



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

*Μελέτη Τεχνικών Απομόνωσης και Αξιοποίησης Τοξινών από
Ξενικά Είδη Ιχθύων*

Συγγραφή:

Παναγιώτης Ι. Δήμου

Επίβλεψη:

Μαγδαληνή Κροκίδα, Καθηγήτρια ΕΜΠ

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2021

Στον πατέρα μου

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη των τεχνικών απομόνωσης και ταυτοποίησης τοξινών για τα ξενικά είδη ιχθύων *Lagocephalus sceleratus* και *Pterois miles*.

Πρωτίστως αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Μαγδαληνή Κροκίδα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή, για τη διαρκή καθοδήγησή της σε όλα τα στάδια της εργασίας καθώς και για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και καινοτόμο θέμα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Σοφία Παπαδάκη καθώς η συμβολή της στην αποπεράτωση της διπλωματικής ήταν κάτι παραπάνω από καταλυτική.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος την Υποψήφια Διδάκτορα Σοφία Πάππου για το χρόνο που αφιέρωσε αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε τόσο στο κομμάτι της ανατομίας των ιχθύων όσο και στις χρήσιμες συμβουλές και υποδείξεις καθ' όλη τη διάρκεια της εν λόγω διπλωματικής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος την Υποψήφια Διδάκτορα Μαργαρίτα Παναγιωτοπούλου για τις εξαιρετικά χρήσιμες υποδείξεις της στις τεχνικές ενθυλάκωσης αλλά και για την άμεση ανταπόκριση και βοήθεια που μου παρείχε σε όλα τα στάδια της εργασίας.

Θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στις Μεταδιδακτορικές Ερευνήτριες Βασιλική Οικονομοπούλου και Όλγα Σερίφη για τις ωραίες, χρήσιμες αλλά προπάντων γόνιμες συζητήσεις μας πάνω στον κλάδο του Χημικού Μηχανικού. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά καθένα εκ των μελών του Εργαστηρίου, που ήταν πάντα φιλικοί και πρόθυμοι να με βοηθήσουν σε οτιδήποτε προέκυπτε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον κύριο Μανώλη Μανδαλάκη, την κυρία Ειρήνη Καγιαμπάκη, την κυρία Θεοκλητεία Αναστασίου και το Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ) Κρήτης για τον χρόνο που μου προσέφεραν, για τις αναλύσεις που πραγματοποίησαν στο εργαστήριο τους αλλά και για την αποστολή δείγματος λαγοκέφαλου και λεοντόψαρου.

Τελειώνοντας τις σπουδές μου δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον πατέρα μου που από την πρώτη στιγμή που αποφάσισα να σπουδάσω για δεύτερη φορά ήταν πάντα δίπλα μου τόσο ψυχικά όσο και οικονομικά. Σαφέστατα όλη μου η οικογένεια στάθηκε δίπλα μου και με στήριξε οπότε την ευχαριστώ.

Τέλος δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω το φίλο μου Αντώνη, όπου μέσα από τις κοινές αγωνίες μας για τα θέματα της σχολής απέκτησα ένα πραγματικό φίλο αλλά και τη σύντροφό μου Αθηνά όπου μου συμπαραστέκεται σε όλα μου τα βήματα.

Σεπτέμβριος 2021

Σύνοψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη των τεχνικών απομόνωσης και ταυτοποίησης τοξινών για τα ξενικά είδη ιχθύων *Lagocephalus sceleratus* και *Pterois miles* (με κοινή ονομασία λαγοκέφαλος και λεοντόψαρο, αντίστοιχα). Στα πλαίσια αξιοποίησης της τοξίνης του λαγοκέφαλου έγινε προσπάθεια ενσωμάτωσής της σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας (όπως τα καλλυντικοτεχνικά προϊόντα) αφού προηγουμένως διερευνήθηκε η δυνατότητα ενθυλάκωσής της σε πολυμερική μήτρα μέσω της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού (electrospraying).

Τα είδη *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) και *Pterois miles* (Bennett, 1828) αποτελούν δύο εκ των σημαντικότερων χωροκατακτητικών ξενικών ειδών (ΧΞΕ) των Ελληνικών θαλασσών. Τα χωροκατακτητικά Λεσσεψιανά είδη, εκείνα δηλαδή που εισήλθαν στην Μεσόγειο και στα Ελληνικά ύδατα μέσω της διώρυγας του Σουέζ, έχουν αναπτύξει γρήγορα μεγάλους πληθυσμούς στην Ανατολική Μεσογειακή λεκάνη, ενώ παρουσιάζουν ολοένα αυξανόμενα σημάδια εξάπλωσης στην Κεντρική και Δυτική πλευρά. Ο *L.sceleratus* αποτελεί ένα από τα πιο τοξικά είδη στον πλανήτη, καθώς οι ιστοί του περιέχουν Τετραδοτοξίνη (TTX), μια νευροπαραλυτική τοξίνη που μπορεί να προκαλέσει τον θάνατο σε περίπτωση κατανάλωσης. Για το λόγο αυτό έχει απαγορευθεί η εμπορία και διάθεση του σε ολόκληρη την Ευρωπαϊκή Ένωση. Σε πολλές περιοχές της Α. Μεσογείου και του Ν. Αιγαίου οι τυχαίες συλλήψεις του είδους αποτελούν συχνά μεγάλο ποσοστό του βάρους της ψαριάς, ιδιαίτερα στην παράκτια αλιεία. Όσον αφορά το λεοντόψαρο *P.miles* παρότι δεν αποτελεί άμεσο κίνδυνο για την ανθρώπινη ζωή, το συγκεκριμένο είδος είναι επίσης δηλητηριώδες και προκαλεί ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων συμπεριλαμβανομένου του δυνατού πόνου όταν το δηλητηριό του εγχυθεί μέσω των σκληρών ακανθών των πτερυγίων του.

