In vitro</i> αξιολόγηση εκχυλισμάτων με διαβροχή.....	43
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΓΟΡΑΣ	44
I. Εισαγωγή.....	44
II. Περιγραφή της εταιρείας.....	44
III. Περιγραφή προϊόντος – Ποιο πρόβλημα λύνει.....	45
IV. Η αγορά	46
Αγορά Στόχος - Ιδανικός καταναλωτής.....	47
Κανάλια διανομής και προώθηση	48
V. Ανάλυση ανταγωνισμού	49
Άμεσος ανταγωνισμός	49
Έμμεσος ανταγωνισμός	50
VI. Ανάλυση SWOT.....	51
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καλλιέργεια του *Vitis vinifera* ή αλλιώς της αμπέλου, είναι μία από τις πιο δημοφιλείς καλλιέργειες παγκοσμίως. Το κύριο προϊόν αυτής είναι το σταφύλι το οποίο χρησιμοποιείται σαν καρπός, αποξηραμένο και στην παραγωγή κρασιού. Ωστόσο, μεγάλο ενδιαφέρον παρασουςιάζουν και τα φύλλα της αμπέλου, καθώς αποτελούσαν μέχρι πρότινος παραπροϊόντα και απόβλητα της παραγωγής. Η περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικές ουσίες τα καθιστά ιδανική πρώτη ύλη για τη δημιουργία καλλυντικών με αντιγηραντικές και όχι μόνο ιδιότητες. Στην παρούσα εργασία, τα φύλλα *Vitis vinifera* εκχυλίστηκαν με τη βοήθεια υπερήχων (Ultrasound Assisted Extraction - UAE) και με διαβροχή. Αρχικά, για να αποφασιστεί ποιος είναι ο ιδανικός τρόπος εκχύλισης για τη συγκεκριμένη πρώτη ύλη, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα τυχαία δείγματα φύλλων, τα οποία εκχυλίστηκαν με υπερήχους (με 6 συνδιασμούς θερμοκρασίας και χρόνου εκχύλισης) και με διαβροχή, με τη χρήση δύο διαφορετικών μειγμάτων διαλυτών. Τα εν λόγω εκχυλίσματα ελέγχθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τη μέθοδο DPPH. Αποφασίστηκε ότι η ιδανική μέθοδος ήταν η UAE εκχύλιση στους 25°C για 30min η οποία και ακολουθήθηκε για την εκχύλιση όλων των δειγμάτων. Ακολούθησαν *in vitro* τεστ με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu για τη μέτρηση των ολικών φαινολικών, τη μέθοδο $AlCl_3$ για τη μέτρηση των φλαβονοειδών και τη μέθοδο ABTS επίσης για την αντιοξειδωτική ικανότητα, για επιπλέον χαρακτηρισμό των εκχυλισμάτων. Τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ενθαρρυντικά, γι' αυτό αποφασίστηκε να παρασκευαστούν και εκχυλίσματα με διαβροχή (τα οποία έδειξαν επίσης αναστολή του DPPH) και να συγκριθούν με αυτά από UAE. Σε όλα τα εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε screening με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης και με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης, καθώς και μικροβιολογικός έλεγχος και μέτρηση του pH και του δείκτη διάθλασης. Τα αποτελέσματα έδειξαν υπεροχή των εκχυλισμάτων με διαβροχή, η οποία επιβεβαιώθηκε και με τη μέθοδο ABTS. Τα εκχυλίσματα φύλλων *Vitis vinifera* μπορούν να αξιοποιηθούν από την APIVITA για τη δημιουργία ενός καθαριστικού προσώπου με αντιοξειδωτική και άρα αντιγηραντική δράση. Τόσο η μελέτη του ανταγωνισμού, όσο και οι ανάγκες των καταναλωτών επιβεβαιώνουν ότι υπάρχει χώρος στην αγορά για αυτό το νέο προϊόν.

ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ

Vitis vinifera, φύλλα, εκχύλισμα, χρωματογραφία, αντιοξειδωτικά, αντιγήρανση

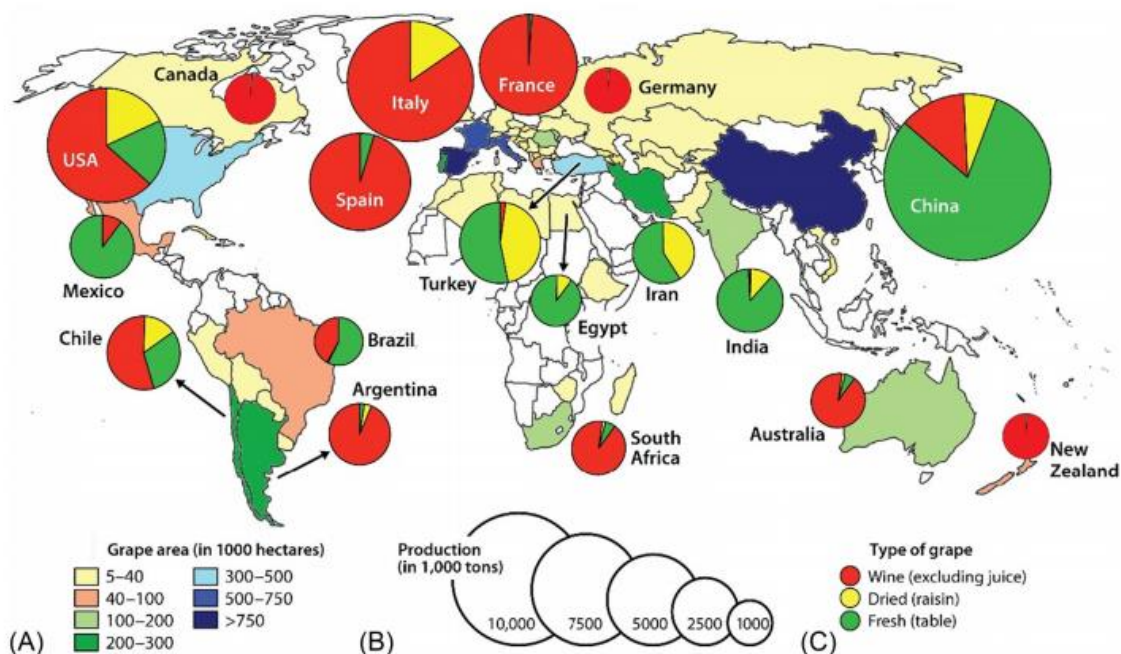
ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παραγωγή εκχυλισμάτων από φύλλα *Vitis vinifera* με δύο διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης (UAE και διαβροχή), υπό διαφορετικές συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας και η επιλογή του καταλληλότερου τρόπου παραλαβής των αντιοξειδωτικών ουσιών τους. Επιπλέον, ο γρήγορος χαρακτηρισμός των εκχυλισμάτων μέσω χρωματογραφικού “screening”. Τέλος, τη συγκεκριμένη διπλωματική πλαισιώνει και μια σύντομη προκαταρκτική μελέτη της αγοράς με σκοπό την κυκλοφορία ενός νέου καλλυντικού προϊόντος βασισμένου στις αντιοξειδωτικές και παράλληλα αντιγηραντικές ιδιότητες αυτών των εκχυλισμάτων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. *Vitis Vinifera*

Η καλλιέργεια σταφυλιών είναι μία από τις πιο δημοφιλείς καλλιέργειες φρούτων στον κόσμο, με 77.44 εκατομμύρια τόνους παραγωγής το 2016 και 71 εκατομμύρια στρέμματα έκταση για την καλλιέργειά τους. Η Κίνα, η Ιταλία και οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής πρωτοστατούν στην καλλιέργεια της αμπέλου, με την Πολιτεία της Καλιφόρνια να είναι ο κύριος παραγωγός για τις Ηνωμένες Πολιτείες (87% της συνολικής παραγωγής των ΗΠΑ) (FAO, 2016). Παγκοσμίως είναι διαθέσιμες περίπου δέκα χιλιάδες ποικιλίες αμπέλου και από αυτές κάποιες φύονται σε πολλές διαφορετικές χώρες με αποτέλεσμα να αποκαλούνται παγκόσμιες ποικιλίες. Ένα πολύ γνωστό παράδειγμα είναι η ποικιλία Cabernet Sauvignon που καταλαμβάνει περισσότερο από το 5% της παγκόσμιας έκτασης που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια της αμπέλου (ΟΙΒ, 2017). Οι ποικιλίες χωρίζονται σε αυτές που δίνουν σταφύλια για βρώση, για ξήρανση και τέλος για την παραγωγή κρασιού (*Vitis vinifera*). Χώρες όπως η Κίνα, η Ινδία και η Τουρκία επικεντρώνονται στην παραγωγή των δύο πρώτων τύπων αμπέλου, ενώ άλλες όπως η Ιταλία, η Γαλλία, η Ισπανία και η Αργεντινή στην παραγωγή κρασιού.



Εικόνα 1: Καλλιέργεια αμπέλου παγκοσμίως. Στην εικόνα φαίνονται: (Α) η έκταση που χρησιμοποιείται σε εκτάρια (Β) η παραγωγή καρπού σε κάθε μία από τις 18 πιο παραγωγικές χώρες και (C) το ποσοστό παραγόμενων προϊόντων αμπέλου (κρασί, σταφίδα και φρέσκος καρπός) σε κάθε μία από τις 18 πιο παραγωγικές χώρες (Daane et al., 2018).

Οι οινοπαραγωγικές ποικιλίες φύονται ιδανικά σε μία στενή λωρίδα μεταξύ 30 και 50 βαθμών γεωγραφικό πλάτος στο βόρειο και νότιο ημισφαίριο. Ακολουθεί πίνακας με τις διασημότερες ποικιλίες *Vitis vinifera* και τις χώρες που τις καλλιεργούν. Για την καλλιέργεια της αμπέλου υπάρχουν κάποιες παράμετροι που πρέπει να ελέγχονται, όπως η θερμοκρασία, τα επίπεδα υγρασίας, καθώς και τα επίπεδα του pH της αλατότητας και των θρεπτικών στοιχείων του εδάφους (Venkitasamy et al. 2019).

Πίνακας 1: Γεωγραφική κατανομή επιλεγμένων ποικιλιών *Vitis vinifera* το 2015. (ΟΙΒ, 2017)

Ποικιλία	Χρώμα	Έκταση καλλιέργειας (ha)	Χώρες καλλιέργειας
Cabernet Sauvignon	Μαύρο	341.000	Κίνα, Γαλλία, Χιλή, ΗΠΑ, Αυστραλία, Ισπανία, Αργεντινή, Ιταλία και Νότια Αφρική
Sultanina	Λευκό	273.000	Τουρκία, Ιράν, Ιράκ, Αφγανιστάν, Πακιστάν, Ουζμπεκιστάν, Τουρκμενιστάν, Τατζικιστάν, ΗΠΑ και Νότια Αφρική
Merlot	Μαύρο	266.000	37 χώρες παγκοσμίως
Temprnillo	Μαύρο	231.000	17 διαφορετικές χώρες, αλλά το 88% της έκτασης είναι στην Ισπανία
Airen	Λευκό	218.000	Ισπανία
Chardonnay	Λευκό	210.000	Χώρες της Ευρώπης, Αμερικής και Ωκεανίας
Syrah	Μαύρο	190.000	Γαλλία, Αυστραλία, Αργεντινή, Νότια Αφρική, ΗΠΑ και Χιλή
Red Globe	Μαύρο	159.000	Κίνα (το 91% της συνολικής έκτασης), ΗΠΑ, Ισπανία, Πορτογαλία, Ιταλία, Τουρκία, Χιλή, Αργεντινή και Νότια Αφρική
Garnacha Tinta/ Grenache Noir	Μαύρο	163.000	Ισπανία και Γαλλία
Sauvignon Blanc	Λευκό	123.000	Όλες οι σημαντικές οινοπαραγωγικές χώρες
Pinot Noir / Blauer Burgunder	Μαύρο	112.000	Γαλλία, Γερμανία, Ιταλία, Ελβετία, Ρουμανία, Ουγγαρία, Ισπανία, ΗΠΑ, Νέα Ζηλανδία, Αυστραλία, Χιλή, Αργεντινή και Νότια Αφρική
Trebbiano Toscano / Ugni Blanc	Λευκό	111.000	Ιταλία, Γαλλία και Πορτογαλία

Τα κοτσάνια, τα κουκούτσια, τα κλαδιά αλλά και τα φύλλα της αμπέλου-στα τελευταία επικεντρώνεται η παρούσα εργασία- είναι παραπροϊόντα της επεξεργασίας του φυτού και κατά συνέπεια συνήθως αποτελούν απορρίματα. Αν αναλογιστούμε το ποσοστό των καρπών, σε σχέση με τα υπόλοιπα τμήματα του φυτού, που μένουν αναξιοποίητα καταλαβαίνουμε το μέγεθος του πιθανού κέρδους των οινοπαραγωγών και καλλιεργητών, εάν αποφάσιζαν να τα διαθέσουν σε εταιρίες οι οποίες θα μπορούσαν να τα αξιοποιήσουν. Ακόμη, η Ευρωπαϊκή Ένωση προσπαθεί να εξαλείψει την καύση ή τη μη σωστή απόρριψη των παραπροϊόντων της καλλιέργειας και

επεξεργασίας της αμπέλου, παροτρύνοντας τους παραγωγούς να αξιοποιούν τα απόβλητα, έχοντας θεσπίσει και την ανάλογη νομοθεσία (Αλβανός, 2013). Συμπερασματικά, η χρήση φύλλων αμπέλου στην κοσμετολογία και την φαρμακευτική έχει περιβαλλοντικά και οικονομικά οφέλη και αποτελεί πλέον μονόδρομο.

II. Δραστικές ενώσεις, αντιοξειδωτική δράση και χρήση στη βιομηχανία

Τα οφέλη της αμπέλου είναι γνωστά από την αρχαιότητα, ενώ μέχρι σήμερα το εκχύλισμα, το συμπύκνωμα ή η σκόνη σταφυλιού χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων, καλλυντικών κ.α. (Beres et al., 2017). Ο πολτός του σταφυλιού χρησιμοποιείται σαν συντηρητικό λόγω της αντιβακτηριακής (Katalinić et al., 2010), αλλά και αντιοξειδωτικής του δράσης, αφού προστατεύει τα λιπίδια κρεάτων και ψαριών από την οξείδωση (Guerra-Rivas et al., 2016). Λόγω της δράσης του ως αντιοξειδωτικό έχει ενσωματωθεί σε βρώσιμες μεμβράνες χιτοζάνης, επεκτείνοντας τη διάρκεια ζωής τροφίμων. Επίσης, στη βιομηχανία τροφίμων, ο πολτός σταφυλιού χρησιμοποιείται και ως ενισχυτικό γεύσης και χρώματος σε ροφήματα, (Rózek et al., 2010) αλλά και για να μειώσει το σχηματισμό ακρυλαμιδίου λόγω της αντίδρασης Maillard στην αφυδάτωση της πατάτας (Zhu et al., 2015).

Όσον αφορά τη βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών, ο πολτός σταφυλιού αξιοποιείται λόγω της αντικαρκινικής (Kaur et al., 2009) και της αντιγηραντικής του δράσης (Wittenauer et al., 2015), καθώς και της ιδιότητάς του να χαμηλώνει τα επίπεδα της χοληστερόλης (Ferri et al., 2016). Ολόκληρες εταιρίες έχουν δομηθεί γύρω από το σταφύλι (π.χ. Caudalie), ή έχουν αφιερώσει σειρές καλλυντικών σε αυτό (π.χ. σειρά Wine Elixir της Arivita) και τις ευεργετικές του, κύρια αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Οι σπόροι σταφυλιών είναι υποπροϊόντα της αμπέλου που διαχωρίζονται κατά τη βιομηχανική παραγωγή χυμού σταφυλιών και κρασιού. Είναι μια ισχυρή πηγή πολυφαινόλων συμπεριλαμβανομένων και των προανθοκυανιδινών (σε ποσοστό έως και 25%), οι οποίες βρίσκονται επίσης στα αμύγδαλα, τα κάσιους, τα φουντούκια, τα πεκάν, τα φυστίκια και τα καρύδια. Οι προανθοκυανιδίνες είναι πολυφαινόλες που αποτελούνται από μονομερή και διμερή βιοφλαβονοειδών, με αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα λόγω μικρότερου μεγέθους μορίων και αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά. Πειραματικά δεδομένα *in vitro* και *in vivo* αποδεικνύουν ότι οι προανθοκυανιδίνες παρουσιάζουν χημειοπροστατευτικές ιδιότητες έναντι των ελεύθερων ριζών και του οξειδωτικού στρες, έχουν αντιφλεγμονώδη δράση και αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι πιθανές αντικαρκινικές δράσεις περιλαμβάνουν αναστολή πολλαπλασιασμού κυττάρων, επαγωγή απόπτωσης και διακοπή κυτταρικού κύκλου σε καρκινικά κύτταρα. Το εκχύλισμα σπόρων σταφυλιών

συνιστάται επίσης λόγω της ικανότητάς του να περιορίζει την απορρόφηση λίπους που προέρχεται από τη διατροφή και άρα τη συσσώρευση λίπους στο λιπώδη ιστό. Θεωρείται επίσης ότι συμβάλλει στη βελτίωση και διατήρηση της ελαστικότητας του δέρματος με τη σταθεροποίηση του κολλαγόνου και της ελαστίνης (Buchwald-Werner et al., 2009) (Hernández-Ledesma et al., 2011).

Ορισμένες από τις δραστικές ουσίες που έχουν ήδη απομονωθεί από φύλλα αμπέλου και ευθύνονται για την ευεργετική τους δράση είναι η βινιφερίνη, η ρεσβερατρόλη, η κατεχίνη, η επικατεχίνη, το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ και η κερκετίνη (Mattivi et al., 2011) (Katalinić et al., 2009) (Vergara et al., 2012).

III. Εκχύλιση

Με τον όρο εκχύλιση αναφερόμαστε στη μεταφορά ένωσης ή ενώσεων από ένα στερεό ή υγρό, σε διαφορετικό διαλύτη ή φάση. Για να απομονωθούν όλα τα συστατικά με υψηλή βιοδραστικότητα του *Vitis vinifera*, αλλά και οποιουδήποτε άλλου φυτικού ιστού, είναι απαραίτητη η εκχύλισή τους. Η εκχύλιση φυτών πρόκειται για εκχύλιση στερεού/υγρού, καθώς ένα στερεό (φυτικός ιστός) έρχεται σε επαφή με ένα υγρό (το διαλύτη). Τα συστατικά του φυτού μεταφέρονται στην υγρή φάση ανάλογα με την πολικότητά τους και την πολικότητα του διαλύτη, από όπου και παραλαμβάνονται. Το τελικό διάλυμα, συνήθως μετά από διήθησή του, είναι το εκχύλισμα.

Η διαδικασία της εκχύλισης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν και το τελικό αποτέλεσμα. Παρακάτω παρουσιάζονται κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες:

Η επιλογή του διαλύτη. Η εκλεκτικότητα, το κόστος, η ασφάλεια, καθώς και η διαλυτότητα του προς εκχύλιση ιστού πρέπει να ληφθούν υπόψιν κατά την επιλογή του διαλύτη. Τα φυτικά αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις οι οποίες διαφέρουν σε πολικότητα, με τις περισσότερες να είναι μετρίως διαλύτες στο νερό. Κάποιο φυτικό λάδι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση μόνο λιπόφιλων συστατικών, ενώ το νερό χρησιμοποιείται για την παραλαβή μόνο υδρόφιλων συστατικών. Ως εκ τούτου, η χρήση οργανικών διαλυτών πολλές φορές θεωρείται απαραίτητη. Συνήθως υδατικά διαλύματα αιθανόλης, μεθανόλης και ακετόνης χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση πολικών αντιοξειδωτικών μορίων, ενώ για λιγότερο πολικά, συνιστάται η χρήση οξικού αιθυλεστέρα ή εξανίου. Τα υδατικά μείγματα είναι συχνά προτιμότερα σε σχέση με τους καθαρούς οργανικούς διαλύτες, εξαιτίας της ικανότητάς τους να ενυδατώνουν τη μήτρα του υλικού και να διευκολύνουν την εκχύλιση (Pérez-Jiménez et al., 2008). Γι' αυτούς τους λόγους, υδατικά διαλύματα αιθανόλης και μεθανόλης αποτελούν τους κύριους διαλύτες σε εκχυλίσεις με σκοπό τον προσδιορισμό του φυτοχημικού προφίλ.