Η άνοδος της θερμοκρασίας της Μεσογείου λόγω της κλιματικής αλλαγής ευνοεί την εξάπλωση των λεσσεψιανών εισβολέων. Με την εμπορική αξία και τις δυνατότητες εκμετάλλευσής τους να παραμένουν μηδενικές, χωροκατακτητικά είδη όπως ο λαγοκέφαλος και εν συνεχεία το λεοντόψαρο αποτελούν επιβαρυντικούς παράγοντες για την Ελληνική αλιεία. Η εξεύρεση καινοτόμων μεθόδων για την οικονομική αξιοποίησή τους αποτελεί βασική προϋπόθεση αφενός ώστε να δημιουργηθούν κίνητρα ως προς την στοχευμένη αλιεύσή τους και αφετέρου ώστε να επιτευχθεί ο περιορισμός των πληθυσμών τους στις Ελληνικές θάλασσες.

Όσον αφορά το λεοντόψαρο *P.miles* έγινε προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησης του δηλητηρίου που περιέχεται στις ακάνθες του. Για το λόγο αυτό μελετήθηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα. Το πρώτο πρωτόκολλο αφορούσε την παραλαβή του δηλητηρίου από τα αγκάθια και τους ιστούς της εξωτερικής επιφάνειας και της βάσης του λεοντόψαρου μέσω εκχύλισης με χρήση υπερήχων (Δείγμα Α, Δείγμα Β), ενώ το δεύτερο πρωτόκολλο μελετούσε την παραλαβή του δηλητηρίου από τα αγκάθια του λεοντόψαρου μέσω εκχύλισης υπερήχων-μικροκυμάτων (Δείγμα C). Στην περίπτωση του δείγματος C το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στόχευε κυρίως στην απομόνωση της καθαρής φωσφολιπάσης A₂, η οποία ευθύνεται κατά κύριο λόγο για τη βιολογική δράση του δηλητηρίου. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός συγκέντρωσης

της συνολικής πρωτεΐνης (για τα δείγματα A,B,C) που περιέχεται στις ακάνθες του λεοντόψαρου με χρήση του εξειδικευμένου Pierce BCA Protein Assay Kit με τα αποτελέσματα να δείχνουν ότι η μεγαλύτερη ποσότητα ήταν αυτή του δείγματος B ($6062 \frac{\mu\text{g πρωτεΐνης}}{\text{g ακάνθων}}$), ακολουθούμενη από αυτή του δείγματος A ($760 \frac{\mu\text{g πρωτεΐνης}}{\text{g ακάνθων}}$) και την αντίστοιχη του δείγματος C ($372 \frac{\mu\text{g πρωτεΐνης}}{\text{g ακάνθων}}$). Στο επόμενο βήμα πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών μέσω της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης σε gel πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) με σκοπό τόσο το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος όσο και τον ποιοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών ειδών. Μετά την ηλεκτροφόρηση το gel χρωματίστηκε με ιόντα αργύρου (silver staining) έτσι ώστε να διακρίνονται ευκολότερα οι προκύπτουσες μπάντες των πρωτεϊνών (γραμμές 2-7). Στο δείγμα C παρατηρήθηκε μία μόνο μπάντα γύρω στα 76 kDa (γραμμές 6,7), ενώ οι γραμμές 2 και 3 που αντιστοιχούν στα εκχυλίσματα των ιστών από τη βάση των αγκαθιών (Δείγμα B) εμφανίστηκαν πολλαπλές μπάντες με πολλά διαφορετικά μοριακά βάρη, γεγονός που υποδηλώνει το πλήθος των πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών που υπήρχαν σε αυτό το δείγμα. Τέλος, στις γραμμές 3 και 4 που αντιστοιχούν στα εκχυλίσματα από τις ακάνθες του λεοντόψαρου (Δείγμα A) εμφανίστηκαν περίπου 9 διαφορετικές μπάντες, με πολύ πιο έντονη αυτή στα 77.5 kDa.

Σχετικά με το λαγοκέφαλο *L.scleratus*, αρχικά προσδιορίστηκε η TTX από το μυϊκό ιστό και τα όργανα του ψαριού (νεφρά, χολή, έντερα, ωθήκες) με χρήση υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1 % *v/v* και μεθανολικού διαλύματος οξικού οξέος 1 % *v/v*. Οι ηλικίες λαγοκέφαλου που μελετήθηκαν ήταν δύο (2) και τα επιμέρους δείγματα οκτώ (8). Η συγκέντρωση TTX προέκυψε έπειτα από την ανάλυση των δειγμάτων με γρήγη χρωματογραφία με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS). Καταλληλότερος διαλύτης για τη διεργασία της εκχύλισης αποδείχτηκε το υδατικό διάλυμα οξικού οξέος, ενώ τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο εκχύλισμα την εμφάνισε το δείγμα 6 ($0.782 \frac{\mu\text{g TTX}}{\text{mL δ/τος}}$) όπου προερχόταν από τα όργανα του θηλυκού λαγοκέφαλου. Μετά την απομόνωση της TTX από το *L.scleratus*, επόμενος στόχος της εν λόγω διπλωματικής αποτέλεσε η προσπάθεια ενθυλάκωσης της τοξίνης αυτής με σκοπό την αξιοποίησή της σε καλλυντικοτεχνικά προϊόντα (καλλυντικές κρέμες). Η μελέτη εγκλεισμού έγινε με χρήση της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού (electrospraying) και η πολυμερική μήτρα που χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό ήταν η ζεΐνη. Οι νιφάδες ζεΐνης διαλύθηκαν σε ένα διάλυμα αιθανόλης/νερού (70 % EtOH, 30 % H₂O) όπου μέσα σε αυτό προστέθηκε η εκχυλισμένη τετραδοτοξίνη συγκέντρωσης $0.782 \frac{\mu\text{g TTX}}{\text{mL δ/τος}}$ με την αναλογία μεταξύ τοξίνης-πολυμερικής μήτρας να είναι 1:12. Όσον αφορά τη διεργασία του ηλεκτροστατικού ψεκασμού τα βέλτιστα αποτελέσματα προέκυψαν όταν η επιφάνεια του συλλέκτη τοποθετήθηκε 13 έως 15 cm από το τριχοειδές άκρο, η ογκομετρική παροχή της θέσης 1 κυμαινόταν μεταξύ 200 και 300 $\frac{\mu\text{L}}{\text{h}}$ και η τάση κυμαινόταν από 25 έως 27 kV. Η ογκομετρική παροχή του οξικού οξέος (θέση 2) ήταν σταθερή στα 100 $\frac{\mu\text{L}}{\text{h}}$. Ο χαρακτηρισμός του τελικού προϊόντος ενθυλάκωσης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μεθόδων Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης όπως της Φασματοσκοπίας Εξασθениσμένης Ολικής Ανάκλασης Υπερύθρου (ATR-FTIR), της

Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC), της Μικροσκοπία Ηλεκτρονικής Σάρωσης (SEM), της Ανάλυσης Μεγέθους Σωματιδίων (Particle Size Distribution) και της Υγρής Χρωματογραφίας-Φασματομετρία Μάζας (LC-MS). Τα αποτελέσματα από το ATR-FTIR υπέδειξαν όλες τις αναμενόμενες κορυφές τόσο για τη ζεΐνη όσο και για την TTX. Οι μετρήσεις θερμικής συμπεριφοράς του DSC έδειξαν ότι η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης T_g της ζεΐνης είναι ίση με 144 °C, ενώ στο ενθυλακωμένο προϊόν 138 °C. Κατόπιν επεξεργασίας των εικόνων που προέκυψαν από το SEM βρέθηκε ότι η μέση διάμετρος των σωματιδίων ήταν 540 ± 53 nm, η οποία είναι σε πλήρη συμφωνία με την κατανομή μεγέθους σωματιδίων (μέση διάμετρος 473 nm). Τέλος η απόδοση εγκλεισμού υπολογίστηκε ίση με 90%.

Η ανάπτυξη και μικροβιολογική ανάλυση καλλυντικών κρεμών έγινε στα πλαίσια διερεύνησης της επίδρασης προσθήκης της εγκλεισμένης TTX ως πρόσθετο συστατικό σε τυπική φόρμουλα καλλυντικών κρεμών με σκοπό την υποκατάσταση του συνθετικού μπότοξ με την TTX του λαγοκέφαλου. Για το σκοπό αυτό έγινε προσπάθεια ενσωμάτωσης των σωματιδίων (με την εγκλεισμένη TTX από τη διεργασία του electrospraying) σε καλλυντική κρέμα βάσης χωρίς πρόσθετα. Για τις ανάγκες του πειράματος αναλύθηκαν δύο ειδών κρέμας: η κρέμα βάση και η κρέμα βάση με τα εγκλεισμένα σωματίδια ζεΐνης που περιέχουν TTX. Για τους σκοπούς της μικροβιολογικής ανάλυσης το υλικό διαχωρίστηκε σε 24 (3x8) μέρη (βαζάκια όγκου 20 mL). Από αυτά τα 12 περιείχαν την κρέμα βάση και τα υπόλοιπα 12 την κρέμα με το εγκλεισμένο υλικό. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες 4, 25 και 45 °C και αναλύθηκαν έπειτα από 15, 30 και 45 ημέρες αντίστοιχα.

Τα δείγματα σε όλες τις θερμοκρασίες και χρόνους αποθήκευσης, αναλύθηκαν μικροβιολογικά (ολικό μικροβιακό φορτίο, ζύμες/μούχλες και *E.coli*) και διαπιστώθηκε ότι πληρούν όλα τα πρότυπα υγιεινής και ασφάλειας. Επίσης, σε κάθε εξεταζόμενο δείγμα μετρήθηκε το pH (διακύμανση από 6.14-7.35), το χρώμα και η ρεολογία των κρεμών. Η μελέτη της ρεολογίας πραγματοποιήθηκε μέσω πειραμάτων ρεολογικών δοκιμών ταλάντωσης (δοκιμές σάρωσης συχνότητας) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της Δυναμικής Μηχανικής Ανάλυσης (DMA). Μέσω του DMA αξιολογήθηκαν οι μεταβολές του συντελεστή αποθήκευσης (G'), του συντελεστή απώλειας (G'') και του σύνθετου ιξώδους (η^*) και διαπιστώθηκε ότι όλες οι κρέμες (ανεξαρτήτως συνθηκών) διατηρούν όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά που καθιστούν μια καλλυντική κρέμα αποδεκτή για χρήση.