Το μέγεθος του προς εκχύλιση ιστού. Ο ιστός πρέπει να είναι τεμαχισμένος σε τόσο μικρά κομμάτια ώστε να αυξάνεται η επιφάνεια αλληλεπίδρασης με τον διαλύτη, αλλά να είναι εφικτή και η απομάκρυνσή τους με διήθηση, όταν τελειώσει η διαδικασία.

Η θερμοκρασία. Συνήθως οι υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν τη διαλυτότητα. Στην περίπτωση εκχύλισης φυτικού ιστού ωστόσο, πολύ υψηλή θερμοκρασία έχει ως αποτέλεσμα την εκχύλιση ανεπιθύμητων ουσιών ή/και την καταστροφή θερμοευαίσθητων συστατικών του εκχυλίσματος.

Η διάρκεια της εκχύλισης. Τυπικά, μεγαλύτερος χρόνος παραμονής του ιστού στο διαλύτη, σημαίνει και αποτελεσματικότερη εκχύλιση, ωστόσο μετά από κάποιο χρονικό διάστημα το σύστημα φτάνει σε ισορροπία.

Η αναλογία διαλύτη-στερεού. Όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία, τόσο πιο επιτυχημένη και η εκχύλιση. Παρόλα αυτά, ένα πολύ αραιό εκχύλισμα θα χρειαστεί κατά πάσα πιθανότητα συμπύκνωση.

Οι τεχνικές εκχύλισης χωρίζονται στις συμβατικές (διαβροχή, διύλιση και εκχύλιση με αναρροή) και τις μη συμβατικές (εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων ή μικροκυμάτων, εκχύλιση υποβοηθούμενη από πίεση και εκχύλιση με τη χρήση υπερκρίσιμων υγρών). Οι πρώτες χαρακτηρίζονται συνήθως από μεγάλο χρόνο εκχύλισης και όγκο διαλύτη, καθώς και τη χρήση οργανικών διαλυτών, ενώ οι δεύτερες από τη χρήση «πράσινων» διαλυτών και πιο αποτελεσματικής εκχύλισης σε μικρότερο χρόνο (Qing-Wen et al., 2018). Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε μία συμβατική μέθοδος, η απλή διαβροχή, αλλά και μία μέθοδος εκχύλισης υψηλής ενέργειας, η εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων (UAE).

Διαβροχή

Η εκχύλιση στερεού-υγρού με διαβροχή είναι η πλέον συμβατική μέθοδος εκχύλισης, κυρίως για την ανάκτηση βιοενεργών συστατικών από τροφίμα και φυτά. Ο διαλύτης αναμιγνύεται με το στερεό δείγμα το οποίο διαποτίζεται ή ομογενοποιείται και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου, εντός κλειστού περιέκτη. Το στερεό υλικό μπορεί να είναι φρέσκο ή αποξηραμένο, ανάλογα με τις απαιτήσεις για το τελικό εκχύλισμα, αλλά σίγουρα πρέπει να είναι τεμαχισμένο, ώστε να αυξάνεται η επιφάνεια αλληλεπίδρασης με το διαλύτη. Οι επιθυμητές ουσίες απομακρύνονται από τη στερεά πρώτη ύλη μέσω της διάχυσης και όσμωσης που δημιουργείται από την παρατεταμένη επαφή με το διαλύτη. Ο περιέκτης θα πρέπει να ανακινείται κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, ώστε να επιτραπεί η συνεχής διάχυση των ουσιών στόχων και να αποφευχθεί το φαινόμενο του υπερκορεσμού κοντά στην επιφάνεια του στερεού και η επιβράδυνση της διαδικασίας (Naviglio et al., 2007).

Παρότι αποτελεί μία χρονοβόρα διαδικασία σε σύγκριση με άλλες μεθόδους και απαιτεί μεγαλύτερη ποσότητα διαλυτών και άρα σημαντικές ενέργειες για την ανακύκλωση και επαναχρησιμοποίησή τους, ιδιαίτερα στην περίπτωση οργανικών διαλυτών, είναι και μία εύκολη μέθοδος που δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και προσωπικό με ιδιαίτερη εκπαίδευση. Ταυτόχρονα είναι και η λιγότερο παρεμβατική μέθοδος.

Γενικά, η αιθανόλη είναι ο πλέον χρησιμοποιούμενος διαλύτης, επειδή είναι σε θέση να εξαγάγει το μεγαλύτερο μέρος των δραστικών συστατικών που περιέχονται στο φυτό, συμπεριλαμβανομένων μορίων που είναι υδρόφιλα, υδατοδιαλυτά ή λιπόφιλα και συνεπώς, διαλυτά στο λάδι ή άλλους οργανικούς διαλύτες.

Εκχύλιση με υπέρηχους

Οι υπέρηχοι είναι ακουστικά κύματα 20 kHz-100 MHz, εκτός του ανθρώπινου ακουστικού φάσματος. Η χρήση υπερήχων καθιστά δυνατή την εκχύλιση σε μικρό χρονικό διάστημα, λόγω του φαινομένου της σπηλαιώσης. Με βάση αυτό, το κύμα πίεσης που προκαλείται από τους υπερήχους μεταδίδεται στο υγρό μέσο, με αποτέλεσμα την πρόκληση ταλάντωσης των μορίων. Μέσω των εκκενώσεων και συμπίεσεων δημιουργούνται φυσαλίδες κενού, οι οποίες φτάνοντας σε ένα κρίσιμο μέγεθος εκρήγνυνται, απελευθερώνοντας ενέργεια με τη μορφή πίεσης και θερμότητας. Σημαντικές μεταβλητές που επηρεάζουν τη διαδικασία εκχύλισης στερεού-υγρού με υπερήχους είναι ο χρόνος, το μέγεθος σωματιδίων του υποστρώματος και η συγκέντρωση στερεού στο υγρό (Bendicho et al., 2000).

Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου εκχύλισης υψηλής ενέργειας συγκαταλέγονται τα εξής:

- ✓ μικρός χρόνος εκχύλισης
- ✓ απλή οργανολογία και πειραματική διαδικασία
- ✓ σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες που δεν καταστρέφουν τις προς παραλαβή ουσίες
- ✓ διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών λόγω υπερήχων και παραλαβή μεγαλύτερου ποσοστού ουσιών στην περίπτωση ιστών (Mason et al., 1996)

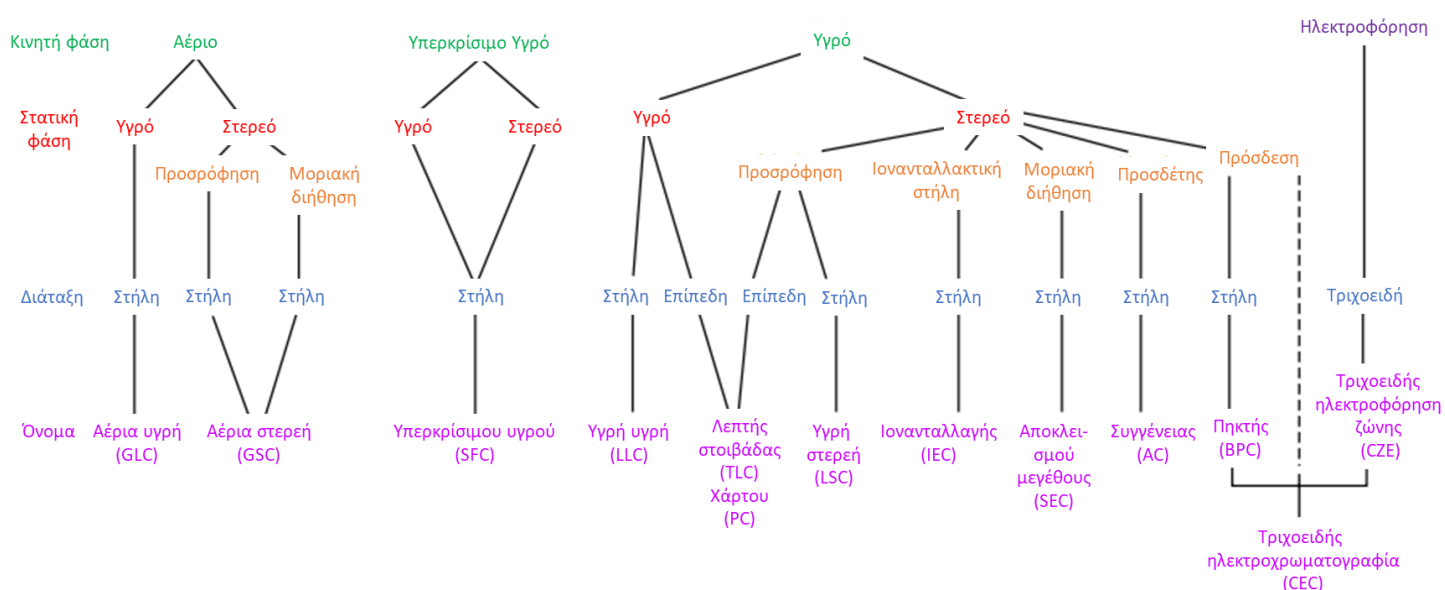
IV. Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία είναι μια μέθοδος διαχωρισμού κατά την οποία τα συστατικά ενός δείγματος διαχωρίζονται με τη βοήθεια δύο φάσεων: η μία φάση είναι ένα σταθερό στρώμα με μεγάλη επιφάνεια (στατική φάση) και η άλλη είναι ένα αέριο ή υγρό το οποίο διαπερνά τη σταθερή φάση (κινητή φάση). Το δείγμα περνάει από τη στατική φάση και ανάλογα με τη συγγένεια ή μη προς αυτή, προσκολλάται ή εκλούεται αντίστοιχα (Miller, 2009). Ανάλογα με τη φύση (πολικότητα, αλατότητα κλπ.) της κινητής φάσης, καθώς και τη συγγένειά της με τη στατική, μπορούμε να πάρουμε κλάσματα που περιέχουν διαφορετικές ουσίες ενός πιο πολύπλοκου διαλύματος. Ορισμένες χρωματογραφικές μέθοδοι είναι αποκλειστικά ποιοτικές, ενώ κάποιες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για ποσοτικό προσδιορισμό των διαχωρισμένων ουσιών.

Υπάρχουν πάρα πολλά είδη χρωματογραφίας, τα οποία ταξινομούνται:

A) ανάλογα με το είδος των στατικών και κινητών φάσεων (π.χ. χρωματογραφία στήλης, επίπεδη χρωματογραφία, κλπ.)

B) σύμφωνα με τη φυσική κατάσταση της κινητής φάσης. Έτσι, εάν η κινητή φάση είναι αέριο, η τεχνική ονομάζεται αέρια χρωματογραφία (GC), και αν είναι υγρό, ονομάζεται υγρή χρωματογραφία (LC). Μια υποκατηγοριοποίηση μπορεί να γίνει σύμφωνα με την κατάσταση της στατικής φάσης. Εάν λοιπόν η τελευταία είναι στερεή, ενώ η κινητή φάση αέριο, μιλάμε για μία αέρια - στερεά χρωματογραφία (GSC) (Miller et al., 2009).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της κατηγοριοποίησης διαφορετικών μεθόδων χρωματογραφίας.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC) και η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), οι οποίες θα αναλυθούν στη συνέχεια. Στον παρακάτω πίνακα γίνεται συνοπτική σύγκριση των δύο μεθόδων.

Πίνακας 2: Σύγκριση των μεθόδων χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC) και υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

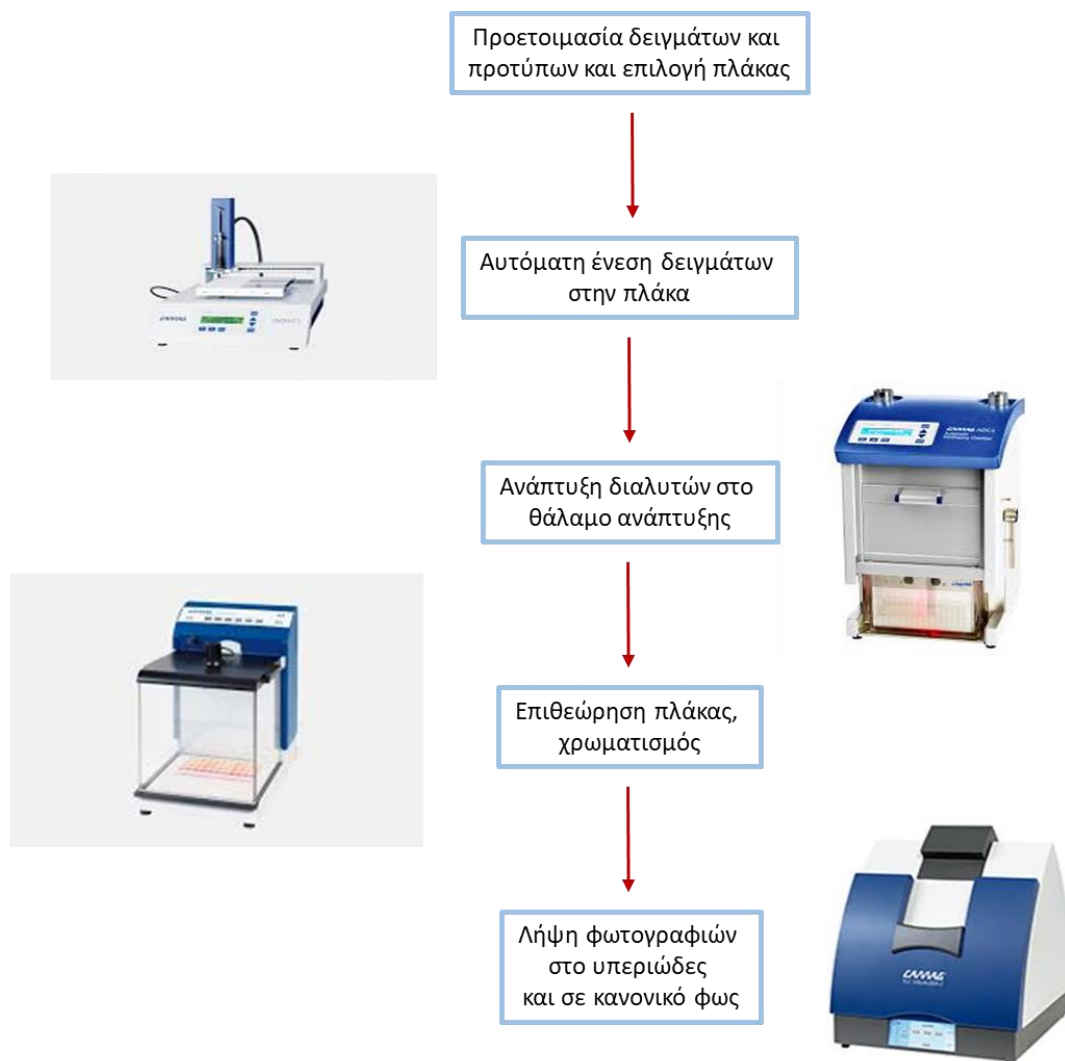
Κριτήριο	HPTLC	HPLC
Κόστος εργαστηρικού εξοπλισμού	Υψηλό	Υψηλό
Κατανάλωση διαλύτη	Χαμηλή	Υψηλή
Ευελιξία σε σχέση με ποικιλία αναλυόμενων ουσιών, συμβατότητα με pH και διαλύτες	Μεγάλη	Περιορισμένη
Ικανότητα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλών δειγμάτων	Ναι	Όχι
Δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού	Ημιποσοτική Μέθοδος	Ποσοτική μέθοδος
Ευαισθησία	Κατά κανόνα χαμηλότερη	Κατά κανόνα υψηλότερη
Επαναληψιμότητα	Χαμηλότερη	Υψηλότερη
Διαχωριστική ικανότητα	Χαμηλή	Υψηλή

Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC)

Η Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Thin Layer Chromatography - HPTLC) είναι μια εκλεπτυσμένη και αυτοματοποιημένη μορφή της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) με καλύτερο διαχωρισμό και όρια ανίχνευσης. Είναι επίσης γνωστή ως χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής πίεσης/επίπεδη χρωματογραφία ή χρωματογραφία επίπεδης κλίνης. Το δείγμα εφαρμόζεται στην πλάκα της συμβατικής TLC με το χέρι, ενώ στην περίπτωση της HPTLC επιτυγχάνεται αυτοματισμός στην τοποθέτηση του δείγματος, ώστε να ξεπεραστεί η αβεβαιότητα ως προς το μέγεθος και τη θέση σταγονιδίων. Ανάλογα με τη φύση των προσροφητικών στις πλάκες, καθώς και των διαλυτών που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξή τους, προκύπτει προσρόφηση ή διαχωρισμός ή και τα δύο φαινόμενα. Έτσι διαχωρίζονται και ταυτοποιούνται τα συστατικά ενός δείγματος και είναι δυνατή και η ποσοτικοποίησή τους ως ένα βαθμό. Η μέθοδος της HPTLC βρίσκει εφαρμογές μεταξύ άλλων στη φυτοχημική ανάλυση, τη βιοϊατρική, τον ποσοτικό προσδιορισμό φυτικών φαρμάκων, την αναλυτική χημεία, την ανάλυση δακτυλικών αποτυπωμάτων κ.α. (Bandameedi et al., 2018).

Στην TLC, η στατική φάση συνηθέστερα αποτελείται από μία λεπτή στιβάδα πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) με επιφανειακές υδροξυλομάδες που της προσδίδουν πολικό χαρακτήρα, η οποία επικαλύπτει ένα στερεό επίπεδο υλικό, όπως πλάκα γυαλιού ή φύλλο αλουμινίου. Στην HPTLC της παρούσας εργασίας χρησιμοποιούνται πλάκες με καλύτερη επίστρωση, το στερεό υλικό είναι γυάλινο και έχουν υψηλή απόδοση. Τα προς εξέταση δείγματα και οι πιθανοί μάρτυρες ταυτοποίησης ουσιών εφαρμόζονται ως κηλίδες στο κατώτερο άκρο της πλάκας. Η πλάκα στη συνέχεια τοποθετείται σε θάλαμο ανάπτυξης, στον πυθμένα του οποίου βρίσκεται το σύστημα των διαλυτών της κινητής φάσης, ενώ ο υπερκείμενος χώρος είναι κορεσμένος σε ατμούς των διαλυτών. Όταν το μέτωπο του διαλύτη φθάσει στο άνω άκρο της πλάκας (λόγω τριχοειδών φαινομένων) η διαδικασία της ανάπτυξης σταματάει.

Όταν η στατική φάση είναι πολική, αλληλεπιδρά ισχυρότερα με πολικές ενώσεις. Έτσι, οι ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα, μετακινούνται στην πλάκα με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητά τους, με τις λιγότερο πολικές ουσίες να κατανέμονται γρηγορότερα στην λιγότερο πολική κινητή φάση και να προπορεύονται. Αντιστοίχως για μη πολικές στατικές φάσεις. Με τον τρόπο αυτό τα συστατικά ενός μείγματος διαχωρίζονται και σχηματίζουν αυτόνομες κηλίδες επάνω στην πλάκα. Η ταυτοποίηση των κηλίδων γίνεται με τη βοήθεια μαρτύρων και η απεικόνισή τους είτε στο υπεριώδες φως, είτε μετά από ψεκασμό με ειδικά αντιδραστήρια. Τα τελευταία αντιδρούν με την προς ανίχνευση ουσία και δίνουν έγχρωμο προϊόν. Συχνά απαιτείται και θέρμανση της πλάκας για την επιτάχυνση της αντίδρασης ανίχνευσης (Καρκαλούσος et al., 2015).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας για την πραγματοποίηση HPTLC.

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) είναι ουσιαστικά μία εξαιρετικά βελτιωμένη μορφή χρωματογραφίας στήλης. Η κινητή φάση διέρχεται μέσα από τη στήλη, όχι λόγω βαρύτητας, όπως στην περίπτωση της συμβατικής χρωματογραφίας, αλλά λόγω υψηλής πίεσης που της ασκείται (έως 400 atm). Αυτό καθιστά τη διαδικασία ταχύτερη και επιτρέπει το «πακετάρισμα» της στήλης να είναι πολύ πυκνότερο, με μικρότερα μόρια πληρωτικού υλικού και άρα μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής με τα διερχόμενα μόρια και τελικά μεγάλη εκλεκτικότητα και ακρίβεια μεθόδου. Μαζί με όλα αυτά τα πλεονεκτήματα υπάρχει και η δυνατότητα αυτοματοποίησης.

Ανάλογα με τη σχετική πολικότητα διαλύτη (κινητής φάσης) και στατικής φάσης η HPLC διακρίνεται σε κανονικής και αντίστροφης φάσης.