Extended Abstract

In the present diploma thesis was studied the isolation and identification techniques of toxins for the alien species *Lagocephalus sceleratus* and *Pterois miles* (commonly known as silver-cheeked toadfish and lionfish, respectively). In the context of the utilization of *L.sceleratus*'s toxin, an attempt was made to integrate it into high value-added products (such as cosmetics). Before that it had been investigated the possibility of encapsulating the fish's toxin in a polymeric matrix via electrohydrodynamic process (electrospraying).

The species *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) and *Pterois miles* (Bennett, 1828) are two of the most important invasive alien species of the Greek sea. The invasive Lessepsian species, i.e those that have entered the Mediterranean and Greek waters through the Suez Canal, have rapidly developed large populations in the Eastern Mediterranean basin, while they are showing increasing signs of spreadability in the central and western part. *L.sceleratus* is one of the most toxic species on the planet, as its tissue contain Tetrodotoxin (TTX), a neuroparalytic toxin that can cause death in case of consumption. For this reason, its marketing and distribution throughout the European Union has been banned. In many areas of the Eastern Mediterranean and South Aegean, accidental catches of the species often constitute a large percentage of the weight of the fish, especially in coastal fishing. As for the lionfish *P.miles*, despite the fact that does not consist an immediate danger to human life, this specie is also venomous and causes a wide range of symptoms including severe pain especially when its venom is injected through the hard thorns of its fins.

The rise in temperature of the Mediterranean Sea due to the climate change favors the spread of the Lessepsian invaders. With zero commercial value and exploitation opportunities, invasive species such as the silver-cheeked toadfish and then the lionfish are aggravating factors for Greek fishery. On the one hand finding innovative methods for their economic exploitation is a basic condition in order to create incentives for targeting fishing and on the other hand in order to achieve the limitation of their populations in the Greek sea.

Regarding the lionfish *P.miles*, an attempt was made in order to isolate and identify the venom which is contained in its thorns. For this reason, two different protocols were studied. The first protocol has to do with the uptake of venom from the thorns and tissue of the outer surface and base of the lionfish via ultrasonic extraction (Sample A, Sample B), while the second protocol studied the uptake of venom from the lionfish thorns via ultrasound-microwave extraction (Sample C). In the case of sample C, the protocol which was used was mainly aimed at isolating pure Phospholipase A2 (mainly responsible for the biological action of the poison). The concentration of total protein (for samples A, B, C) contained in fish thorns was then determined using the specialized Pierce BCA protein analysis kit with the results showing that the largest amount was that of sample B ($6062 \frac{\mu\text{g protein}}{\text{g thorns}}$), followed by sample A ($760 \frac{\mu\text{g protein}}{\text{g thorns}}$) and that of sample C ($372 \frac{\mu\text{g protein}}{\text{g thorns}}$). In the next step, the proteins were separated via polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) technique in order to separate them

according to their molecular weight. After electrophoresis the gel was stained with silver ions so that the resulting protein bands could be easily distinguished (lines 2-7). In sample C only one band of about 76 kDa was observed (lines 6,7), while lines 2 and 3 (Sample B) showed multiple bands with many different molecular weights, indicating the number of different proteins present in this sample. Finally, in lines 3 and 4, which correspond the extracts from the lion's thorns (Sample A), 9 different bands appeared, with the much more intense at 77.5 kDa.

Regarding the silver-cheeked toadfish, TTX was initially determined from muscle tissue and fish organs (kidneys, bile, intestines, ovaries) using 0.1% aqueous acetic acid solution and 1% v/v methanolic acetic acid solution. The ages of *L. sceleratus* which were investigated were two (2) and the total samples were eight (8). TTX concentration was obtained after analysis of the samples by liquid chromatography with twin mass spectrometry (LC-MS / MS). The aqueous solution of acetic acid proved to be the most suitable solvent for the extraction process, while the highest concentration in the extract was found in sample 6 ($0.782 \frac{\mu\text{g TTX}}{\text{mL solution}}$), where it came from the organs of the female silver-cheeked toadfish. After the isolation of TTX from *L. sceleratus*, the next goal of this diploma thesis was the encapsulation of this toxin in order to use it in cosmetic creams. The inclusion study was performed using the electrohydrodynamic process of electrospraying and the polymeric matrix used for this purpose was zein. The zein flakes were firstly dissolved in an ethanol / water solution (70 % EtOH, 30 % H_2O) and then into the solution was added the extracted tetrodotoxin at a concentration of $0.782 \frac{\mu\text{g TTX}}{\text{mL solution}}$ with a toxin-polymeric matrix ratio of 1:12. Regarding the electrostatic spraying process the best results were obtained when the collector surface was placed 13 to 15 cm from the capillary end, the volumetric flow of position 1 ranged between 200 and 300 $\mu\text{L} / \text{h}$ and the voltage ranged from 25 to 27 kV. The volumetric flow rate of acetic acid (position 2) was constant at 100 $\mu\text{L} / \text{h}$. The characterization of the final encapsulation product was performed using Instrumental Chemical Analysis methods such as Attenuated Total Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Particle Scanning Electron Microscopy (SEM) Chromatography-Mass Spectrometry, Particle Size Distribution and Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) for the determination of encapsulation efficiency. The results from the ATR-FTIR indicated all the expected peaks for both zein and TTX. The thermal conductivity measurements of DSC showed that the glass transition temperature of zein was 144 °C, while in the encapsulated product 138 °C. After processing the images obtained from the SEM it was found that the average particle diameter was 540 ± 53 nm, which is in complete agreement with the particle size distribution (average diameter 473 nm). The encapsulation efficiency was calculated to be 90%.