HPLC κανονικής φάσης. Η στήλη πληρώνεται με μικροσκοπικά σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου (silica) και ο διαλύτης είναι μη πολική ουσία όπως το εξάνιο. Μια τυπική στήλη έχει εσωτερική διάμετρο 4,6 mm και μήκος 150 έως 250 mm. Οι πολικές ενώσεις στο διάλυμα που διέρχεται από τη στήλη θα προσκολληθούν περισσότερο στην πολική silica από ότι οι μη πολικές ενώσεις. Επομένως, οι τελευταίες θα περάσουν πιο γρήγορα από τη στήλη.

HPLC αντίστροφης φάσης. Σε αυτήν την περίπτωση, το μέγεθος της στήλης είναι το ίδιο, αλλά το διοξείδιο του πυριτίου τροποποιείται με τη σύνδεση μακρών αλυσίδων υδρογονανθράκων στην επιφάνειά του (συνήθως με 8 ή 18 άτομα άνθρακα). Αυτό καθιστά τη στατική φάση μη πολική. Αυτή τη φορά χρησιμοποιείται ένας πολικός διαλύτης, όπως για παράδειγμα ένα μείγμα νερού και μιας αλκοόλης όπως η μεθανόλη. Σε αυτήν την περίπτωση, θα υπάρχει μια ισχυρή έλξη (δυνάμεις Van der Waals) μεταξύ του πολικού διαλύτη και των πολικών μορίων στο δείγμα που διέρχεται από τη στήλη, ενώ παράλληλα τα πολικά μόρια δε θα αλληλεπιδράσουν με τις αλυσίδες υδρογονανθράκων της silica και θα εκλουστούν πρώτα. Η HPLC αντίστροφης φάσης είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μορφή HPLC (Uwe et al., 1997).



Εικόνα 4: Απεικόνιση μίας τυπικής διάταξης HPLC.

Λόγω της ευαισθησίας και ακρίβειας της μεθόδου, η HPLC χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών για την ανίχνευση προσμίξεων στα προϊόντα και πρόσθετων σε τρόφιμα, για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση συστατικών σε σύνθετα βιολογικά δείγματα, για το

διαχωρισμό ουσιών περιβαλλοντικής σημασίας, το διαχωρισμό εναντιομερών, ακόμη και για τον καθαρισμό νερού (Cabrera, 2004).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

I. Υλικά

Το φυτικό υπόστρωμα που εξετάστηκε ήταν αποξηραμένα φύλλα *Vitis vinifera* από διαφορετικούς έλληνες παραγωγούς. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: μεθανόλη (HPLC grade, Fisher Chemical, Loughborough, UK), αιθανόλη (Fisher Chemical, Loughborough, UK), γλυκερίνη (Organic Glycerin, Laboratoires Prod'Hyg), οξικό οξύ (HPLC grade, Fisher Chemical, Loughborough, UK). Για την παρασκευή των διαφορετικών αντιδραστηρίων που αξιοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν: DPPH' -1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na₂CO₃ 20% w/v), trolox - C₁₈H₁₂N₅O₆ ισοδύναμο Βιταμίνης E (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), αντιδραστήριο Folin Ciocalteu (Merck), γαλλικό οξύ - 98% καθαρότητα, AlCl₃, οξικό νατριο, αντιδραστήριο ABTS, υπερθειικό κάλιο, βανιλίνη, θειικό οξύ. Τέλος, για τη διήθηση των εκχυλισμάτων έγινε χρήση φίλτρων σύριγγας Hydrophilic PVDF και για τη διήθηση των διαλυτών που επρόκειτο να περάσουν από HPLC χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα διήθησης MCE, 0.20 μm pores size (SARTORIUS, Germany). Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στο αντίστοιχο κεφάλαιο της περαματικής πορείας.

II. Μέθοδοι

Ξήρανση και Τεφροποίηση

Προκειμένου να ελεγχθούν τα επίπεδα υγρασίας και το ποσοστό ανόργανων συστατικών στα φυτά, τα φύλλα *Vitis vinifera* υπέστησαν ξήρανση και τεφροποίηση αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, ζυγίστηκε 1g αλεσμένου φυτού, το οποίο θερμάνθηκε στους 105°C για 1h (σε φούρνο nuve FN500). Στη συνέχεια, τα ξηραμένα φύλλα παρέμειναν στον αποτεφρωτήρα (nuve furnace MF106), στους 600°C για 5h. Επίσης, ελήφθη το βάρος έπειτα από την ξήρανση και την τεφροποίηση και υπολογίστηκε το ποσοστό απώλειας βάρους, ώστε να διαπιστωθεί το αν τα φυτά ήταν εντός ορίων.

Εκχύλιση ά' ύλης

Προκειμένου να διαπιστωθούν ποιοτικά τα συστατικά της πρώτης ύλης, δηλαδή των φύλλων *Vitis Vinifera*, τα τελευταία εκχυλίστηκαν με τη χρήση MeOH. Η αναλογία αλεσμένων φύλλων προς τον

διαλύτη ήταν 5% w/v. Τα φύλλα παρέμειναν για 5 min βυθισμένα στη MeOH και ακολούθησε διήθηση με διηθητικό χαρτί, ώστε να ληφθεί το εκχύλισμα της α' ύλης. Τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο.

Εκχύλιση με απλή διαβροχή (maceration)

Στη μέθοδο της εκχύλισης με απλή διαβροχή, τα φυτά μένουν με το διαλύτη για κάποιες ημέρες σε σκιερό μέρος, χωρίς κανένα είδος πίεσης. Στην προκειμένη περίπτωση, τα φύλλα *Vitis vinifera* παρέμειναν για 10 ημέρες υπό σκιά με 2 διαφορετικά μείγματα διαλυτών: H₂O:EtOH (60:40, v/v) και H₂O:γλυκερίνη (60:40, v/v). Η εκχύλιση έλαβε χώρα σε κλειστό περιέκτη, 50mL, και τα δείγματα ανακινούνταν μία φορά την ημέρα. Μετά το πέρας των 10 ημερών, τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν με διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια με φίλτρο σύριγγας 0,45μm. Τέλος, τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο.

Εκχύλιση με υπερήχους (UAE – Ultrasound Assisted Extraction)

Η εναλλακτική τεχνική εκχύλισης που δοκιμάστηκε ήταν η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE - Ultrasound Assisted Extraction). Προκειμένου να διαπιστωθεί ποια θα ήταν η ιδανική μέθοδος για τη λήψη όσο δυνατόν περισσότερων δραστικών ουσιών, τα φύλλα *Vitis vinifera* εκχυλίστηκαν κάτω από 6 διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου παραμονής στο υδατόλουτρο (20, 30 και 60 min στους 25 και 35°C) και με 2 διαφορετικά μείγματα διαλυτών: H₂O:EtOH (60:40, v/v) και H₂O:γλυκερίνη (60:40, v/v). Οι εκχυλίσεις έλαβαν χώρα σε υδατόλουτρο με υπερήχους Vibra-Cell VCX 750 (20 kHz, 750 W), το οποίο ήταν εξοπλισμένο με μετατροπέα και κεφαλή Ti-6Al-4V διαμέτρου 13mm, κατασκευασμένη από κράμα τιτανίου (Sonics and Materials Inc., Newtown, USA). Η αναλογία δείγματος αλεσμένων φύλλων προς διαλύτη ήταν 1:10, w/v. Μετά την εκχύλιση τα δείγματα διηθήθηκαν με διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια με φίλτρο σύριγγας 0,45μm. Τέλος, τα εκχυλίσματα διατηρήθηκαν στο ψυγείο.

HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography)

Η συσκευή HPTLC που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Camag (Camag, Muttenz, Ελβετία) και αποτελείται από ένα αυτοματοποιημένο εφαρμογέα δείγματος ATS4, έναν αυτοματοποιημένο θάλαμο ανάπτυξης ADC2, έναν σαρωτή TLC 3, έναν οπτικοποιητή για τη φωτογράφιση των πλάκων και μια συσκευή εμβάπτισης με θερμαντήρα πλάκας για τη χρώση αυτής. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το VisionCats 2.2 και WinCats 1.4.9 (Camag). Οι γυάλινες πλάκες HPTLC κανονικής φάσης, (20 × 10 cm) που έχουν επικαλυφθεί με silica gel 60 F254 αγοράστηκαν από τη Merck (Darmstadt, Γερμανία).

Με τη βοήθεια του εφαρμογέα δείγματος, 15 µL από κάθε εκχύλισμα εφαρμόστηκαν στις πλάκες. Στη συνέχεια, οι πλάκες αναπτύχθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης με την απόσταση ανάπτυξης να είναι στα 70 mm από το κάτω άκρο της πλάκας. Ο κορεσμός του θαλάμου ρυθμίστηκε στα 20 λεπτά και η σχετική υγρασία της πλάκας ρυθμίστηκε στο 33% με τη χρήση κορεσμένου διαλύματος χλωριούχου μαγνησίου για 10 λεπτά. Η κινητή φάση αποτελούνταν από μείγμα διχλωρομεθανίου/μεθανόλης/απιονισμένου νερού (70/30/4 v/v/v). Οι πλάκες φωτογραφήθηκαν στα 254 nm και 366 nm μετά την ανάπτυξη και σε λευκό φως μετά τη χρώση τους με 3mL διαλύματος βανιλίνης-θεικού οξέος. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο αποτελείται από 1g βανιλίνης διαλυμένης σε 100mL αιθανόλης και 1 mL θεικού οξέος και παρασκευαζόταν κάθε φορά λίγο πριν τη χρήση του εκ νέου.

In vitro Αξιολόγηση

Ικανότητα δέσμευσης ελεύθερης ρίζας (DPPH•)

Για να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων, έγινε χρήση της ρίζας 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•). Η ρίζα DPPH• έχει χρώμα βαθύ μωβ, αλλά αποχρωματίζεται όταν έρθει σε επαφή με ουσία με αντιοξειδωτική δράση. Ο αποχρωματισμός οφείλεται στην αναγωγή της ρίζας και την πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου ή ενός ηλεκτρονίου, οπότε και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (με υποκίτρινο χρώμα). Η ακριβής απώλεια χρώματος μετράται με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου στα 517 nm, με τη χρήση της συσκευής Infinite® 200 PRO NanoQuant Multimode Microplate Reader (Tecan Trading AG).

Παρασκευή διαλύματος DPPH•: Σε 100 mL αιθανόλης διαλύονται 12,4 mg DPPH. Το διάλυμα παρασκευάζεται λίγο πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων και φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

Σε 96τρυπες πλάκες (96 well plates) τοποθετήθηκαν 10 µL από κάθε δείγμα και προστέθηκαν 190 µL διαλύματος DPPH•. Ακολούθησε επώαση 30 min στο σκοτάδι. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης μετρήθηκε η απορρόφηση τους στα 517 nm. Για κάθε πλάκα παρασκευάστηκε ένα τυφλό δείγμα (control) που περιέχει DPPH• και αιθανόλη αντί για δείγμα. Επίσης για κάθε δείγμα παρασκευάστηκε ένα blank, για αφαίρεση του χρώματος του εκχυλίσματος, που περιέχει αιθανόλη στη θέση του DPPH•. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος αυτών.

Η αντιοξειδωτική δράση κάθε εκχυλίσματος, βάση της ικανότητας αναγωγής της ρίζας DPPH, υπολογίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{ Αναγωγή} = [(\text{Απορρόφηση τυφλού} - \text{Απορρόφηση δείγματος}) / \text{Απορρόφηση τυφλού}] * 100$$

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με πρότυπο Trolox mM, (ένα υδατοδιαλυτό ισοδύναμο βιταμίνης E, με ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH). Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 1,6 mM, σε αιθανόλη. Με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 1.2, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 και 0,1 mM αντίστοιχα. Τόσο το αρχικό διάλυμα, όσο και οι αραιώσεις φωτομετρήθηκαν στα 517 nm, για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Από τη συνάρτηση της καμπύλης υπολογίζεται για κάθε δείγμα η αντιοξειδωτική ικανότητα ως ισοδύναμο Trolox.

Ικανότητα δέσμευσης ελεύθερης ρίζας (ABTS)

Το ABTS (2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)) είναι μια χημική ένωση που χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί η ύπαρξη αντιοξειδωτικής ιδιότητας στα εκχυλίσματα, με μεγαλύτερη ευαισθησία από το DPPH που αναφέρθηκε προηγουμένως. Σε αυτή τη μέθοδο το ABTS μετατρέπεται στο κατιόν του, με προσθήκη υπερθειικού νατρίου (potassium persulfate). Αυτό το ριζικό κατιόν είναι μπλε χρώματος και απορροφά το φως στα 734 nm. Το κατιόν ABTS είναι δραστικό έναντι των περισσότερων αντιοξειδωτικών. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, το κυανό κατιόν ABTS ξαναμετατρέπεται στην άχρωμη ουδέτερη μορφή του.

- ✓ Για την παρασκευή stock διαλύματος ABTS 7 mM, διαλύονται 36,08 mg ABTS σε 10 ml H₂O.
- ✓ Για την παρασκευή διαλύματος potassium persulfate 2.45 mM, διαλύονται 37.84 mg potassium persulfate σε 1 mL H₂O.

- ✓ Για την παρασκευή ABTS solution αναμειγνύονται 3 ml από το ABTS stock solution με 49,24 μL από το διάλυμα potassium persulfate και αφήνονται σε σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 12 με 16 h.
- ✓ Για την παρασκευή του τελικού ABTS work solution προστίθεται σταδιακά στο ABTS solution ποσότητα νερού, έως ότου η απορρόφηση φτάσει στα 0,7 AU στα 734 nm (περίπου 40 ml H₂O).

Σε 96 well plate τοποθετήθηκαν 50 μL από κάθε δείγμα και προστέθηκαν 100 mL διαλύματος ABTS work solution. Ακολούθησε επώαση για 10 min στο σκοτάδι. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης μετρείται η απορρόφηση στα 734 nm με τη χρήση της συσκευής Infinite M200 pro TECAN. Σε κάθε πλάκα τοποθετήθηκε και ένα control που περιείχε αιθανόλη αντί δείγματος. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

Οι μετρήσεις που προκύπτουν από τη φωτομέτρηση εκφράζονται σε ισοδύναμα Trolox, ένα υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E, με διαδικασία ίδια με εκείνη που αναφέρθηκε στην παράγραφο «Ικανότητα δέσμευσης ελεύθερης ρίζας (DPPH)».

Προσδιορισμός Ολικού Φαινολικού Περιεχομένου - TPC (Folin – Ciocalteu)

Για να προσδιοριστεί το ολικό φαινολικό περιεχόμενο του κάθε δείγματος, το οποίο συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική του ικανότητα, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu. Το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu είναι ένα κίτρινο διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων, τα οποία σχηματίζονται από φωσφο-μολυβδαινικά και φωσφο-βολφραμικά ετεροπολυμέρη οξέα. Τα φαινολικά ιόντα οξειδώνονται και ταυτόχρονα ανάγεται το αντιδραστήριο F.C., προς κυανά οξείδια του βολφραμίου και του μολυβδαινίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μπλε χρώματος, που παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 517 nm.

Το αραιωμένο διάλυμα 10% v/v Folin Ciocalteu (1mL F.C. σε 9 mL H₂O) παρασκευάζεται λίγο πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων ή φυλάσσεται στο ψυγείο. Επίσης χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα Na₂CO₃ 7,5% w/v για τη ρύθμιση της αλκαλικότητας.

Σε 96τρυπες πλάκες (96 well plates) τοποθετήθηκαν 25 μL από κάθε δείγμα και στη συνέχεια 125 μL αραιωμένου διαλύματος Folin - Ciocalteu 10% v/v και 100 μL υδατικού διαλύματος Na₂CO₃. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση για 30min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 765 nm με τη χρήση της συσκευής Infinite M200 pro TECAN. Για κάθε πλάκα παρασκευάστηκε ένα τυφλό δείγμα (control) που περιείχε αιθανόλη αντί για δείγμα. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

Το φαινολικό περιεχόμενο εκφράζεται ως ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης γαλλικού οξέος ζυγίστηκαν 0,08 g από το τελευταίο, τα οποία στη συνέχεια διαλύθηκαν σε 50mL αιθανόλης, δημιουργώντας έτσι το αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 1,6 mg/mL. Το αρχικό διάλυμα αραιώθηκε ούτως ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκέντρωσης 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 και 0.1 mg/mL αντίστοιχα. Όλα τα διαλύματα φωτομετρήθηκαν και από τα αποτελέσματα προέκυψε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς γαλλικού οξέος.

Προσδιορισμός Ολικών Φλαβονοειδών - TFC ($AlCl_3$)

Για τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου ενός εκχυλίσματος σε φλαβονοειδή χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο $AlCl_3$. Τα φλαβονοειδή σχηματίζουν σύμπλοκα με διάφορα μεταλλικά ιόντα όπως το $AlCl_3$ στις αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών. Το σύμπλοκο Al-φλαβονοειδές που δημιουργείται έχει έντονο κίτρινο χρώμα και ανιχνεύεται στα 415 nm.

Για την παρασκευή του διαλύματος $AlCl_3$ διαλύονται 1,8 g $AlCl_3$ σε 100 ml H_2O , ενώ για την παρασκευή του διαλύματος οξικού νατρίου διαλύονται 8,2 g από το τελευταίο σε 100 ml H_2O . Σε 96 well plate τοποθετήθηκαν 50 μ L από κάθε δείγμα και στη συνέχεια προστίθενται τα υπόλοιπα αντιδραστήρια ως εξής: 20 μ L διαλύματος $AlCl_3$, 160 μ L αιθανόλης και 20 μ L διαλύματος οξικού νατρίου. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση για 40 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 415 nm με τη χρήση της συσκευής Infinite M200 pro TECAN. Σε κάθε πλάκα τοποθετείται και ένα δείγμα control που περιέχει αιθανόλη αντί εκχυλίσματος. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης εκφράζονται ως ισοδύναμα κερκετίνης, η οποία ανήκει στην υποκατηγορία των φλαβονολών. Πιο συγκεκριμένα 0,017 g άνυδρης κερκετίνης διαλύθηκαν σε 100ml μεθανόλης και αποτέλεσαν το αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 500 μ M. Το αρχικό διάλυμα υπέστη διαδοχικές αραιώσεις, ώστε να σχηματιστούν διαλύματα συγκεντρώσεων 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 100, 200, 400 και 800 μ g/mL. Τα διαλύματα αυτά φωτομετρήθηκαν και από τα αποτελέσματα προέκυψε η πρότυπη καμπύλη κερκετίνης.

Μέτρηση pH και Σημείου Διάθλασης (R.I.)

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εκχυλισμάτων και συγκεκριμένα μετρήθηκε το pH και το σημείο διάθλασης του κάθε διαλύματος. Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις ήταν η συσκευή μέτρησης pH SevenCompact™, pH/Ion S220

(Mettler Toledo Inc., Switzerland) και η συσκευή μέτρησης δείκτη διάθλασης (Refractometer) RX-50000 (ATAGO CO Ltd, Japan).

ΙΧ. Μικροβιολογική ανάλυση

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο μικροβιολογικό εργαστήριο της ΑΡΙΒΙΤΑ και είναι οι παρακάτω:

1. Ολική μικροβιακή χλωρίδα (ΟΜΧ) / g ή ml – καταμέτρηση μετά από επώαση στους 33°C
2. Ζυμες & μυκήτες / g ή ml – καταμέτρηση μετά από επώαση στους 23°C
3. St. Aureus / g ή ml – καταμέτρηση μετά από επώαση στους 35°C
4. Ps. aeruginosa/ g ή ml – καταμέτρηση μετά από επώαση στους 35°C
5. E. Coli / g ή ml – καταμέτρηση μετά από επώαση στους 35°C & 44°C

Ζυγίστηκαν 10g ή mL δειγματος σε ουροσυλλέκτη και αυτά προστέθηκαν 90 mL LPT. Κάθε δείγμα ανακινήθηκε για δέκα δευτερόλεπτα στο vortex. Στη συνέχεια έγινε εμβολιασμός των τρυβλίων.

Προσδιορισμός ΟΜΧ (Total Plate Count)

Από την πρώτη αραιώση, μεταφέρθηκε ασηπτικά 0,5 mL δειγματος σε διπλή σειρά τρυβλίων Petri μιας χρήσεως, επιστρωμένα με TSA. Σε κάθε τρυβλίο αναγραφόταν η ημερομηνία διαβάσματος του τρυβλίου, ο αύξων αριθμός του δειγματος (π.χ. από τον κατάλογο παραλαβών δειγμάτων τον αύξοντα αριθμό) και τέλος, το θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο γίνεται η επώαση. Κατόπιν τα τρυβλία επώαστηκαν αντεστραμένα στους 33°C για 3-5 ημέρες.

Μετά το πέρας της επώασης καταμετρήθηκαν όλα τα τρυβλία που περιέχουν περισσότερες από 5 αποικίες. Η καταμέτρηση αριθμού αποικιών που αποκλίνουν από το παραπάνω όριο είναι δυνατή, αλλά υπάρχει σφάλμα στο αποτέλεσμα. Προσδιορίζεται το άθροισμα των αποικιών από τα 2 τρυβλία της ίδιας αραιώσης. Καταμετρούνται όλες ανεξαιρέτως οι αποικίες. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως αριθμός cfu/g προϊόντος μετά από πολλαπλασιασμό του μέσου όρου των μετρήσεων επί τον συντελεστή της δεκαδικής αραιώσης, π.χ. εάν στο τρυβλίο της πρώτης αραιώσης (10⁻¹) καταμετρήθηκαν 5 αποικίες επί 2 (γιατι προσθέσαμε 0,5 mL στο τρυβλίο), το δείγμα περιέχει 10 X10¹ cfu /g = 1X10² cfu /g. Σε περίπτωση που αναπτυχθούν αποικίες από τη δεύτερη μέρα επώασης, η ανάλυση του δειγματος επαναλαμβάνεται εκ νέου, για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Προσδιορισμός Ζύμων και Μυκήτων (Y&M)

Από την πρώτη αραιώση, μεταφέρθηκαν ασηπτικά 0,5 mL δείγματος σε διπλή σειρά τρυβλίων Petri μιας χρήσεως, επιστρωμένα με SDA. Κατόπιν τα τρυβλία ταξινομήθηκαν ανά δείγμα και ανά κατηγορία μικροοργανισμού και επώαστηκαν αντεστραμένα στους 23°C για 5-7 ημέρες. Η καταμέτρηση των αποικιών και η έκφραση του αποτελέσματος έγινε όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω.

Προσδιορισμός *Ps. Aeruginosa*

Τοποθετήθηκαν 10 mL από το δείγμα σε αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη, ο οποίος περιείχε 90 mL TSB. Κάθε δείγμα ανακινήθηκε για δέκα δευτερόλεπτα στο vortex και επώαστηκε για 24 ώρες στους 35°C. Κατόπιν, με αποστειρωμένο κρίκο έγινε επιφανειακή επίστρωση σε τρυβλία με PSA. Η επώαση έλαβε χώρα στους 35°C για 18-72 ώρες (συνήθως 48 ώρες). Μετά την επώαση, εμφανίζονται στα τρυβλία πράσινες αποικίες του *Ps. Aeruginosa*. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως παρουσία/απουσία παθογόνων μικροοργανισμών ανά g ή ml δείγματος.

Προσδιορισμός *St. aureus*

Τοποθετήθηκαν 10 mL από το δείγμα σε αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη, ο οποίος περιείχε 90 mL TSB. Κάθε δείγμα ανακινήθηκε για δέκα δευτερόλεπτα στο vortex και επώαστηκε για 24 ώρες στους 35°C. Κατόπιν, με αποστειρωμένο κρίκο έγινε επιφανειακή επίστρωση σε τρυβλία με Manitol Salt Agar/ Baird Parker. Η επώαση έλαβε χώρα στους 35°C για 18-72 ώρες (συνήθως 48 ώρες).

Προσδιορισμός *E. coli*

Τοποθετήθηκε 1mL από το δείγμα με το LPT σε αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη, ο οποίος περιέχει 9 mL TSB. Ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 35°C. Κατόπιν, με αποστειρωμένο βακτηριολογικό κρίκο έγινε επιφανειακή επίστρωση σε τρυβλία με Chromocult. Η επώαση έλαβε χώρα στους 35°C για 24 ώρες. Μετά την επώαση, εμφανίζονται επάνω στα τρυβλία με το Chromocult μπλε-μωβ αποικίες για *E. coli* και κόκκινες αποικίες για τα Coliforms. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως παρουσία/απουσία παθογόνων μικροοργανισμών ανά g ή mL δείγματος.

Προσδιορισμός *Candida albicans*

Τοποθετήθηκαν 10 mL από το δείγμα με το LPT σε αποστειρωμένο ουροσυλλέκτη, ο οποίος περιείχε 90 ml SDB. Κάθε δείγμα ανακινήθηκε για δέκα δευτερόλεπτα στο vortex και επώαστηκε στους 35°C για 72 ώρες. Κατόπιν, με αποστειρωμένο κρίκο έγινε επιφανειακή επίστρωση σε τρυβλία με SDA/ *Candida* Agar. Η επώαση έλαβε χώρα στους 35°C για 48 ώρες (SDA) & στους 35°C για 24-48 ώρες (*Candida* Agar) και καταμετρήθηκαν όλες οι αποικίες.

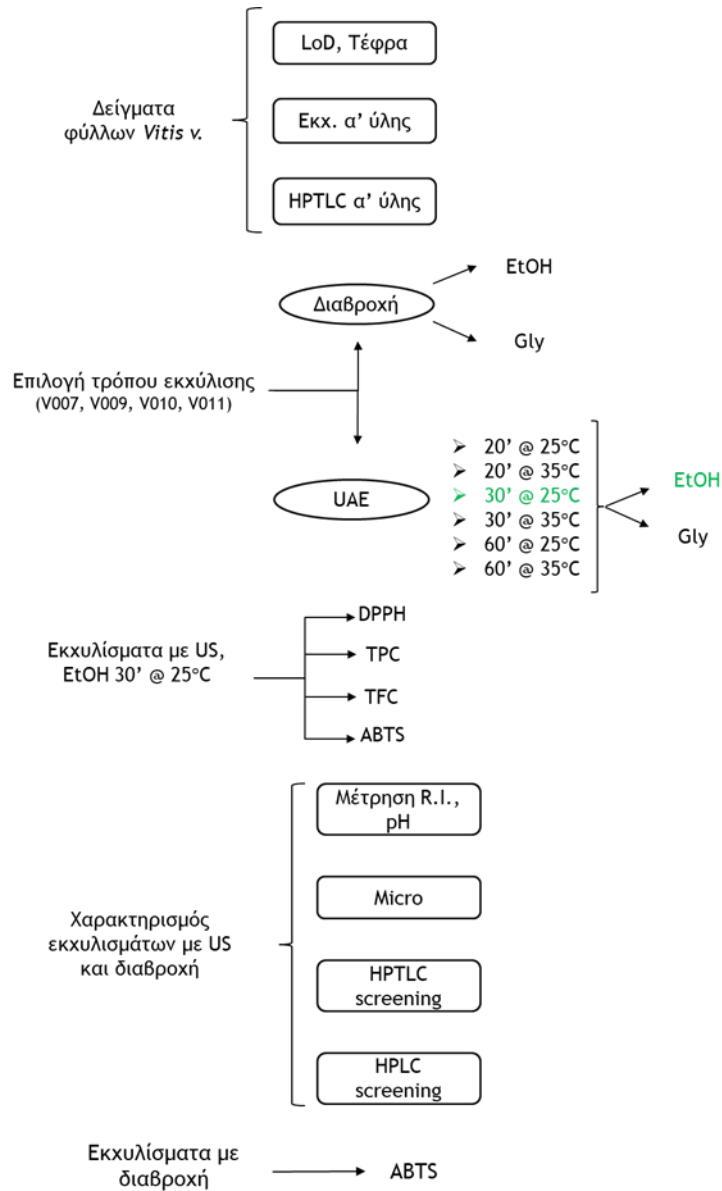
X. HPLC

Προκειμένου να γίνει μελέτη όλων των εκχυλισμάτων (από εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους και από εκχύλιση με διαβροχή) και να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές στη σύστασή τους, αλλά και να εκτιμηθεί το πόσο «πλούσια» σε δραστικές ουσίες είναι, τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

Η συσκευή χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν η HPLC AGILENT HEWLETT PACKARD SERIES 1100 (Agilent Technology, Urdorf, Switzerland), που αποτελείται από αντλία με επαέρωση (Degasser), αντλία (QuantPump), φούρνο (ColComp), και ανιχνευτή DAD. Η εισαγωγή δείγματος έγινε από το χρήστη χειροκίνητα. Τα εκχυλίσματα των φύλλων *Vitis vinifera* αναλύθηκαν στους 25°C, με στήλη αντίστροφης φάσης 250 × 4 mm, Kromasil 100-5-C18. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ως κινητή φάση ήταν (A) 0.5% οξικό οξύ με H₂O και (B) MeOH. Το πρόγραμμα έκλουσης είχε ως εξής (v/v): από 0min 5% B, βαθμιδωτά στα 60min 95% B ακολουθούμενο από καθαρισμό και εξισορρόπηση της στήλης ανάμεσα στα δείγματα (με ένεση MeOH). Το πρόγραμμα καθαρισμού είχε ως εξής (v/v): από 0 μέχρι 10min 95% B, στα 11min 5% B και μέχρι τα 25min στο 5% το B. Ο όγκος δείγματος ορίστηκε στα 20μL και η ροή στο 1mL/min. Τα μήκη κύματος ανίχνευσης ορίστηκαν στα 254, 280 και 366 nm και τελικά επιλέχθηκαν τα 254nm που έδιναν την πιο καθαρή εικόνα. Το ρυθμιστικό διάλυμα H₂O/οξικού οξέος παρασκευαζόταν εκ νέου κάθε μέρα.

ΧΙ. Πειραματική Πορεία

Παρακάτω παρατίθεται σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

I. Μελέτη πρώτης ύλης

Ο φυτικός ιστός που μελετήθηκε ήταν φύλλα *Vitis vinifera* από διαφορετικούς παραγωγούς ανά την Ελλάδα.

Lost on Drying, Τέφρα

Η μέτρηση της απώλειας μάζας μετά από ξήρανση διεξάγεται ώστε να υπολογιστούν τα ποσοστά υγρασίας της πρώτης ύλης. Με τον όρο υγρασία αναφερόμαστε σε όλη την ύλη ενός δείγματος που μπορεί να εξατμιστεί και συνεπώς περιλαμβάνει όχι μόνο νερό αλλά και λίπη, πτητικούς διαλύτες και αλκοόλες. Πολύ υψηλό ποσοστό υγρασίας σημαίνει και μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης μικροβιακού φορτίου, ιδίως κατά την αποθήκευση των φύλλων. Αντίστοιχα, η απώλεια μάζας μετά από τεφροποίηση γίνεται ώστε να υπολογιστούν τα επίπεδα ανόργανων συστατικών. Η θέρμανση στους 600°C καταστρέφει τα οργανικά στοιχεία του φυτικού ιστού. Υψηλά επίπεδα ανόργανων συστατικών συνεπάγονται και περισσότερα ιζήματα στο εκχύλισμα και ενδεχομένως ύπαρξη βαρέων μετάλλων στην πρώτη ύλη.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται το ποσοστό απώλειας της μάζας έπειτα από ξήρανση και τεφροποίηση από 17 διαφορετικά δείγματα φύλλων *Vitis vinifera* που προήλθαν από όλη την Ελλάδα.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα σε ποσοστά της μάζας που χάθηκε κατά την ξήρανση και την τεφροποίηση των φύλλων *Vitis Vinifera*.

Δείγμα	Πληροφορίες	Υγρασία	Τέφρα
V001	Οινοποιείο Μωραΐτη, Πάρος	7.83%	5.98%
V002	Αοτον Winery	7.04%	8.68%
V003	Βίβλια Χώρα	6.69%	6.32%
V004	Αμπελώνες Βασάλτης, Βούρβουλος Οια	7.43%	8.19%
V005	Στροφυλιά ΙΚΕ, Ανάβυσσος	7.00%	6.80%
V006	Κτήμα Παυλίδη	7.32%	7.25%
V007	Σεμελη Α.Ε., Κούτσι Νεμέα	6.99%	7.08%
V008	Κουκουλέτσος Γεώργιος, Άργος	8.65%	8.08%
V009	Παπαγιαννούλη Κωνσταντίνα, Κατερίνη	7.82%	7.16%
V010	Tsitsas rira, Αίγιο Αχαΐα	7.75%	8.97%
V011	Τετράμυθο, Άνω Διακοπτό	5.98%	6.95%

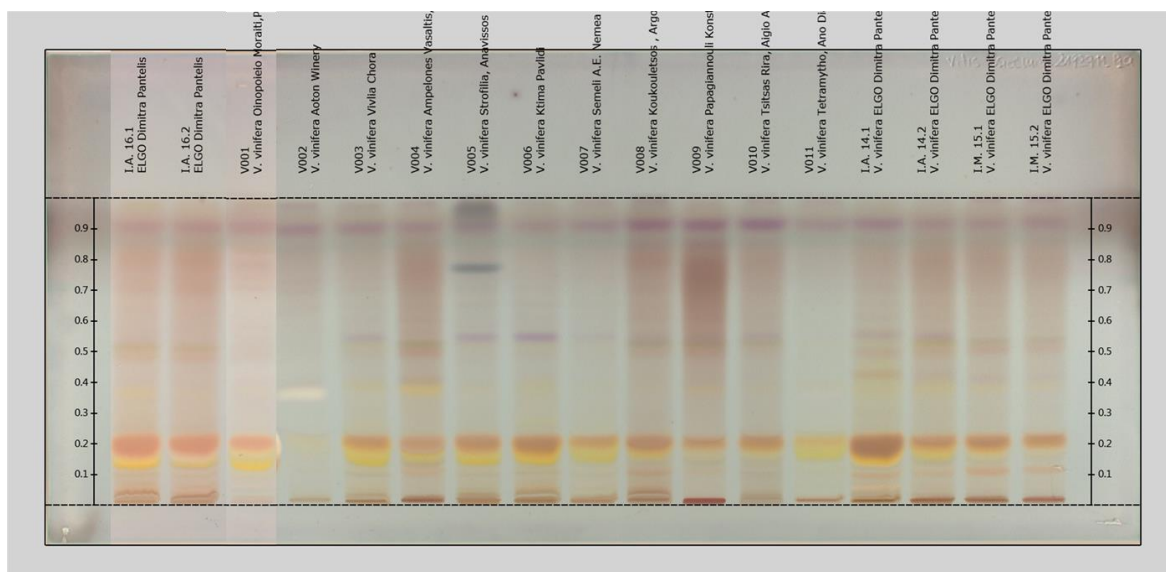
I.A. 14.1	ΕΛΓΟ Δήμητρα Παντελής	7.46%	7.15%
I.A. 14.2	ΕΛΓΟ Δήμητρα Παντελής	6.70%	7.10%
I.M. 15.1	ΕΛΓΟ Δήμητρα Παντελής	7.57%	7.82%
I.M. 15.2	ΕΛΓΟ Δήμητρα Παντελής	6.99%	8.86%
I.A. 16.1	ΕΛΓΟ Δήμητρα Παντελής	7.93%	6.92%
I.A. 16.2	ΕΛΓΟ Δήμητρα Παντελής	8.53%	7.27%

Τα ανώτατα αποδεκτά όρια για τη χρήση της συγκεκριμένης πρώτης ύλης είναι 16% για την υγρασία και επίσης 16% για την τέφρα. Όπως φαίνεται όλα τα δείγματα είναι κατά πολύ κάτω από αυτά τα όρια και άρα εντός προδιαγραφών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή εκχυλισμάτων.

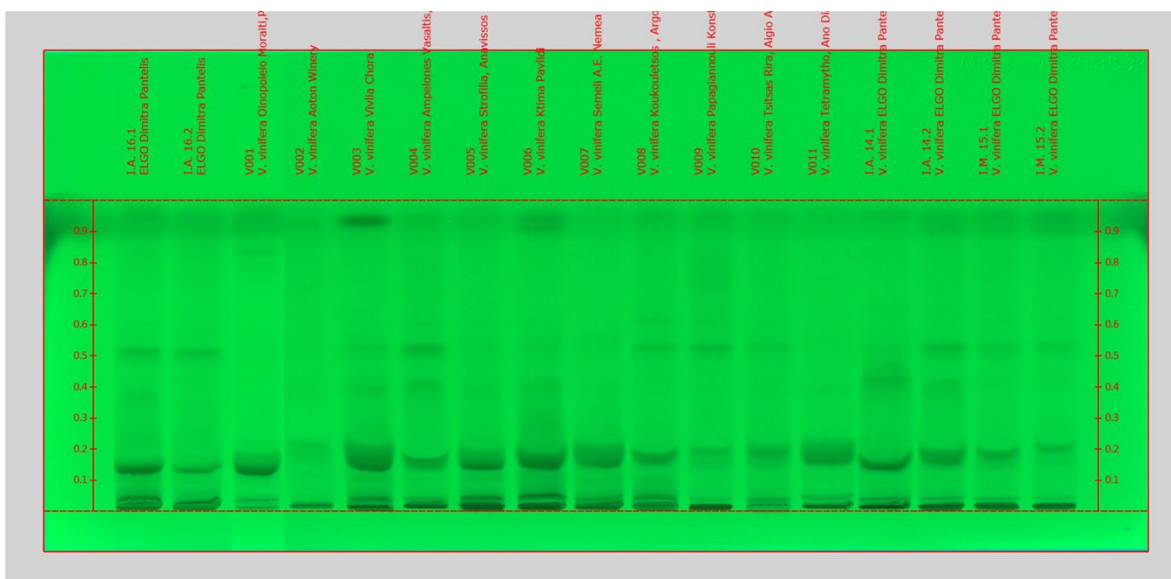
ΗΡΤΛC στα εκχυλίσματα της πρώτης ύλης

Στη συνέχεια της αξιολόγησης της πρώτης ύλης, διεξήχθη ανάλυση των εκχυλισμάτων του φυτικού ιστού (με MeOH ως διαλύτη και γρήγορη εκχύλιση 5 λεπτών) με τη χρήση Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (ΗΡΤΛC). Η εκχύλιση και η ανάλυση αυτή γίνεται προκειμένου να έχουμε μία εικόνα για το περιεχόμενο και την ποιότητα της πρώτης ύλης μας γρήγορα και να διαπιστωθεί εάν χάνονται σημαντικά ενδεχομένως συστατικά του φυτικού ιστού ως αποτέλεσμα της μετέπειτα επεξεργασίας του. Οι εικόνες ελήφθησαν σε κανονικό φως έπειτα από χρώση της πλάκας με θειική βανιλίνη, καθώς και με απορρόφηση στα 254nm και στα 366nm.

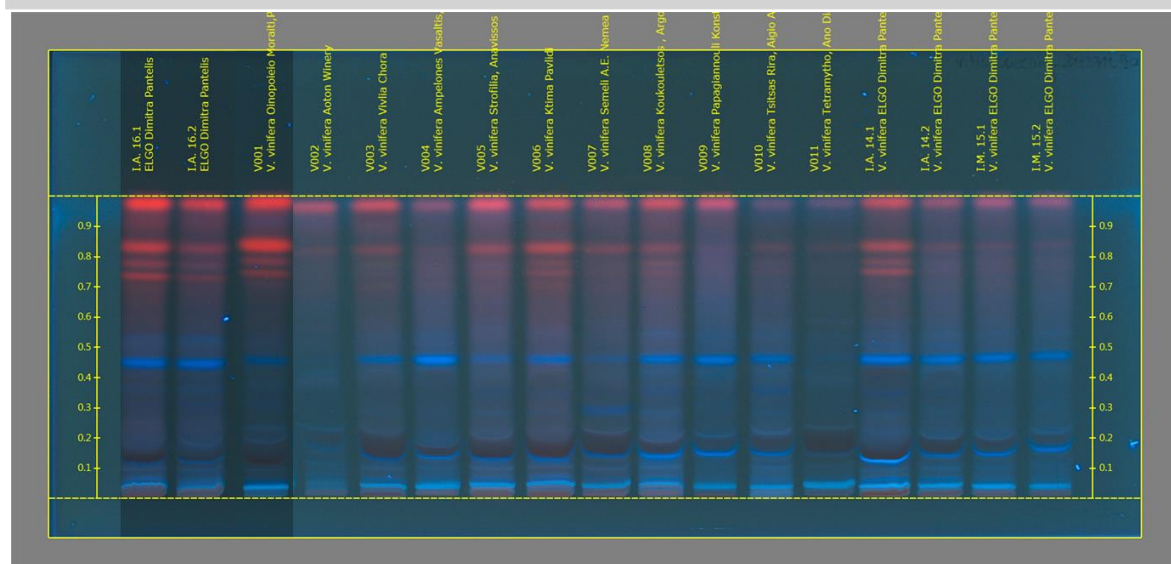
A.