The development and microbiological analysis of cosmetic creams was done in the context of investigating the effect of adding the encapsulated TTX as an additional ingredient in a standard cosmetic cream formula in order to replace the synthetic Botox with the TTX of *L. sceleratus*. For this purpose, an attempt was made in order to integrate the particles (with the enclosed TTX via the electrospraying process) into a cosmetic base cream without additives. For the needs of the experiment, two types of

cream were analyzed: the base cream and the base cream with the encapsulated zein particles containing TTX. For the purposes of microbiological analysis, the material was divided into 24 (3x8) parts (20 mL jars). Of these 12 contained the base cream and the remaining 12 the cream with the encapsulated material. The samples were stored at temperatures of 4, 25 and 45 °C and analyzed after 15, 30 and 45 days respectively.

The samples at all temperatures and storage times were microbiologically analyzed (total microbial load, yeasts/molds and *E. coli*) and found to satisfy all hygiene and safety standards. Moreover, it was measured the acidity of each test sample, ranging from 6.14-7.35, the color and rheology of the creams by performing rheological oscillation tests (frequency scan tests) using the Dynamic Mechanical Analysis (DMA) method. The DMA evaluated the changes in the storage factor (G'), the loss factor (G'') and the composite viscosity (h^*) and found that all creams (regardless of condition) retain all the characteristics that make a cosmetic cream acceptable for general use.

Πίνακας Περιεχομένων

Πρόλογος	ii
Σύνοψη.....	iii
Extended Abstract.....	vi
Πίνακας Περιεχομένων.....	ix
Περιεχόμενα Διαγραμμάτων.....	xii
Περιεχόμενα Πινάκων	xiv
Περιεχόμενα Εικόνων	xv
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	1
1.1 Αντικείμενο και Στόχοι	1
1.2 Τοποθέτηση διπλωματικής εργασίας – Επιμέρους στόχοι.....	2
1.3 Διάρθρωση διπλωματικής εργασίας.....	3
Κεφάλαιο 2: Θεωρητικό Μέρος.....	4
2.1 <i>Lagocerphalus sceleratus</i> (Gmelin, 1789)	5
2.1.1 Βιολογία του <i>L. sceleratus</i>	7
2.1.2 Τετραδοτοξίνη (TTX)	9
2.1.2.1 Προέλευση Τετραδοτοξίνης	9
2.2 <i>Pterois miles</i> (Bennett, 1828)	16
2.3 Επισκόπηση των Τεχνολογιών Ενθυλάκωσης.....	23
2.3.1 Εφαρμογές Ενθυλάκωσης στη Βιομηχανία Τροφίμων.....	24
2.3.2 Εφαρμογές Ενθυλάκωσης στη Βιομηχανία Φαρμάκων	25
2.3.3 Εφαρμογές Ενθυλάκωσης στη Βιομηχανία της Κοσμετολογίας.....	28
2.3.4 Τεχνικές Μίκρο και Νάνο-Ενθυλάκωσης.....	31
Κεφάλαιο 3: Πειραματική Διαδικασία	43
3.1 Υλικά (Α' ύλη, Αντιδραστήρια και Διαλύματα)	43
3.1.1 Εκχύλιση δηλητηρίου από τα αγκάθια του λεοντόψαρου <i>Pterois miles</i>	43
3.1.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης που περιέχεται στα αγκάθια του λεοντόψαρου <i>Pterois miles</i>	43
3.1.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών – Ηλεκτροφόρηση στα αγκάθια του λεοντόψαρου <i>Pterois miles</i>	43
3.1.4 Απομόνωση τετραδοτοξίνης από το μυϊκό ιστό και τα εσωτερικά όργανα του λαγοκέφαλου <i>L. Sceleratus</i>	43
3.1.5 Ενθυλάκωση της τετραδοτοξίνης από τον <i>L.sceleratus</i> σε πολυμερική μήτρα	44

3.1.6 Ανάπτυξη και μικροβιολογική ανάλυση καλλυντικών κρεμών (ανάμιξη κρέμας βάσης με το τελικό προϊόν ενθυλάκωσης από το electrospraying).....	44
3.2 Μεθοδολογική Προσέγγιση – Όργανα και συσκευές.....	44
3.2.1 Πρωτόκολλο παραλαβής του δηλητηρίου από τα αγκάθια και τους ιστούς της εξωτερικής επιφάνειας και της βάσης του λεοντόψαρου <i>P.miles</i> μέσω εκχύλισης με χρήση υπερήχων	46
3.2.2 Πρωτόκολλο παραλαβής του δηλητηρίου από τα αγκάθια του λεοντόψαρου <i>P.miles</i> μέσω εκχύλισης υπερήχων-μικροκυμάτων.....	47
3.2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης από τις ακάνθες του λεοντόψαρου <i>Pterois miles</i>	49
3.2.4 Διαχωρισμός πρωτεϊνών – Ηλεκτροφόρηση των ακάνθων του λεοντόψαρου <i>Pterois miles</i>	53
3.2.5 Πρωτόκολλο παραλαβής Τετραδοτοξίνης από το μυϊκό ιστό και τα εσωτερικά όργανα του λαγοκέφαλου <i>L. sceleratus</i>	56
3.2.6 Ενθυλάκωση της Τετραδοτοξίνης του <i>L.sceleratus</i> σε μήτρα ζεΐνης μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού	59
3.2.7 Ανάπτυξη καλλυντικών κρεμών – Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός και μελέτη διατηρησιμότητας	70
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα	79
4.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης από τις ακάνθες του <i>Pterois miles</i>	79
4.2 Διαχωρισμός πρωτεϊνών από τις ακάνθες του <i>Pterois miles</i>	82
4.3 Προσδιορισμός τετραδοτοξίνης από το μυϊκό ιστό και τα εσωτερικά όργανα του <i>Lagocephalus sceleratus</i>	85
4.4 Χαρακτηρισμός τελικών προϊόντων ενθυλάκωσης.....	87
4.4.1 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ TTX (υλικό προς εγκλεισμό) και ζεΐνης (υλικό μήτρας) των τελικών σωματιδίων μέσω ATR-FTIR.	87
4.4.2 Θερμική συμπεριφορά των σωματιδίων με χρήση DSC	89
4.4.3 Εξέταση της μορφολογίας των προϊόντων ηλεκτροστατικού ψεκασμού με χρήση SEM.....	91
4.4.4 Κατανομή μεγέθους σωματιδίων (Particle Size Distribution).....	92
4.4.5 Απόδοση Εγκλεισμού	93
4.5 Χαρακτηρισμός καλλυντικών κρεμών.....	94
4.5.1 Μικροβιολογική ανάλυση.....	94
4.5.2 Μέτρηση pH	96
4.5.3 Μέτρηση Χρώματος	98
4.6. Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA)	101
Κεφάλαιο 5: Σύνοψη – Συμπεράσματα – Μελλοντική Έρευνα	107