B.



Γ.



Εικόνα 6: Αποτελέσματα HPTLC για τα εκχυλίσματα της α' ύλης. Η πλάκα φωτογραφήθηκε (Α) υπό κανονικό φως έπειτα από χρώση με θεϊκή βανιλίνη, καθώς και (Β) με απορρόφηση στα 254nm και (Γ) στα 366nm.

Παρατηρείται ότι όλα σχεδόν τα εκχυλίσματα, εκτός από το V002, έχουν παρόμοια σύσταση και εμφανίζουν δύο μπάντες μεγάλου πάχους κοντά στο R_f 0.2 και μία πιο λεπτή στο 0.9. Οι δύο πρώτες φαίνεται να εμφανίζουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα δείγματα I.A. 14.1 και I.A. 16.1. Επίσης το δείγμα V005 εμφανίζει μία ακόμα μπάντα, που δε διακρίνεται στα υπόλοιπα δείγματα κοντά στο R_f 0.8. Στα 366nm μπορούμε να διακρίνουμε με μεγαλύτερη ευκολία μία μπάντα που εμφανίζεται σε όλα σχεδόν τα δείγματα, ανάμεσα στο R_f 0.4 και 0.5. Το πιο φτωχό σε ουσίες δείγμα φαίνεται μάλλον ότι είναι το V002, ενώ τα πιο πολλά υποσχόμενα φαίνεται να είναι το V001 το V005 το I.A. 14.1 και το I.A. 16.1. Σε γενικές γραμμές όμως, φαίνεται ότι τα φύλλα έχουν παρόμοιο προφίλ, τουλάχιστον έπειτα από μία γρήγορη ανάλυση της πρώτης ύλης.

II. Επιλογή τρόπου εκχύλισης

Για την παραλαβή των αντιοξειδωτικών από το φυτικό ιστό επιλέχθηκαν τυχαία 4 δείγματα (V007, V009, V010 και V011) στα οποία δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης, δηλαδή διαβροχή και εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους. Και στις δύο τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικά μείγματα διαλυτών: H₂O:EtOH (60:40, v/v) και H₂O:γλυκερίνη (60:40, v/v). Στην περίπτωση των υπερήχων δοκιμάστηκαν 6 διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου παραμονής στο υδατόλουτρο:

- 20 min στους 25°C
- 30 min στους 25°C
- 60 min στους 25°C
- 20 min στους 35°C
- 30 min στους 35°C
- 60 min στους 35°C

Συνολικά προέκυψαν 12 εκχυλίσματα από διαβροχή και 48 από UAE, τα οποία αναλύθηκαν με τη μέθοδο DPPH ώστε να διαπιστωθεί σε ένα πρώτο επίπεδο η αντιοξειδωτική τους δράση και να επιλεγεί έτσι ο ιδανικός τρόπος εκχύλισης για τα φύλλα *Vitis vinifera*. Ακολουθεί πίνακας με τα αποτελέσματα σε ποσοστά απορρόφησης.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα (σε ποσοστό %) της απορρόφησης εκχυλισμάτων με διαφορετικές τεχνικές και συνθήκες εκχύλισης έπειτα από τη μέθοδο DPPH για τη αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης. Με πράσινο σημειώνονται οι υψηλότερες απορροφήσεις και άρα η καλύτερη εξουδετέρωση της ελεύθερης ρίζας.

	Αιθανόλη	% αναστολή του DPPH
V007	V007 Eth 25°C, 20'	7.66
	V007 Eth 25°C, 30'	35.93
	V007 Eth 25°C, 60'	64.49
	V007 Eth 35°C, 20'	37.13
	V007 Eth 35°C, 30'	43.35
	V007 Eth 35°C, 60'	47.23
	V007 Eth maceration	69.58

	Γλυκερίνη	% αναστολή του DPPH
V007	V007 Gly 25°C, 20'	40.07
	V007 Gly 25°C, 30'	58.04
	V007 Gly 25°C, 60'	40.09
	V007 Gly 35°C, 20'	19.29
	V007 Gly 35°C, 30'	28.73
	V007 Gly 35°C, 60'	33.09
	V007 Gly maceration	46.52

V009	V009 Eth 25°C, 20'	39.02
	V009 Eth 25°C, 30'	35.17
	V009 Eth 25°C, 60'	42.99
	V009 Eth 35°C, 20'	42.03
	V009 Eth 35°C, 30'	42.70
	V009 Eth 35°C, 60'	32.62
	V009 Eth maceration	46.76

V009	V009 Gly 25°C, 20'	23.19
	V009 Gly 25°C, 30'	27.88
	V009 Gly 25°C, 60'	29.40
	V009 Gly 35°C, 20'	24.81
	V009 Gly 35°C, 30'	31.57
	V009 Gly 35°C, 60'	35.69
	V009 Gly maceration	34.67

V010	V010 Eth 25°C, 20'	88.20
	V010 Eth 25°C, 30'	97.45
	V010 Eth 25°C, 60'	83.72
	V010 Eth 35°C, 20'	52.35
	V010 Eth 35°C, 30'	72.32
	V010 Eth 35°C, 60'	87.56
	V010 Eth maceration	45.79

V010	V010 Gly 25°C, 20'	64.90
	V010 Gly 25°C, 30'	89.21
	V010 Gly 25°C, 60'	63.67
	V010 Gly 35°C, 20'	81.44
	V010 Gly 35°C, 30'	82.55
	V010 Gly 35°C, 60'	72.90
	V010 Gly maceration	34.04

V011	V011 Eth 25°C, 20'	49.77
	V011 Eth 25°C, 30'	90.03
	V011 Eth 25°C, 60'	83.93
	V011 Eth 35°C, 20'	61.15
	V011 Eth 35°C, 30'	78.80
	V011 Eth 35°C, 60'	76.26
	V011 Eth maceration	81.04

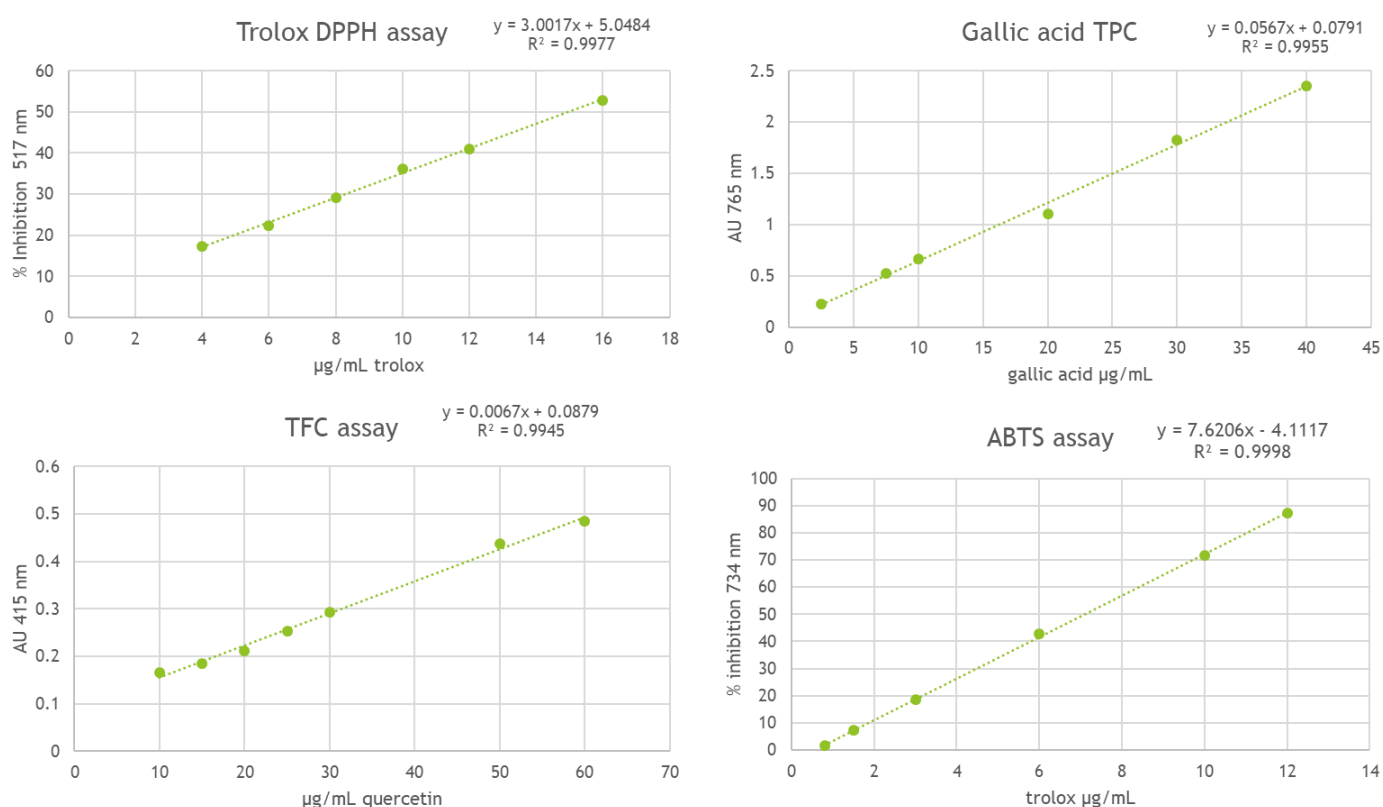
V011	V011 Gly 25°C, 20'	66.71
	V011 Gly 25°C, 30'	89.34
	V011 Gly 25°C, 60'	87.34
	V011 Gly 35°C, 20'	78.23
	V011 Gly 35°C, 30'	84.54
	V011 Gly 35°C, 60'	45.28
	V011 Gly maceration	53.32

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αποτελεσματικότερη μέθοδος εκχύλισης ώστε να παραληφθούν οι πιο δραστικές αντιοξειδωτικές ουσίες της πρώτης ύλης ήταν η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους για 30min στους 25 °C, με μείγμα αιθανόλης και νερού ως διαλύτη. Η γλυκερίνη είχε ως αποτέλεσμα συγκριτικά μικρότερες απορροφήσεις. Η διαβροχή επίσης έδειξε σχετικά μικρότερη αποτελεσματικότητα σε μέθοδο, παρόλα αυτά τα δείγματα V007 και V009 είχαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση όταν εκχυλίστηκαν με διαβροχή.

III. Εκχύλιση με υπερήχους

Λόγω των παραπάνω αποτελεσμάτων αποφασίστηκε να εξεταστούν πιο διεξοδικά τα δείγματα που εκχυλίστηκαν με UAE για 30min στους 25 °C. Εφεξής όταν γίνεται αναφορά στα δείγματα υπερήχων εννοείται ότι παράχθησαν υπό αυτές τις παραμέτρους. Οι συνθήκες αυτές εφαρμόστηκαν σε όλα τα

δείγματα φύλλων προκειμένου να γίνει *in vitro* ανάλυση των δειγμάτων με τις μεθόδους DPPH και ABTS για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης, τη μέθοδο Folin-Ciocalteu για τον προσδιορισμό του ολικού φαινολικού περιεχομένου του κάθε δείγματος και τη μέθοδο $AlCl_3$ για τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου των εκχυλισμάτων σε φλαβονοειδή. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ανάλογα trolox για τις δύο πρώτες, ανάλογα γαλλικού οξέος για το ολικό φαινολικό περιεχόμενο (TPC) και κερκετίνης για τα φλαβονοειδή (TFC) και υπολογίστηκαν με τη βοήθεια των γραφικών παραστάσεων που ακολουθούν.



Εικόνα 7: Γραφικές παραστάσεις πρότυπων καμπυλών % αναστολής του trolox για τις μεθόδους DPPH και ABTS καθώς και απορρόφησης του γαλλικού οξέος και της κερκετίνης για τις μεθόδους TPC και TFC αντίστοιχα. Σε κάθε γραφική παράσταση αναγράφεται και η εξίσωση με την οποία έγιναν οι μετατροπές των τιμών που προέκυψαν από κάθε μέθοδο.

Στη συνέχεια παρατίθεται πίνακας με τα αποτελέσματα σε ανάλογα trolox, γαλλικού οξέος και κερκετίνης όπως προαναφέρεται για κάθε δείγμα UAE. Τα εκχυλίσματα αραιώθηκαν με 1:100 αραιώση για τη μέθοδο ABTS και τα αποτελέσματα πολλαπλασιάστηκαν με το 100.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα *in vitro* τεστ για τα εκχυλίσματα με UAE. Με πράσινο σημειώνονται οι τρεις υψηλότερες τιμές για κάθε μέθοδο.

	Total	Total	Total	Total
Δείγμα	mg/mL trolox (DPPH)	mg/ml gallic acid	mg/ml quercetin	mg/g ξηρής μάζας (ABTS)
V001	9.62	29.31	31.50	26.41
V002	0.30	13.35	13.91	20.42
V003	6.44	41.29	32.74	36.86
V004	8.60	41.93	35.56	38.87
V005	4.31	25.31	23.98	28.15
V006	7.38	32.56	28.58	45.93
V007	4.69	59.53	47.72	120.60
V008	8.69	55.39	49.60	57.24
V009	5.59	52.01	39.22	50.22
V010	12.12	58.00	53.93	84.97
V011	18.48	59.28	55.63	128.80
IA14_1	10.59	57.78	51.16	78.11
IA14_2	8.88	54.09	49.31	54.32
IM15_1	5.19	37.97	27.81	41.10
IM15_2	4.30	41.56	24.36	41.50
IA16_1	4.51	41.44	35.35	36.23
IA16_2	7.32	55.80	50.69	64.41

Τα αποτελέσματα φαίνεται ότι συγκλίνουν ως προς τα πιο δραστικά εκχυλίσματα (V007, V010, V011 και I.A. 14.1). Τα αποτελέσματα του ABTS παρουσιάζονται ως ανάλογα trolox ανά g ξηρής μάζας φύλλου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε δραστικές ουσίες δεν είναι τόσο μεγάλη όσο θα μπορούσε να είναι (Fernandes et al., 2013) (Deliorman Orhan et al., 2009). Γι' αυτό το λόγο, αποφασίστηκε να μελετηθούν και τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν με διαβροχή πιο εκτενώς, ώστε να διαπιστωθεί τυχόν καλύτερη απόδοση αυτής της μεθόδου.

IV. Αξιολόγηση εκχυλισμάτων με UAE και διαβροχή

Εκτός από τα εκχυλίσματα με UAE με τις συνθήκες που προαναφέρθηκαν, παρασκευάστηκαν και εκχυλίσματα με διαβροχή και αιθανόλη ως διαλύτη. Το δείγμα V008 παραλείφθηκε λόγω έλλειψης φυτικού ιστού.

R.I. και pH

Ο δείκτης διάθλασης (R.I.) ποικίλλει ανάλογα με τη συγκέντρωση, τη θερμοκρασία, την πίεση και το μήκος κύματος στο οποίο μετράται. Η μέτρησή του μας δίνει πληροφορίες για το ποσοστό των ολικά διαλυμένων στερεών συστατικών (σακχάρων) στο εκχύλισμα.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα μέτρησης R.I. και pH στα εκχυλίσματα με UAE και με διαβροχή.

Εκχύλισμα	Με υπερήχους		Με διαβροχή	
	R.I.	pH	R.I.	pH
V001	15.38%	4.21	16.27%	3.99
V002	15.08%	4.65	15.82%	4.20
V003	15.31%	3.94	15.81%	3.45
V004	15.36%	4.21	17.26%	3.73
V005	15.24%	4.20	16.57%	3.77
V006	15.26%	3.99	16.58%	3.77
V007	16.07%	4.37	16.58%	4.25
V008	24.63%	3.81	-	-
V009	15.61%	4.12	16.50%	4.02
V010	15.89%	4.01	16.47%	3.87
V011	16.21%	4.43	16.89%	4.29
I.A. 14.1	16.02%	4.07	17.43%	4.09
I.A. 14.2	15.80%	3.90	17.46%	4.01
I.M. 15.1	15.43%	4.12	16.68%	4.03
I.M. 15.2	15.39%	4.10	16.82%	4.15
I.A. 16.1	15.44%	3.84	16.87%	3.62
I.A. 16.2	15.79%	3.74	16.82%	3.58

Μικροβιολογικός έλεγχος

Όλα τα εκχυλίσματα ελέγχθηκαν ως προς το μικροβιολογικό φορτίο, ώστε να είναι ασφαλές να χρησιμοποιηθούν και σε καλλυντικά, αλλά και να διαπιστωθεί ότι φυλάσσονται παραμένοντας κατά το δυνατόν αναλλοίωτα. Αρχικά μετρήθηκε το TPC (total plate count), το οποίο βρέθηκε να είναι

μικρότερο του 10 (εντός προδιαγραφών για χρήση σε καλλυντικά προϊόντα) για όλα τα εκχυλίσματα. Η μέθοδος αριθμεί το σύνολο των ζώντων αερόβιων μεσόφιλων βακτηρίων, τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν, σε ορισμένο θρεπτικό υπόστρωμα και να δώσουν ορατές αποικίες, ύστερα από ορισμένο χρόνο αερόβιας επώασης. Ακόμη, ελέγχθηκε ο αριθμός αποικιών των ζύμων και των μυκήτων, που επίσης βρέθηκε μικρότερος του 10 ανά τρυβλίο. Τέλος, έγινε έλεγχος για την παρουσία ολικών κολοβακτηριδίων, *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* και *Pseudomonas aeruginosa* και διαπιστώθηκε η απουσία τους σε όλα τα εκχυλίσματα. Αυτό σημαίνει ότι τα εκχυλίσματα που παράχθηκαν στο εργαστήριο έχουν σχεδόν μηδενικό μικροβιακό φορτίο και πληρούν τις προδιαγραφές. Ακολουθούν πίνακες με τα αποτελέσματα του μικροβιολογικού ελέγχου.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα μικροβιολογικού ελέγχου για τα εκχυλίσματα με τη βοήθεια υπερήχων.

ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ	ΗΜ/ΝΙΑ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ	ΗΜ/ΝΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	TPC	Y & M	Coliforms	E. coli	St. aureus	Cand. albicans	Ps. aeruginosa	RESULT
V001	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V002	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V003	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V004	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V005	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V006	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V007	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V008	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V009	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V010	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V011	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
I.A. 14.1	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
I.A. 14.2	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
I.M. 15.1	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
I.M. 15.2	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
I.A. 16.1	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
I.A. 16.2	13/01/20	13/01/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS

Πίνακας 8: Αποτελέσματα μικροβιολογικού ελέγχου για τα εκχυλίσματα με διαβροχή.

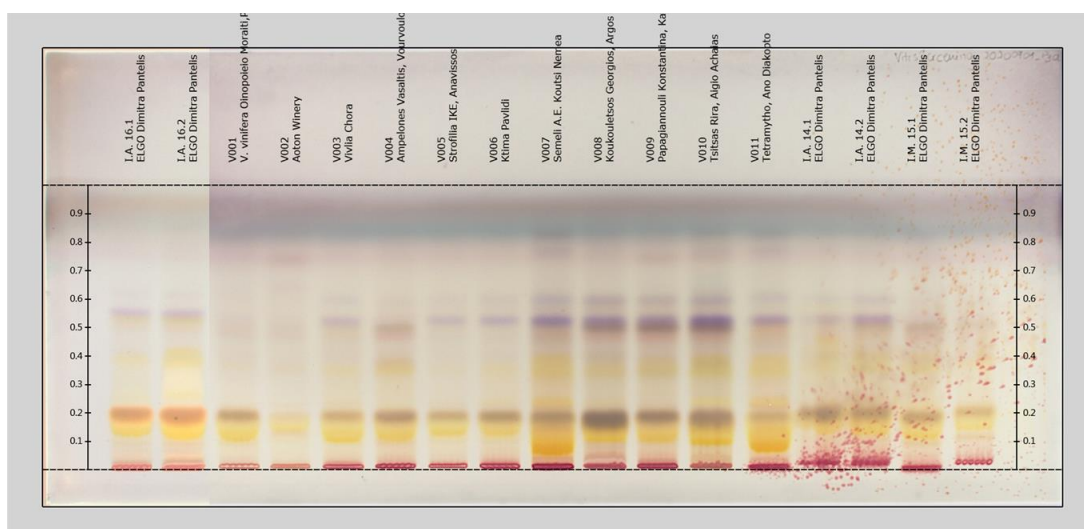
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ	ΗΜ/ΝΙΑ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ	ΗΜ/ΝΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	TPC	Υ & Μ	Coliforms	E. coli	St. aureus	Cand. albicans	Ps. aeruginosa	RESULT
V001	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V002	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V003	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V004	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V005	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V006	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V007	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V009	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V010	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
V011	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
I.A. 14.1	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
I.A. 14.2	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
I.M. 15.1	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
I.M. 15.2	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
I.A. 16.1	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS
I.A. 16.2	06/03/20	06/03/20	<10	<10	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	ABSENCE	PASS

HPTLC screening

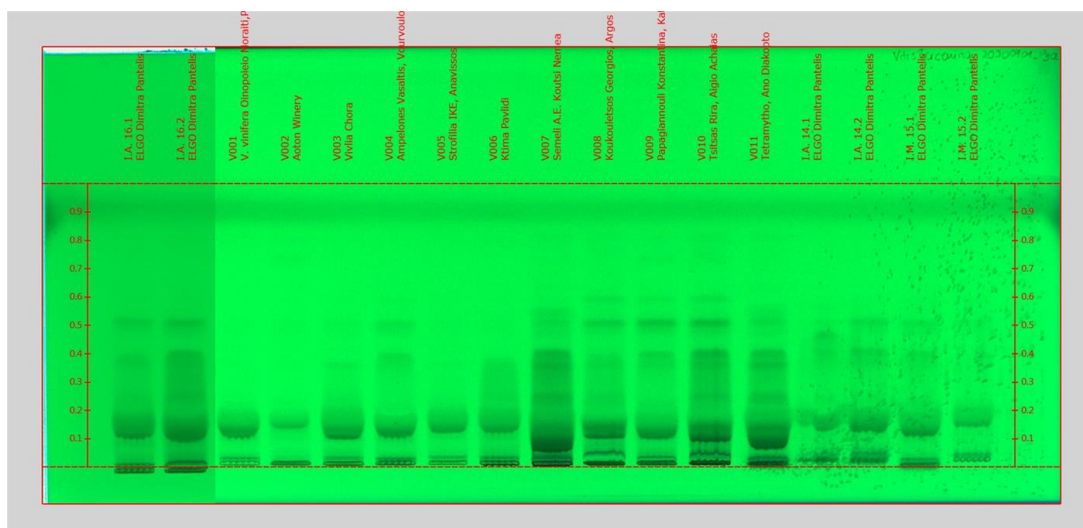
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των εκχυλισμάτων με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης (HPTLC). Οι εικόνες ελήφθησαν σε κανονικό φως έπειτα από χρώση των πλακών με θειική βανιλίνη, σε απορρόφηση 254nm και 366nm.

HPTLC στα εκχυλίσματα με UAE

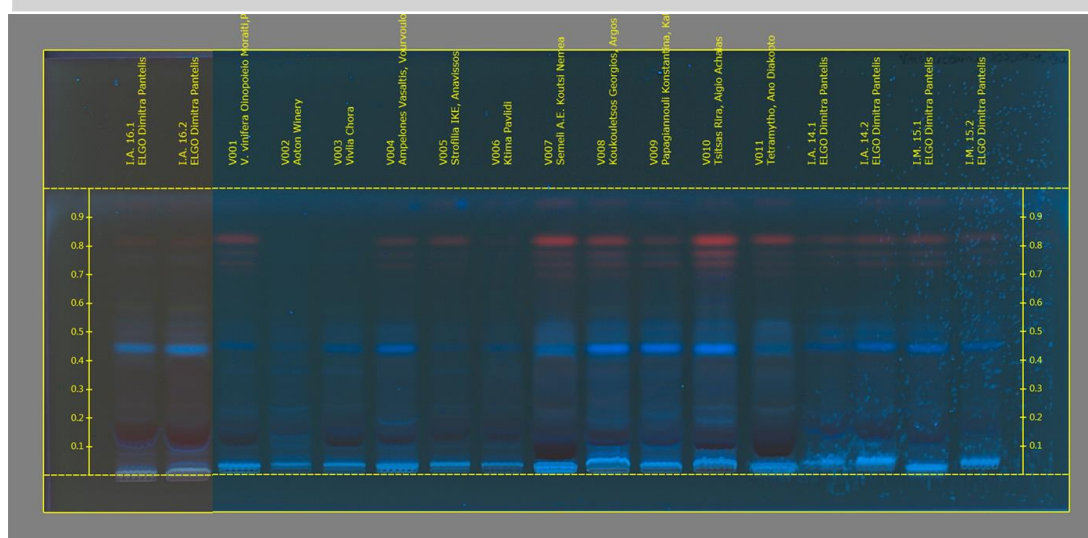
A.



B.



Γ.

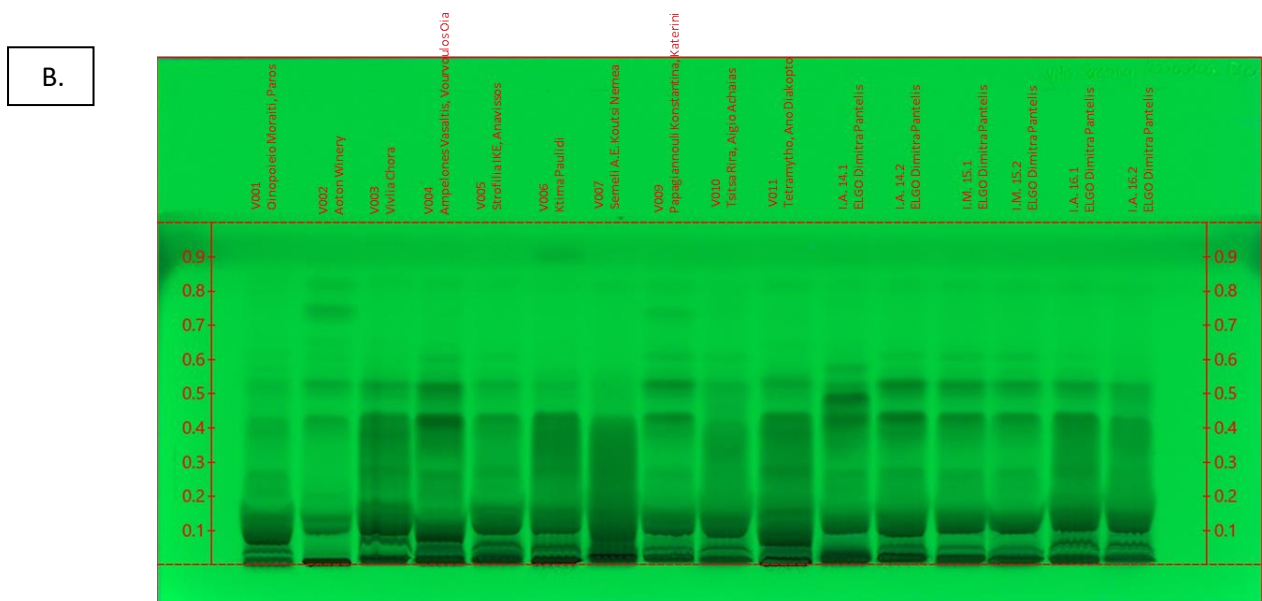
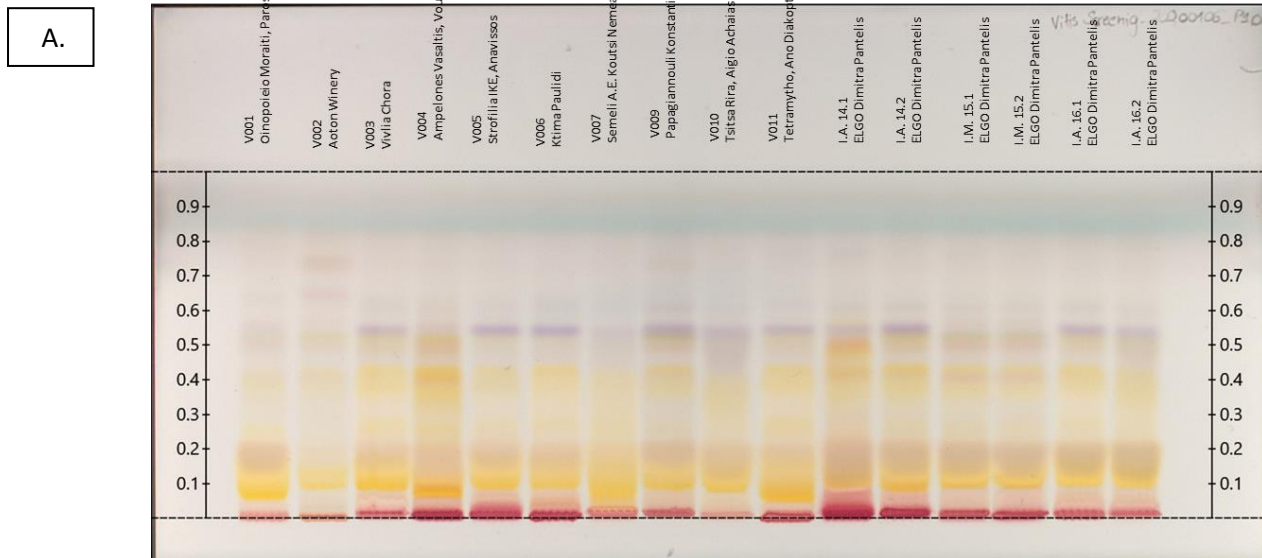


Εικόνα 8: Αποτελέσματα HPTLC για τα εκχυλίσματα με τη βοήθεια υπερήχων. Η πλάκα φωτογραφήθηκε (Α) υπό κανονικό φως έπειτα από χρώση με θειική βανιλίνη, καθώς και με απορρόφηση (Β) στα 254nm και (Γ) στα 366nm.

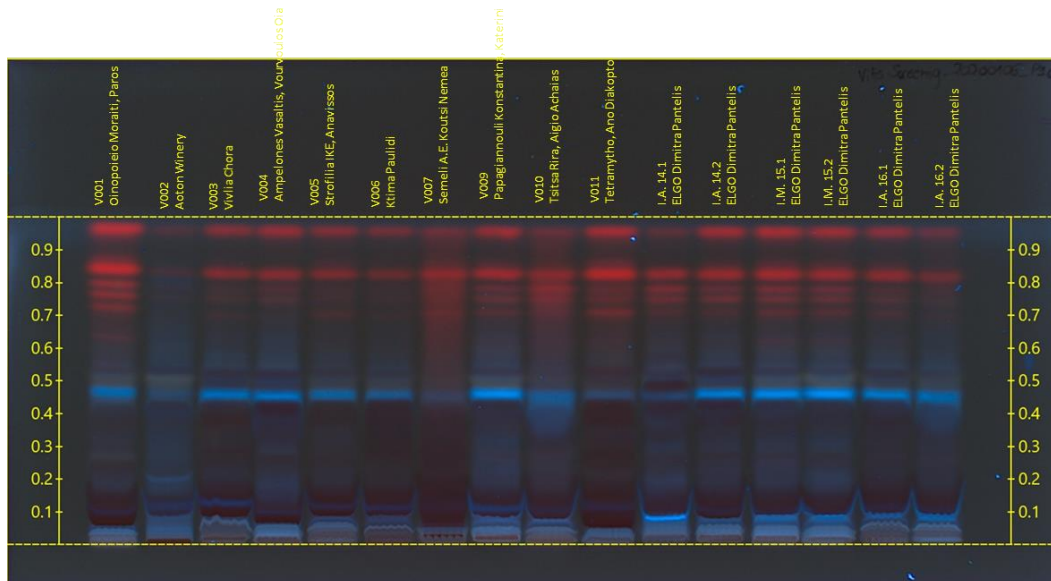
Παρατηρείται ότι τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν με τη βοήθεια υπερήχων και με EtOH σαν διαλύτη, είναι ενδεχομένως πιο πλούσια από τα αρχικά εκχυλίσματα της πρώτης ύλης. Αυτό σημαίνει ότι η επεξεργασία της πρώτης ύλης οδήγησε σε ένα πλουσιότερο εκχύλισμα. Εδώ τα δείγματα παρουσιάζουν ακόμη μεγαλύτερη ομοιογένεια μεταξύ τους. Το V002 φαίνεται να είναι και πάλι το πιο αδύναμο, ενώ και το V001 φαίνεται να επηρεάστηκε από την επεξεργασία. Όλα τα δείγματα έχουν τις ίδιες μπάντες κοντά στο R_f 0.2, μία αρκετά έντονη πριν το R_f 0.6 που εμφανίζεται ακόμα μεγαλύτερη στα V007, V008, V009 και V010 και τέλος μία πιο μικρή μπάντα στο R_f 0.6. Στα 366nm εμφανίζονται πιο καθαρά και κάποιες μπάντες κοντά στο μέτωπο του διαλύτη, και πάλι πιο έντονες για τα V007, V008, V009 και V010. Συνεπώς, τα εκχυλίσματα αυτά φαίνεται να είναι τα πιο πολλά υποσχόμενα. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία και τα *in vitro* τεστ που προηγήθηκαν

όσον αφορά τα δείγματα V007 και V010. Το δείγμα I.A. 14.1 κατά την εφαρμογή του είχε ως αποτέλεσμα διασπορά σταγονιδίων στην πλάκα, πιθανώς λόγω ιζήματος που είχε δημιουργηθεί στο εκχύλισμα, το οποίο δεν είχε ανακινηθεί επαρκώς.

HPTLC στα εκχυλίσματα με διαβροχή



Γ.



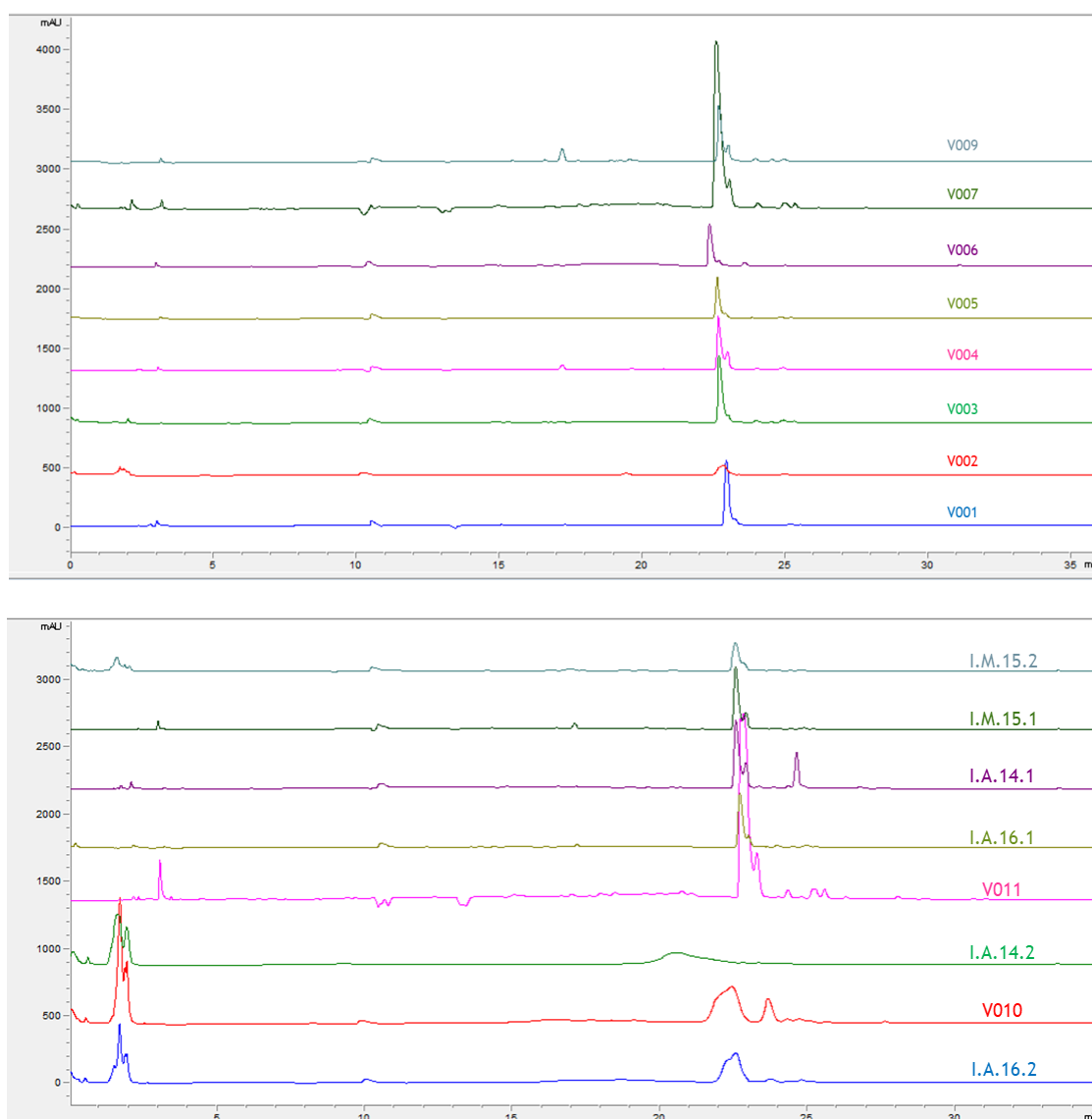
Εικόνα 9: Αποτελέσματα HPTLC για τα εκχυλίσματα με διαβροχή. Η πλάκα φωτογράφηθηκε (Α) υπό κανονικό φως έπειτα από χρώση με θειική βανιλίνη, καθώς και με απορρόφηση (Β) στα 254nm και (Γ) στα 366nm.

Τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων με διαβροχή δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα αυτά παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλία ουσιών και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αυτές. Η διαφορά αυτή φαίνεται ξεκάθαρα στις απορροφήσεις 254nm και 366nm. Στα 254nm διακρίνονται πολλές μπάντες από το R_f 0.1 έως το 0.5 περίπου, ιδιαίτερα για τα δείγματα V003, V006, V007 και V011. Το δείγμα V007 συγκεκριμένα εμφανίζει μία μεγάλη γκάμα ουσιών (διακρίνεται πολύ καλά στα 366nm) και φαίνεται να είναι το πιο πλούσιο. Συνολικά τα εκχυλίσματα με διαβροχή διαθέτουν μία μπάντα με σημαντική απορρόφηση στα 366nm και στο ύψος R_f 0.5 περίπου. Επίσης σε απορρόφηση 366nm εμφανίζονται σε όλα σχεδόν τα εκχυλίσματα με διαβροχή πολλές μπάντες κοντά στο μέτωπο του διαλύτη (από το R_f 0.7 έως το πάνω όριο της πλάκας), οι οποίες δεν έχουν ξαναεμφανιστεί σε τόσο μεγάλη συγκέντρωση με HPTLC στα εκχυλίσματα της πρώτης ύλης, ούτε σε αυτά με τη βοήθεια υπερήχων.

HPLC screening

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των εκχυλισμάτων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) χωρίς τη χρήση προτύπων. Τα χρωματογραφήματα που επιλέχθηκαν ήταν σε απορρόφηση 254nm.