Βιβλιογραφία 111

Περιεχόμενα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Καμπύλη βαθμονόμησης η οποία συσχετίζει τη συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) με τις αντίστοιχες απορροφήσεις τους.	79
Διάγραμμα 2. Σύγκριση διαλυτών για τη μικρότερη ηλικία δείγματος λαγοκέφαλου.	86
Διάγραμμα 3. Σύγκριση διαλυτών για τη μεγαλύτερη ηλικία δείγματος λαγοκέφαλου.	86
Διάγραμμα 4. Φάσμα ATR-FTIR ζεΐνης (δείγμα σε μορφή σωματιδίων).	87
Διάγραμμα 5. Φάσμα ATR-FTIR τετραδοτοξίνης (δείγμα σε υγρή μορφή).	88
Διάγραμμα 6. Φάσμα ATR-FTIR εγκλεισμένης τετραδοτοξίνης σε μήτρα ζεΐνης (δείγμα σε μορφή σωματιδίων).	88
Διάγραμμα 7. Θερμογράφημα DSC (2 ^{ος} κύκλος θέρμανσης) ζεΐνης.	89
Διάγραμμα 8. Θερμογράφημα DSC (2 ^{ος} κύκλος θέρμανσης) ενθυλακωμένης TTX με μήτρα ζεΐνης.	90
Διάγραμμα 9. Θερμογραφήματα DSC (1ος κύκλος θέρμανσης) ζεΐνης και ενθυλακωμένης TTX με μήτρα ζεΐνης.	90
Διάγραμμα 10. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων για τα σωματίδια με την εγκλεισμένη TTX σε μήτρα ζεΐνης (non-solvent: αιθανόλη).	92
Διάγραμμα 11. Διάγραμμα pH συναρτήσει του χρόνου για θερμοκρασία αποθήκευσης 4°C.	96
Διάγραμμα 12. Διάγραμμα pH συναρτήσει του χρόνου για θερμοκρασία αποθήκευσης 25°C.	97
Διάγραμμα 13. Διάγραμμα pH συναρτήσει του χρόνου για θερμοκρασία αποθήκευσης 45°C.	97
Διάγραμμα 14. Μεταβολή της φωτεινότητας συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για κάθε θερμοκρασία.	99
Διάγραμμα 15. Μεταβολή κόκκινου-πράσινου χρώματος συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για κάθε θερμοκρασία.	100
Διάγραμμα 16. Μεταβολή μπλε-κίτρινου χρώματος συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για κάθε θερμοκρασία.	100
Διάγραμμα 17. Μεταβολή χρώματος συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για κάθε θερμοκρασία.	101
Διάγραμμα 18. Αναπαράσταση G' , G'' , και η^* συναρτήσει της γωνιακής συχνότητας κάτω υπό σταθερή συχνότητα $\gamma = 0.1\%$ για το δείγμα C στο χρόνο μηδέν.	102
Διάγραμμα 19. Αναπαράσταση G' , G'' , και η^* συναρτήσει της γωνιακής συχνότητας κάτω υπό σταθερή συχνότητα $\gamma = 0.1\%$ για το δείγμα E στο χρόνο μηδέν.	102
Διάγραμμα 20. Μεταβολή του σύνθετου ιξώδους σε όλο το εύρος συχνοτήτων (ω) υπό σταθερό $\gamma=0.1\%$ για τη κρέμα βάση (C) για τη θερμοκρασία των 4 °C.	104
Διάγραμμα 21. Μεταβολή του σύνθετου ιξώδους σε όλο το εύρος συχνοτήτων (ω) υπό σταθερό $\gamma=0.1\%$ για τη κρέμα βάση (C) για τη θερμοκρασία των 25 °C.	104
Διάγραμμα 22. Μεταβολή του σύνθετου ιξώδους σε όλο το εύρος συχνοτήτων (ω) υπό σταθερό $\gamma=0.1\%$ για τη κρέμα βάση (C) για τη θερμοκρασία των 45 °C.	105