HPLC στα εκχυλίσματα με τη βοήθεια υπερήχων

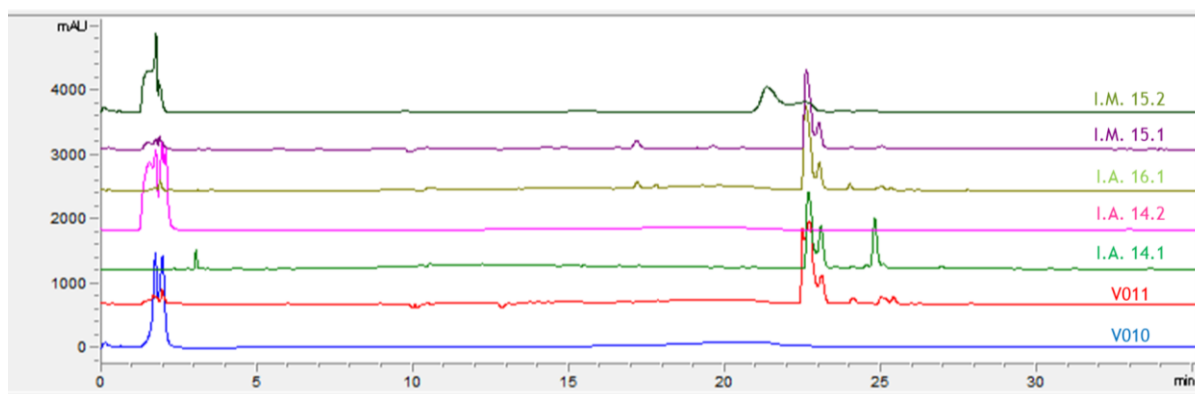
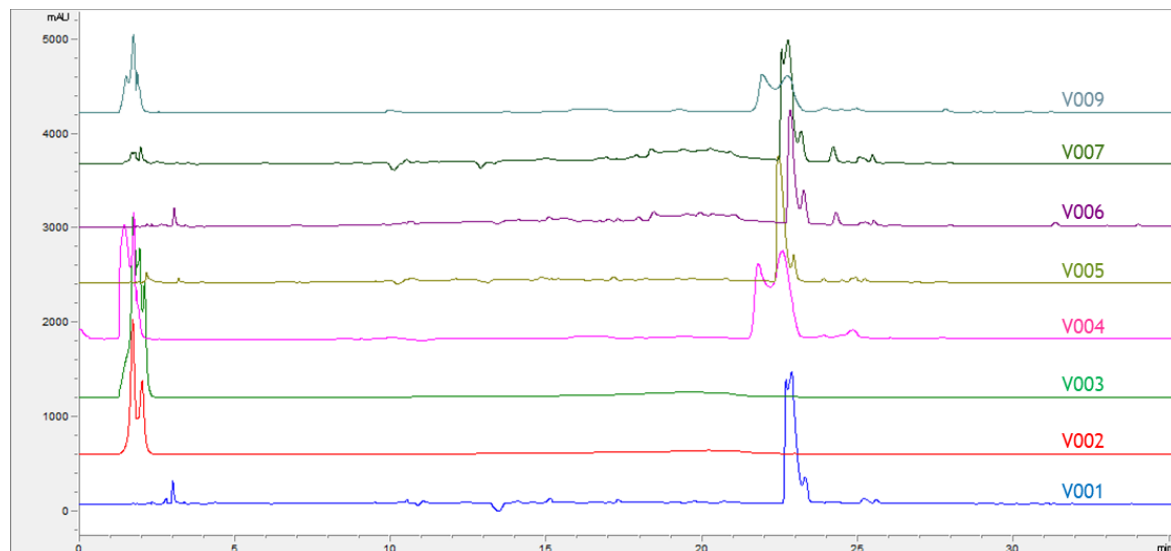


Εικόνα 10: Αποτελέσματα HPLC για τα εκχυλίσματα με UAE.

Τα περισσότερα εκχυλίσματα παρουσιάζουν μία παρόμοια μορφολογικά κορυφή στα 23 min, η οποία μάλιστα είναι διπλή σε κάποια από αυτά, πράγμα που σημαίνει ότι μπορεί να αντιστοιχεί σε δύο ουσίες. Τα I.A. 14.2, V010 και I.A. 16.2 όμως δεν έχουν τόσο καλή κορυφή (έως και ανύπαρκτη στην περίπτωση του I.A. 14.2) στα 23 min, αλλά εμφανίζουν πολλαπλές κορυφές, στην αρχή της έκλουσης, περίπου στα 2min. Τα δείγματα V007, V009, V011 και I.A. 14.1 φαίνεται να είναι τα πιο πλούσια εκχυλίσματα σύμφωνα με τα αποτελέσματα του HPLC screening, καθώς τα χρωματογραφήματά τους έχουν πολύ υψηλές, οξείες κορυφές. Στην περίπτωση των δύο τελευταίων μάλιστα, παρατηρούνται και πιο μικρές κορυφές στα 25 min, που δεν υπάρχουν στα υπόλοιπα δείγματα. Όπως αναμενόταν από τις δύο HPTLC που προηγήθηκαν, το δείγμα V002 είναι το πιο αδύναμο εκχύλισμα, καθώς οι κορυφές που παρουσιάζει είναι πολύ χαμηλές και καθόλου οξείες. Φαίνεται λοιπόν ότι τα

αποτελέσματα της HPLC συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με αυτά της HPTLC και με την *in vitro* αξιολόγηση.

HPLC στα εκχυλίσματα με διαβροχή



Εικόνα 11: Αποτελέσματα HPLC για τα εκχυλίσματα με διαβροχή.

Τα αποτελέσματα του HPLC screening για τα εκχυλίσματα με διαβροχή διαφοροποιούνται σε σχέση με τα προηγούμενα, όχι προς την ποιότητα των ουσιών, αλλά κυρίως ως προς την ποσότητα. Συγκεκριμένα, και εδώ τα περισσότερα δείγματα παρουσιάζουν μία κορυφή στα 23 min, η οποία δεν είναι τόσο καλοσηματισμένη, αλλά είναι υψηλή σε όλα τα δείγματα. Η κορυφή αυτή συνήθως ακολουθείται από μικρές κορυφές, κοντά στα 25 min. Επιπλέον, η κορυφή των 2 min που πριν δεν εμφανιζόταν σε όλα τα δείγματα, εδώ υπάρχει στην πλειοψηφία τους και είναι υψηλότερη. Είναι μάλιστα διπλή και τριπλή σε κάποια χρωματογραφήματα, πράγμα που συνιστά την ύπαρξη πολλών ουσιών κατά πάσα πιθανότητα. Το V002 και πάλι φαίνεται να είναι το πιο φτωχό εκχύλισμα, αυτή τη φορά όμως εμφανίζει μία διακριτή διπλή κορυφή στα 2 min. Συμπερασματικά, η εκχύλιση με

διαβροχή φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική από την UAE και από τα αποτελέσματα του HPLC screening.

V. *In vitro* αξιολόγηση εκχυλισμάτων με διαβροχή

Παρά τα αρχικά αποτελέσματα της μεθόδου DPPH που έδειξαν ότι η εκχύλιση με υπερήχους παράγει εκχυλίσματα με ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, τα αποτελέσματα των χρωματογραφικών screening συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι τα εκχυλίσματα με διαβροχή είναι τελικά πιο πλούσια σε ουσίες. Για να εξακριβωθεί αυτό, ακολούθησε μέτρηση της αναστολής του αντιδραστηρίου ABTS, μία μέθοδος που παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία από τις υπόλοιπες, στα εκχυλίσματα με διαβροχή. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε ανάλογα trolox έπειτα από αναγωγή λόγω αραιώσης και η σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των εκχυλισμάτων με UAE.

Πίνακας 9: Σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου ABTS εκφρασμένα σε ανάλογα trolox (mg/g ξηρής μάζας φύλλου) για τα εκχυλίσματα με UAE και διαβροχή.

Δείγμα	UAE	Διαβροχή
V001	26.41	90.63
V002	20.42	58.43
V003	36.86	134.61
V004	38.87	156.12
V005	28.15	135.99
V006	45.93	133.30
V007	120.60	128.07
V008	57.24	
V009	50.22	102.24
V010	84.97	98.19
V011	128.80	135.43
IA14_1	78.11	135.87
IA14_2	54.32	131.41
IM15_1	41.10	119.19
IM15_2	41.50	124.27
IA16_1	36.23	125.62
IA16_2	64.41	104.64

Τα αποτελέσματα της μεθόδου ABTS επιβεβαιώνουν όλα τα προηγούμενα screening ως προς την ανωτερότητα των εκχυλισμάτων με διαβροχή έναντι αυτών με UAE για τα φύλλα *Vitis vinifera* και υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες. Φαίνεται μάλιστα ότι περισσότερα δείγματα παρουσιάζουν υψηλή αναστολή του αντιδραστηρίου και άρα υπολογίσιμη αντιοξειδωτική δράση.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΓΟΡΑΣ

I. Εισαγωγή

Η μελέτη σκοπιμότητας για την ανάπτυξη ενός προϊόντος είναι η διερεύνηση της αγοράς και η ανάλυσή της, με στόχο το να εξακριβωθεί κατά πόσον η ανάπτυξη ενός νέου προϊόντος είναι οικονομικά βιώσιμη για μία εταιρεία. Περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τη διερεύνηση του ανταγωνισμού, των επιθυμιών και συνηθειών των καταναλωτών και εξάγει ένα συμπέρασμα για το κατά πόσο θα είναι οικονομικά επιζήμια ή ωφέλιμη η εισαγωγή ενός νέου προϊόντος στην αγορά από την εν λόγω εταιρεία.

Η παρούσα εργασία εστιάζει στην έρευνα αγοράς για ένα νέο προϊόν που θα μπορούσε να εντάξει σε ήδη υπάρχουσες σειρές δερμοκαλλυντικών της η Arivita ή μία αντίστοιχη εταιρεία δερμοκαλλυντικών.

II. Περιγραφή της εταιρείας

Η Arivita SA είναι μία εταιρεία φυσικών δερμοκαλλυντικών που ιδρύθηκε από τους Νίκο και Νίκη Κουτσιανά, ενώ πλέον ανήκει σε έναν ισπανικό όμιλο εταιρειών (Puig). Έχει αναπτύξει και εδραιώσει πάνω από τριακόσια φυσικά, αποτελεσματικά και ολιστικά προϊόντα για το πρόσωπο, το σώμα και τα μαλλιά, ενσωματώνοντας σε αυτά υψηλής βιολογικής αξίας μελισσοκομικά προϊόντα, εκχυλίσματα από ελληνικά βότανα, αγνά αιθέρια έλαια και πολλές πράσινες καινοτομίες και ευρεσιτεχνίες. Το ποσοστό φυσικότητας των προϊόντων είναι εξαιρετικά υψηλό και ακολουθείται από προδιαγραφές ελέγχου ποιότητας επιπέδου φαρμακευτικών προϊόντων. Η έρευνα και ανάπτυξη γίνεται in house και είναι κρίσιμο σημείο της καινοτομίας και αποτελεσματικότητας των προϊόντων της εταιρείας. Κατά τη διάρκεια των 40 ετών δράσης της, η Arivita έχει εξαπλωθεί σε 23 χώρες, όπως στην Ελλάδα, Ισπανία, Κύπρο, Ιταλία, Πορτογαλία, Βέλγιο, Ρουμανία, Ουκρανία, Ουγγαρία, Κροατία, Βουλγαρία, Αγγλία, Ιρλανδία, Μάλτα, Χονγκ Κονγκ, Μαυροβούνιο, Ρωσία, Ταϊβάν, Κίνα, Νότια Αφρική, Τυνησία, Ελβετία και Μαρόκο.

Τα τελευταία χρόνια η αγορά των καλλυντικών και προϊόντων περιποίησης προσώπου και σώματος γνωρίζει μία ταχεία ανάπτυξη με ολοένα και περισσότερα brands να δημιουργούνται και τις τιμές να ανεβαίνουν. Οι καταναλωτές είναι πρόθυμοι να επενδύσουν σε αυτά τα προϊόντα, αλλά ταυτόχρονα τους έχει δημιουργηθεί η ανάγκη να γνωρίζουν τι ακριβώς περιέχει το σκεύασμα που χρησιμοποιούν

και να είναι όσο το δυνατόν πιο βιώσιμο για το περιβάλλον. Αυτό εξηγεί και την άνοδο “clean”, cruelty free και vegan brands, αλλά και τις προσπάθειες πιο συμβατικών εταιριών να συμμορφωθούν με αυτές τις απαιτήσεις του κοινού. Η Arivita είναι μία εταιρία που από τη γέννησή της ακόμα πρόσβευε την περιποίηση του προσώπου, του δέρματος και των μαλλιών με φυσικά και ως επί τω πλείστω φυτικά προϊόντα που προέρχονται από την ελληνική χλωρίδα και πανίδα. Τα φύλλα αμπέλου ταιριάζουν σε αυτή τη φιλοσοφία. Αποτελούν παραπροϊόντα της οινοπαραγωγικής διαδικασίας και είναι μία πρώτη ύλη την οποία μπορεί η εταιρεία να προμηθευτεί από έλληνες παραγωγούς, ενισχύοντας την τοπική οικονομία και χρησιμοποιώντας απόβλητα

III. Περιγραφή προϊόντος – Ποιο πρόβλημα λύνει

Οι δραστικές μορφές οξειδωτικού (ROS) παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς ως αποτέλεσμα φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού, αλλά περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως ατμοσφαιρικοί ρύποι ή ο καπνός του τσιγάρου αυξάνουν τα επίπεδά τους στον οργανισμό. Τα ROS είναι πολύ δραστικά μόρια και μπορούν να βλάψουν κυτταρικές δομές όπως τους υδατάνθρακες, τα νουκλεϊκά οξέα, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες ή/και να αλλάξουν τις λειτουργίες τους. Ο οργανισμός διαθέτει ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα, ώστε να αντιμετωπίσει την δράση των ROS, αλλά γίνεται κατανοητό ότι οι σύγχρονοι ρυθμοί και ο τρόπος ζωής απαιτούν συνεχή έκθεση σε παράγοντες που αυξάνουν την παραγωγή οξειδωτικών. Η μετατόπιση της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων ονομάζεται «οξειδωτικό στρες». Το οξειδωτικό στρες έχει συνδεθεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις και εν γένει με το γήρας. Προκειμένου λοιπόν να προστατευθεί το δέρμα μας από την πρόωρη γήρανση, χρειάζεται βοήθεια από τη διατροφή, αλλά και την περιποίηση του δέρματος (Birben et al., 2012).

Η άμπελος έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιοξειδωτική και άρα και αντιγηραντική δράση σύμφωνα και με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας. Ένα προϊόν καθαρισμού ή/και ντεμακιγιάζ λοιπόν με εκχύλισμα φύλλων αμπέλου θα ήταν ιδανικό για επιδερμίδες που υφίστανται έκθεση σε ρύπους και άλλους οξειδωτικούς παράγοντες. Ο καθαρισμός ή το ντεμακιγιάζ είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα στην καθημερινή περιποίηση του προσώπου και από τις πιο σημαντικές κατηγορίες προϊόντων για τις εταιρείες δερμοκαλλυντικών. Ωστόσο τα συστατικά και η προώθησή τους συνήθως απευθύνονται σε μικρότερες ηλικίες. Η αντιοξειδωτική – αντιγηραντική δράση του συγκεκριμένου καθαριστικού το καθιστά ιδανικό και για πιο ώριμες επιδερμίδες (ίσως και με την προσθήκη ελαίων για ταυτόχρονη θρέψη), ενώ μπορεί εύκολα να ενσωματωθεί σε ήδη υπάρχουσες σειρές της Arivita όπως η Wine Elixir (σειρά με αντιγηραντική δράση για ηλικίες 35-50 ετών περίπου, η οποία περιέχει σταφύλι).

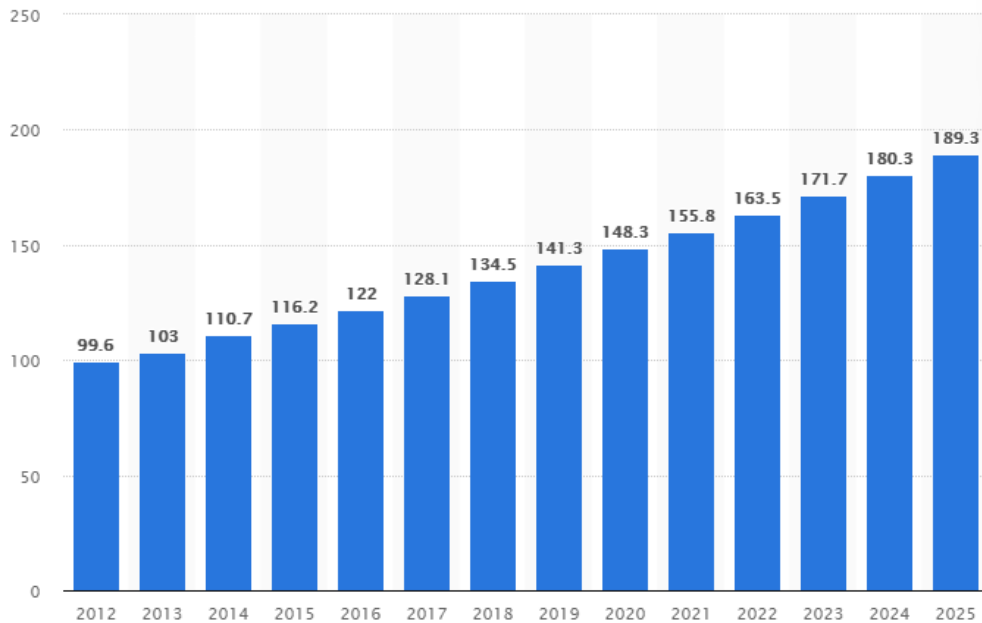
Η Arivita διαθέτει ήδη μία γκάμα προϊόντων καθαρισμού προσώπου, οι τιμές των οποίων κυμαίνονται από 10,20 – 12,60€ (για 150 mL προϊόντος), με το bestselling εκπλενόμενο σαπούνι καθαρισμού με λεβάντα να συγκαταλέγεται σε αυτά. Φαίνεται λοιπόν πως η εταιρεία έχει την τεχνογνωσία και την εμπιστοσύνη του καταναλωτικού κοινού στον τομέα των καθαριστικών προσώπου. Εν κατακλείδι, το προτεινόμενο προϊόν είναι φυσικό, περιέχει δραστικά συστατικά που του προσδίδουν προστιθέμενη αξία, υποστηρίζει την ελληνική οικονομία (και σε επίπεδο προμηθευτών) και έχει προσιτή τιμή, σε αντιστοιχία με την τιμολόγηση της εταιρείας σε αντίστοιχα προϊόντα.

Συνοψίζοντας λοιπόν όλα τα παραπάνω το προτεινόμενο προϊόν:

- ✓ είναι γαλάκτωμα καθαρισμού και ντεμακιγιάζ για το πρόσωπο
- ✓ κύριο δραστικό συστατικό του είναι το εκχύλισμα φύλλων *Vitis vinifera* προερχόμενου από ελληνικές καλλιέργειες
- ✓ διαθέτει αντιοξειδωτικές-αντιγηραντικές ιδιότητες
- ✓ έχει προσιτή τιμή
- ✓ έχει υψηλό ποσοστό φυσικότητας
- ✓ ανήκει σε ένα brand που έχει εδραιωθεί στην αντίληψη των καταναλωτών ως clean και με περιβαλλοντική συνείδηση

IV. Η αγορά

Λαμβάνοντας υπόψιν την τεράστια γκάμα προϊόντων που υπάρχουν στην αγορά των δερμοκαλλυντικών, πριν την επένδυση για την ανάπτυξη και κυκλοφορία ενός νέου, μία επιχείρηση πρέπει όσο μπορεί να εξασφαλίσει ότι υπάρχει χώρος για αυτό, μελετώντας τις ανάγκες του καταναλωτικού κοινού, αλλά και τον ανταγωνισμό. Φαίνεται ότι η αγορά των δερμοκαλλυντικών είναι μία συνεχώς αυξανόμενη αγορά, με άτομα όλων των ηλικιών πλέον να ενδιαφέρονται για αυτή. Παρακάτω παρουσιάζεται με γραφική παράσταση η άνθιση της αγοράς αυτής, σύμφωνα με έρευνα του 2019, έτος στο οποίο η αξία της αγοράς δερμοκαλλυντικών έφτασε τα 141.3 δις δολάρια, ενώ μέχρι το 2025 αναμένεται να αγγίξει τα 189.3 δις.



Εικόνα 11: Γραφική παράσταση που απεικονίζει την έως τώρα αξία της αγοράς δερμοκαλλυντικών (σε δις δολάρια Η.Π.), αλλά και την αναμενόμενη αύξησή της έως το 2025 (<https://www.statista.com>).

Σημαντική παρατήρηση, σύμφωνα με τη φύση του υπό εξέταση προϊόντος, είναι ότι η αγορά περιποίησης δέρματος γενικά επωφελείται από την αυξανόμενη ζήτηση για φυσικά και βιολογικά προϊόντα. Το 2016, το 57% των γυναικών στις ΗΠΑ δήλωσαν ότι ήταν σημαντικό να αγοράζουν δερμοκαλλυντικά με υψηλό ποσοστό φυσικότητας. Αυτό αντανακλάται και στην αντίδραση των εταιριών, που αναπτύσσουν σειρές καλλυντικών με φυσικό, cruelty free ακόμη και vegan χαρακτήρα, ή καθορίζουν τη στρατηγική προώθησης των προϊόντων τους με βάση το γνώμονα της φυσικότητας, κάτι που δεν ήταν παλαιότερα προτεραιότητά τους. Τα αντιγηραντικά προϊόντα αντιπροσωπεύουν επίσης μια εντόνως αναπτυσσόμενη κατηγορία καλλυντικών και προϊόντων περιποίησης στις ΗΠΑ. Ενδεικτικά, το 2014 η κορυφαία μάρκα δερμοκαλλυντικών στις Ηνωμένες Πολιτείες ήταν η Olay Regenerist, brand που ασχολείται με την αντιμετώπιση της γήρανσης του προσώπου, με πωλήσεις ύψους περίπου 103 εκατομμυρίων δολαρίων (<https://www.statista.com>).

Τόσο η αντιγήρανση όσο και η φυσικότητα είναι βασικοί πυλώνες της φιλοσοφίας της Arivita από την ίδρυσή της και η ανάπτυξη ενός προϊόντος με αυτά τα χαρακτηριστικά είναι όχι μόνο απαίτηση της αγοράς, αλλά και φυσική συνέχεια για το brand.

Αγορά Στόχος - Ιδανικός καταναλωτής

Για να εστιάσουμε πιο συγκεκριμένα στον ιδανικό καταναλωτή για το καθαριστικό προσώπου με αντιγηραντική δράση, πρέπει να διακριθούν ομάδες καταναλωτών τους οποίους αυτό μπορεί να προσεγγίσει, δηλαδή:

- ✓ TAM = Total Available Market, η συνολική αγορά για ένα προϊόν. Ο κάθε δυνητικός δηλαδή πελάτης, που θα μπορούσε να αγοράσει το προϊόν, ανεξάρτητα από τον ανταγωνισμό. Στην προκειμένη περίπτωση, όλοι όσοι επιθυμούν να αγοράσουν ένα προϊόν για καθαρισμό προσώπου.
- ✓ SAM = Served Available Market, υποσύνολο του TAM, το τμήμα της αγοράς που μπορεί να προσεγγίσει ένα προϊόν. Εδώ, το SAM είναι η μερίδα του αγοραστικού κοινού που επιθυμεί ένα προϊόν για καθαρισμό προσώπου με αντιγηραντικές ιδιότητες.
- ✓ SOM = Share Of the Market, υποσύνολο του SAM, η αγορά δηλαδή στην οποία ρεαλιστικά απευθύνεται το προϊόν. Αυτή είναι ουσιαστικά η αγορά-στόχος, με βάση την οποία θα γίνει κυρίως ο σχεδιασμός για την προώθηση του προϊόντος. Συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία, το SOM αναφέρεται στους καταναλωτές οι οποίοι επιθυμούν να αγοράσουν ένα προϊόν για καθαρισμό προσώπου με αντιγηραντικές ιδιότητες και δραστικά συστατικά φυσικής προέλευσης.

Σύμφωνα με τα παραπάνω ο ιδανικός καταναλωτής για το συγκεκριμένο προϊόν θα ήταν γυναίκες άνω των 30 ετών ανεξαρτήτως εισοδήματος, που φροντίζουν την επιδερμίδα τους και απαιτούν από τα brands τα οποία εμπιστεύονται να έχουν περιβαλλοντική συνείδηση και να χρησιμοποιούν φυσικά συστατικά στα προϊόντα τους. Το προφίλ του ιδανικού καταναλωτή πρέπει να ληφθεί υπόψιν κατά το σχεδιασμό της προώθησης του προϊόντος.

Κανάλια διανομής και προώθηση

Η Arivita είναι ένα brand με πολλά κανάλια διανομής στα οποία συμπεριλαμβάνονται φυσικά καταστήματα εντός πολυκαταστημάτων, εντός φαρμακείων και εντός αεροδρομίων, καθώς και experience stores στην Ευρώπη και την Ασία. Επίσης, τα προϊόντα της Arivita πωλούνται σε ξενοδοχεία και spa. Επιπλέον, διαθέτει e shop.

Όσο για την προώθηση του προϊόντος, οι διαφημιστικές καμπάνιες της εταιρείας περιλαμβάνουν τηλεοπτικό χρόνο, παρουσία στα social media και συνεργασία με influencers, διαφήμιση σε έντυπη μορφή, ακόμη και στο μετρό των Αθηνών. Όλα τα παραπάνω καθιστούν το brand ευπρόσιτο στον καταναλωτή και το προτεινόμενο προϊόν θα έχει τη δυνατότητα να προωθηθεί επαρκώς.

V. Ανάλυση ανταγωνισμού

Εφόσον έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει ζήτηση για το συγκεκριμένο προϊόν, το επόμενο βήμα είναι να εξακριβωθεί το κατά πόσον αυτή έχει ήδη καλυφθεί από ήδη υπάρχοντα προϊόντα. Στην εγχώρια και διεθνή αγορά κυκλοφορούν προϊόντα καθαρισμού με σταφύλι και μη, που δυνητικά είναι αναταγωνιστές του νέου προϊόντος που προτείνεται.

Άμεσος ανταγωνισμός

Ως άμεσος ανταγωνισμός στην παρούσα έρευνα, λογίζεται η μερίδα των καθαριστικών προσώπου που περιέχουν ως ενεργό συστατικό το *Vitis vinifera*. Παρακάτω παρουσιάζονται 4 από αυτά τα προϊόντα που είναι πιο κοντά σε φιλοσοφία με το προτεινόμενο προϊόν, από brands που είναι γνωστά στο ελληνικό και διεθνές κοινό, οι ιδιότητες που ισχυρίζεται το αντίστοιχο brand ότι αυτά διαθέτουν και τέλος η αξία τους.

Πίνακας 10: Ανασκόπηση των προϊόντων καθαρισμού προσώπου που περιέχουν *Vitis vinifera* ως ενεργό συστατικό και κυκλοφορούν στη διεθνή αγορά δερμοκαλλυντικών.

Brand	Όνομα Προϊόντος	Ιδιότητες Προϊόντος	Τιμή – 150ml
Caudalie	Instant Foaming Cleanser	Αφρός καθαρισμού χωρίς σαπούνι με ενυδατικό εκχύλισμα σταφυλιών και φασκόμηλου.	16€
Caudalie	Vinopure Purifying Gel Cleanser	Γέλη καθαρισμού εμπλουτισμένη με φυσικό σαλικυλικό οξύ, πολυφαινόλες αμπέλου και οργανικά αιθέρια έλαια.	17€
Caudalie	Gentle Cleansing Milk	Γαλάκτωμα καθαρισμού και ντεμακιγιάζ, κατάλληλο για ξηρό δέρμα με έλαιο από κουκούτσι σταφυλιού και βούτυρο καριτέ.	13.50€
Nivea	Soothing Cleansing Oil	Λάδι καθαρισμού και ντεμακιγιάζ εμπλουτισμένο με φυσικό έλαιο σταφυλιού, για ευαίσθητο τύπο δέρματος.	4.90€

Από την ανάλυση του άμεσου ανταγωνισμού φαίνεται ότι τα καθαριστικά προσώπου που περιέχουν σταφύλι, ή άλλο συστατικό αμπέλου όπως εκχύλισμα φύλλων, δεν είναι πολλά. Διαπιστώνεται λοιπόν ένα κενό στην αγορά ως προς τη χρήση αυτής της πρώτης ύλης. Η κύρια ανταγωνιστική εταιρεία είναι η Caudalie, μία γαλλική εταιρεία που εκμεταλλεύεται προϊόντα και παραπροϊόντα καλλιέργειας ή/και επεξεργασίας αμπέλου. Από τα 3 προϊόντα καθαρισμού της Caudalie, τα δύο έχουν σχετικά πιο υψηλή τιμή από τα αντίστοιχα της Arivita, ενώ το τρίτο συγκρίσιμη τιμή. Το τελευταίο έχει και δράση ντεμακιγιάζ. Το ανταγωνιστικό πλεονέκτημα του προτεινόμενου προϊόντος σε σχέση με τα προαναφερθέντα, θα μπορούσε να είναι η τιμή. Το τέταρτο ανταγωνιστικό προϊόν είναι από ένα πολύ αναγνωρίσιμο στο ελληνικό κοινό brand, τη Nivea. Το κύριο πλεονέκτημα του λαδιού καθαρισμού είναι η πολύ χαμηλή του τιμή. Ένα πλεονέκτημα του προτεινόμενου προϊόντος για την εγχώρια αγορά θα μπορούσε να είναι η στήριξη ελληνικών επιχειρήσεων, ιδιαίτερα υπό τις επεικρατούσες συνθήκες. Ωστόσο, η Nivea είναι ένα brand που υπάχει πολλά χρόνια στην ελληνική αγορά και ίσως έχει περάσει στη συνείδηση του ελληνικού κοινού ως ελληνική εταιρεία. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα λοιπόν που θα παρουσίαζε το υπό εξέταση προϊόν είναι τα φυσικά συστατικά, η συσχέτιση της Arivita με το φαρμακείο και τα αντίστοιχα πλεονεκτήματα που έχει αυτό σε σχέση με την περιποίηση της επιδερμίδας, καθώς και η συνολική πιο premium εικόνα του brand. Όλα αυτά δικαιολογούν και την συγκριτικά υψηλότερη τιμολόγηση του προϊόντος.

Έμμεσος ανταγωνισμός

Στη συνέχεια εξετάζεται ο έμμεσος ανταγωνισμός και συγκεκριμένα προϊόντα για καθαρισμό του προσώπου γνωστά στο ελληνικό και διεθνές κοινό, τα οποία δε διαθέτουν στα ενεργά συστατικά τους σταφύλι ή άλλα παράγωγα της αμπέλου.

Πίνακας 11: Ανασκόπηση των κορυφαίων προϊόντων καθαρισμού προσώπου που κυκλοφορούν στη διεθνή αγορά δερμοκαλλυντικών.

Brand	Όνομα Προϊόντος	Ιδιότητες Προϊόντος	Τιμή – 150ml
Cetaphil	Gentle Skin Cleanser	Ένα ήπιο καθαριστικό προσώπου και σώματος χωρίς σαπούνι, που ενυδατώνει και καταπραΰνει το δέρμα καθώς καθαρίζει.	3,96€
La Roche-Posay	Toleriane Dermo-Cleanser	Γαλάκτωμα καθαρισμού και ντεμακιγιάζ για μάτια και πρόσωπο, για ξηρό, δυσανεκτικό και ευαίσθητο δέρμα. Χωρίς άρωμα, χωρίς επιφανειοδραστικά και χωρίς συντηρητικά. Δεν είναι απαραίτητη η έκπλυσή του.	10,05€

Glossier	Milky Jelly Cleanser	Κρεμώδης γέλη καθαρισμού για όλους τους τύπους δέρματος. Υποαλλεργικό, δερματολογικά ελεγμένο, ασφαλές για την περιοχή των ματιών, χωρίς σαπούνι, parabens, θειικά άλατα, μη φαγεσωρογόνο, vegan.	25€
Drunk elephant	Beste™ No. 9 Jelly Cleanser	Γέλη καθαρισμού που αφαιρεί όλα τα ίχνη μακιγιάζ, το υπερβολικό λάδι και τους ρύπους. Χωρίς θειικά άλατα, άρωμα και αιθέρια έλαια, κατάλληλο για κάθε τύπο δέρματος.	29,65€
Fresh	Soy Face Cleanser	Καθαριστικό προσώπου 3 σε 1 (ντεμακιγιάζ, αφαίρεση ρύπων και τόνωση), με σόγια, αγγούρι και ροδόκερο.	35,22€

Από τον πίνακα που προηγήθηκε φαίνεται καταρχάς ότι τα τελευταία τρία προϊόντα απέχουν αρκετά τιμολογικά από την προτεινόμενη τιμή του υπό εξέταση προϊόντος, καθώς προέρχονται από premium brands. Αυτό είναι ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα για ένα προϊόν που θα κοστολογηθεί με τα κριτήρια που προαναφέρθηκαν. Το πρώτο προϊόν της λίστας έχει καθιερωθεί στην αγορά εδώ και πολλά χρόνια ως ένα ποιοτικό προϊόν που πωλείται σε φαρμακεία αλλά ταυτόχρονα έχει πολύ προσιτή τιμή. Αυτό αντανακλάται και στην πολυετή επιτυχία του. Ωστόσο το προτεινόμενο προϊόν περιέχει φυσικά συστατικά που του προσδίδουν αντιγηραντικές ιδιότητες και άρα προστιθέμενη αξία. Τέλος, το πιο συγκρίσιμο προϊόν προέρχεται από την La Roche Posay. Εδώ οι διαφορές μεταξύ των προϊόντων είναι μικρές, αν εξαιρεθεί η στόχευση του προτεινόμενου προϊόντος σε πιο ώριμες επιδερμίδες.

Από την εικόνα των ανταγωνιστικών προϊόντων εξάγεται το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν πολλά προϊόντα που να μπορούν να προσφέρουν τα πλεονεκτήματα του υπό εξέταση καθαριστικού σε συγκρίσιμες τιμές και μία επένδυση από την Arivita για την ανάπτυξή του θα μπορούσε να αποδειχθεί επιτυχημένη.

VI. Ανάλυση SWOT

Τα παραπάνω συμπεράσματα συνοψίζονται σε ένα πίνακα SWOT. Η ανάλυση με SWOT (Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats) είναι ένα σημαντικό βήμα πριν από οποιαδήποτε

επιχειρηματική κίνηση, που δίνει μία εικόνα των ενδοεταιρικών αλλά και των εξωτερικών παραγόντων που μπορεί να συμβάλλουν ή να παρεμποδίσουν τη νέα αυτή επένδυση.

Πίνακας 12: Ανάλυση SWOT για την ανάπτυξη προϊόντος καθαρισμού προσώπου από εκχυλίσματα φύλλων *Vitis vinifera*.

	Επιβλητικοί παράγοντες	Ανασταλτικοί παράγοντες
Εσωτερικό περιβάλλον	<p><u>Δυνατά σημεία (Strengths)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Τα εκχυλίσματα των φύλλων <i>Vitis vinifera</i> είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Το νέο προϊόν μπορεί να ενσωματωθεί σε ήδη υπάρχουσες σειρές προϊόντων, αγαπητές από το αγοραστικό κοινό. Η Arivita είναι μία ελληνική επιχείρηση με περιβαλλοντική συνείδηση, υψηλό ποσοστό φυσικότητας και υψηλές προδιαγραφές ποιότητας για τα προϊόντα της. Η Arivita διαθέτει τις εγκαταστάσεις, το ανθρώπινο δυναμικό, τους προμηθευτές, τα κατάλληλα κανάλια διανομής και τα μέσα προώθησης ώστε να στηρίξει ένα νέο προϊόν. 	<p><u>Αδυναμίες (Weaknesses)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Η προμήθεια, φύλαξη και επεξεργασία των φύλλων <i>Vitis vinifera</i> είναι διαδικασίες που απαιτούν τεχνογνωσία, προσοχή και μπορούν να αποδειχθούν πολυέξοδες.
Εξωτερικό περιβάλλον	<p><u>Ευκαιρίες (Opportunities)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Η παγκόσμια αγορά δερμοκαλλυντικών γνωρίζει μία ταχεία ανάπτυξη, η οποία δεν προβλέπεται να ανακοπεί στο άμεσο μέλλον. Οι ρυθμοί της καθημερινότητας και στροφή προς το self care έχουν φέρει την αντιγήρανση και την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες στο προσκήνιο και η καταπολέμηση των παραπάνω αφορά πλέον άτομα και νεαρότερων ηλικιών. Η αγορά δε διαθέτει προϊόντα με τις ιδιότητες του προτεινόμενου δερμοκαλλυντικού. 	<p><u>Απειλές (Threats)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Η αγορά διαθέτει ήδη αρκετά προϊόντα καθαρισμού, οπότε η προώθηση ενός νέου πρέπει να γίνει με στρατηγική που να εστιάζει στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του. Η Arivita είναι ένα brand με μεγάλη απήχηση στην ελληνική αγορά, ωστόσο σε πολλές χώρες του εξωτερικού δεν έχει ακόμη προλάβει να εδραιωθεί. Οι τρέχουσες συνθήκες στην παγκόσμια οικονομία δεν είναι πολύ ευνοϊκές.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Τα φύλλα *Vitis vinifera* είναι μία πρώτη ύλη πλούσια σε αντιοξειδωτικές ουσίες (φαινολικά, φλαβονοειδή κ.α.) η οποία συχνά μένει αναξιοποίητη.
- Η πρώτη ύλη εξετάστηκε και πληροί τις προδιαγραφές για την παρασκευή εκχυλισμάτων.
- Η αιθανόλη είναι ένας αποτελεσματικός διαλύτης για την εκχύλιση του φυτικού ιστού.
- Η διαβροχή αποδείχθη να είναι η καλύτερη τεχνική εκχύλισης για τα φύλλα *Vitis*, συγκρινόμενη με την εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE), έπειτα από *in vitro* τεστ και screening με Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας Υψηλής Απόδοσης και Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης. Μένει να γίνουν περαιτέρω εκτενείς μελέτες σε αυτά τα εκχυλίσματα με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων, για ταυτοποίηση των δραστικών τους ουσιών.
- Τα εκχυλίσματα φύλλων *Vitis* μπορούν να χρησιμοποιηθούν από μία εταιρία όπως η APIVITA SA ως πρώτη ύλη για την ανάπτυξη προϊόντος καθαρισμού προσώπου με αντιγηραντικές ιδιότητες.
- Τόσο οι ανάγκες του καταναλωτικού κοινού, όσο και ο ανταγωνισμός επιτρέπουν την εδραίωση του προϊόντος αυτού στην αγορά.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bandameedi et al., 2018. High Performance Thin Layer Chromatography and Its Role Pharmaceutical Industry: Review. *Open Science Journal of Bioscience and Bioengineering*, 5 (3) 29-34.
- Bendicho et al., 2000. EXTRACTION | Ultrasound Extractions. *Encyclopedia of Separation Science*, 1448-1454.
- Beres et al., 2017. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*, (68) 581-594.
- Birben et al., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 9-19.
- Buchwald-Werner et al., 2009. Food for the Ageing Population. *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, 330-348.
- Cabrera, 2004. Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science*, 27(10-11), 843–852.
- Daane et al., 2018. Entomological opportunities and challenges for sustainable viticulture in a global market. *Annual Review of Entomology*. 2 (63), 193-214.
- Deliorman Orhan et al., 2009. Biological activities of *Vitis vinifera* L. leaves. *Tubitak*, 33, 341-348.
- Ferri et al., 2016. Recovery of polyphenols from red grape pomace and assessment of their antioxidant and anti-cholesterol activities. *New Biotechnology*, (33) 338-344.
- Fernandes et al., 2013. *Vitis vinifera* leaves towards bioactivity. *Industrial Crops and Products* 43, 434-440.
- Food and Agricultural Organization and International Organization of Vine and Wine (FAO-OIV), 2016. *FAO-OIV Focus 2016, Table and Dried Grapes*.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2016. *FAOSTAT Crop Information: Grapes*. FAO.
- Guerra-Rivas et al., 2016. Effects of grape pomace in growing lamb diets compared with vitamin E and grape seed extract on meat shelf life. *Meat Science*, (116) 221-229.
- Hernández-Ledesma et al., 2011. Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. Chapter 11 - Seed Components in Cancer Prevention, 101-109.
- <https://www.statista.com/statistics/254612/global-skin-care-market-size/>
- Katalinić et al., 2009. Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. *Croatian journal of food science and technology*, 1(2).

- Katalinić et al., 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, (119) 715-723.
- Kaur et al., 2009. Anticancer and Cancer Chemopreventive Potential of Grape Seed Extract and Other Grape-Based Products. *The Journal of Nutrition*, (139) 1806S–1812S.
- Mason et al., 1996. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3) 253-260.
- Mattivi et al., 2011. Profiling of Resveratrol Oligomers, Important Stress Metabolites, Accumulating in the Leaves of Hybrid *Vitis vinifera* (Merzling × Teroldego) Genotypes Infected with *Plasmopara viticola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5364–5375.
- Miller, 2009. Chromatography. *Digital Encyclopedia of Applied Physics*, 1059
- Naviglio et al., 2007. An innovative solid-liquid extraction technology: use of the naviglio extractor[®] for the production of lemon liquor. *African Journal of Food Science*, (1) 42-50.
- Pérez-Jiménez et al., 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41 (3) 274-285.
- Qing-Wen et al., 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, (13).
- Rózek et al., 2010. Use of commercial grape phenolic extracts to supplement solid foodstuff. *LWT - Food Science and Technology*, (43) 623-631.
- Uwe, 1997. *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*
- Venkitasamy et al., 2019. Grapes. *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products*, 133–163.
- Vergara et al., 2012. Stilbene Levels in Grape Cane of Different Cultivars in Southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 929–933.
- Wittenauer et al., 2015. Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*, (101) 179-187.
- Zhu et al., 2015. Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chemistry*, (186) 207-212.
- Αλβανός, 2013. Μελέτη αξιοποίησης αποβλήτων φυτικής προέλευσης για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.
- Καρκαλούσος et al., 2015. Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα.