Διάγραμμα 23. Μεταβολή του σύνθετου ιξώδους σε όλο το εύρος συχνοτήτων (ω) υπό σταθερό $\gamma=0.1\%$ για τη κρέμα βάση με την ενθυλακωμένη τοξίνη (E) για τη θερμοκρασία των 4 °C.	105
Διάγραμμα 24. Μεταβολή του σύνθετου ιξώδους σε όλο το εύρος συχνοτήτων (ω) υπό σταθερό $\gamma=0.1\%$ για τη κρέμα βάση με την ενθυλακωμένη τοξίνη (E) για τη θερμοκρασία των 25 °C.	106
Διάγραμμα 25. Μεταβολή του σύνθετου ιξώδους σε όλο το εύρος συχνοτήτων (ω) υπό σταθερό $\gamma=0.1\%$ για τη κρέμα βάση με την ενθυλακωμένη τοξίνη (E) για τη θερμοκρασία των 45 °C.	106

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1. Μέγιστες συγκεντρώσεις TTX και των διαφόρων φυσικών παραγώγων της έναντι των VGSC [29].	12
Πίνακας 2. Διερεύνηση σχετικά με τις κυριότερες παραμέτρους που έλαβαν χώρα κατά την ενθυλάκωση της TTX σε μήτρα ζεΐνης.	64
Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις των δειγμάτων A,B,C που προέκυψαν με βάση τις τιμές των απορροφήσεων των διαλυμάτων A,B,C.	80
Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά των δύο δειγμάτων από λαγοκέφαλο που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες του πειράματος.	85
Πίνακας 5. Συγκέντρωση TTX των δειγμάτων (1-8) του <i>L.scleratus</i> .	85
Πίνακας 6. Μέση διάμετρος και κατανομή dx^* των σωματιδίων με την ενθυλακωμένη ουσία.	93
Πίνακας 7. Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης για τα δύο είδη κρέμας στους 4°C, 25°C και 45°C για διάστημα 15 ημερών μετά το χρόνο μηδέν.	94
Πίνακας 8. Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης για τα δύο είδη κρέμας στους 4°C, 25°C και 45°C για διάστημα 30 ημερών μετά το χρόνο μηδέν.	95
Πίνακας 9. Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης για τα δύο είδη κρέμας στους 4°C, 25°C και 45°C για διάστημα 45 ημερών μετά το χρόνο μηδέν.	95
Πίνακας 10. Μετρήσεις pH που πραγματοποιήθηκαν για τα δύο είδη κρέμας για όλες τις θερμοκρασίες (4°C, 25°C, 45°C) και χρόνους αποθήκευσης (0,15,30,45 days).....	96
Πίνακας 11. Μετρήσεις (L,a,b,) για όλες τις θερμοκρασίες (4°C, 25°C, 45°C) και χρόνους αποθήκευσης (0,15,30,45 days).....	98
Πίνακας 12. Τιμές G'_{0} και G''_{0} για όλα τα εξεταζόμενα δείγματα και για γωνιακή συχνότητα 0.1 rad/s.....	103

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1. Χάρτης της Μεσόγειου θάλασσας [8].	5
Εικόνα 2. Χωροχρονική κατανομή του <i>Lagocephalus sceleratus</i> στην ευρύτερη περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου μέχρι το έτος 2013 [12].	6
Εικόνα 3. Χωροχρονική κατανομή του <i>Lagocephalus sceleratus</i> στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου μέχρι το έτος 2018 [13].	6
Εικόνα 4. Απεικόνιση του <i>L.sceleratus</i> .	7
Εικόνα 5. Απεικόνιση του <i>L.sceleratus</i> όταν διαισθάνεται κίνδυνο.	8
Εικόνα 6. Απεικόνιση της ισχυρής οδοντοστοιχίας του <i>L.sceleratus</i> .	8
Εικόνα 7. Μοριακή δομή της Τετραδοτοξίνης στο χώρο [21].	10
Εικόνα 8. Δομή των VGSC [25].	11
Εικόνα 9. Παράγωγα της Τετροδοτοξίνης όπου δοκιμάστηκαν στα κανάλια NaV1.1-1.7.	12
Εικόνα 10. Ωριμες ωοθήκες του <i>L. Sceleratus</i> [5].	15
Εικόνα 11. Χάρτης των Ευρωπαϊκών περιοχών και υποπεριοχών της Οδηγίας Πλαίσιο για τη Θαλάσσια Στρατηγική (Marine Strategy Framework Directive (MFSD) [40].	16
Εικόνα 12. Χάρτης χωρικής κατανομής του <i>P.Miles</i> με βάση τις 668 αναφορές σχετικά με την ύπαρξη του που δημοσιεύθηκαν στην επιστημονική βιβλιογραφία και το πρόγραμμα RELIONMED (10/2012 – 07/2018) [41].	17
Εικόνα 13. Απεικόνιση του <i>P.miles</i>	18
Εικόνα 14. Απεικόνιση των ακάνθων και των ακτινών του <i>P.miles</i> [42].	18
Εικόνα 15. Τοποθεσίες δράσης των φωσφολιπασών στα γλυκεροφωσφολιπίδια.	22
Εικόνα 16. Παράδειγμα ενθυλάκωσης [55].	23
Εικόνα 17. Απεικόνιση μικροσφαιριδίων και μικροκαψουλών [60].	26
Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση (τομή) του ανθρώπινου δέρματος [67].	29
Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου τούβλου και κονιάματος της κεράτινης στιβάδας [69].	30
Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση των δύο ειδών διείσδυσης μέσω της κεράτινης στιβάδας [71].	31
Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση της βασικής διεργασίας ξήρανσης με ψεκασμό [55].	32
Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση διάταξης ξήρανσης υπό κατάψυξη [75].	33
Εικόνα 23. Σχηματική αναπαράσταση μιας διάταξης electrospinning [76].	34
Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση μιας διάταξης electrospraying [84].	36
Εικόνα 25. Παράμετροι που επηρεάζουν τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό.	37
Εικόνα 26. Αναπαράσταση των 4 διαφορετικών περιπτώσεων περιπλοκής που λαμβάνονται για τις διάφορες συγκεντρώσεις πολυμερούς [88].	39
Εικόνα 27. Πειραματική διαδικασία για το ξενικό είδος ψαριού <i>Pterois miles</i> .	45
Εικόνα 28. Πειραματική διαδικασία για το ξενικό είδος ψαριού <i>Lagocephalus sceleratus</i> .	45
Εικόνα 29. Συσκευή υπερήχων (Hielscher UP 100H).	46
Εικόνα 30. Ανάμιξη 10 g ακάνθων του λειοντόψαρου <i>P.miles</i> με 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 10 mM (pH 7.0) που περιέχει 1 mM <i>CaCl2</i> .	48
Εικόνα 31. Σύστημα αντίδρασης υπερήχων-μικροκυμάτων (Ultrasonic microwave reaction system) της εταιρίας Nanjing Xianou Instruments Manufacture Co., Ltd.	48

Εικόνα 32. Θεικό Αμμώνιο.....	48
Εικόνα 33. Συμβατό αντιδραστήριο ακριβείας για τη μέτρηση της συνολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης έναντι προτύπου πρωτεΐνης (Pierce BCA Protein Assay Kit).	49
Εικόνα 34. Διάλυμα Bradford.....	50
Εικόνα 35. Εικόνες SEM φύλλων ελιάς έπειτα από συμβατική εκχύλιση (αριστερά) και εκχύλιση μέσω υπερήχων (δεξιά) [102].	52
Εικόνα 36. Θεικό Δωδεκύλιο Νάτριο ή Λαουροθειικό Νάτριο (<i>SDS, Sodium Dodecyl Sulfate</i>) [104].	53
Εικόνα 37. Διαδικασία ξεδίπλωσης της πρωτεϊνικής αλυσίδας με χρήση του SDS [105]......	54
Εικόνα 38. Αναπαράσταση της διεργασίας της ηλεκτροφόρησης με το <i>SDS-PAGE</i> . 55	
Εικόνα 39. Ομογενοποιητής (BagMixer, Interscience).	57
Εικόνα 40. Λουτρό υπερήχων (Witeg A22H Ultrasonic Bath) στο οποίο λαμβάνει χώρα η εκχύλιση του μυϊκού ιστού (διαυγές χρώμα) και των οργάνων (σκούρο χρώμα) του <i>L.scleratus</i>	57
Εικόνα 41. Διάταξη Electrospraying (BioInicia FLUIDNATEK LE-10) σε λειτουργία.	60
Εικόνα 42. Εξάρτημα της συσκευής του electrospraying. Πάνω δεξιά φαίνεται το μεταλλικό ακροφύσιο από όπου λαμβάνει χώρα ο ψεκασμός.....	60
Εικόνα 43. Οθόνης ρύθμισης του ρυθμού ροής των 2 τροφοδοσιών (3 ^ο σύμβολο στα δεξιά της εικόνας) και της εφαρμοζόμενης τάσης (2 ^ο σύμβολο που έχει ένα κεραυνό).	61
Εικόνα 44. Σχηματιζόμενος κόνος Taylor κατά τη διάρκεια του electrospraying.	62
Εικόνα 45. Ευδιάκριτος κύκλος από μικροσφαιρίδια χωρίς την παρουσία υδροσταγονιδίων.....	63
Εικόνα 46. Εμφανής ασυνέχεια στο διάλυμα (διαχωρισμός της ζεΐνης με το εκχύλισμα τετραδοτοξίνης).	63
Εικόνα 47. Φασματοόμετρο υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT/IR-4200, JASCO International Co., Ltd., Tokyo, Japan) με προσαρτημένη μονάδα εξασθετισμένης ολικής ανάκλασης.	66
Εικόνα 48. Όργανο διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Pyris DSC-6 Perkin Elmer Ltd., Norwalk, USA).....	68
Εικόνα 49. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Quanta 200, FEI, Oregon, USA).69	
Εικόνα 50. Στα αριστερά φαίνεται η συσκευή επιχρύσωσης (<i>SC7620 Mini Sputter Coater</i>), ενώ στα δεξιά φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η συλλογή δείγματος μέσω των δειγματοφορέων πάνω στο αλουμινόχαρτο.	69
Εικόνα 51. Υδατική κρέμα βάσης.....	71
Εικόνα 52. Απαγωγός μικροβιολογίας (<i>NÜVE MN 090 Microbiological Safety Cabinet</i>).....	72
Εικόνα 53. Τρυβλία ελέγχου ολικού μικροβιακού φορτίου, ζυμών/μούχλας και <i>E.coli</i>	73
Εικόνα 54. TK 120 TEST CABINETS, Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş).	73
Εικόνα 55. Πεχάμετρο (MARTINI Instruments 180 Bench Meter).	74

Εικόνα 56. Χρωματόμετρο (MiniScan XE Hunter Associates Laboratory Inc, Reston, Virginia).....	75
Εικόνα 57. Κλίμακα Hunter (L,a,b) [114].	76
Εικόνα 58. Ροόμετρο (<i>Physica MCR 301 Anton Paar DMA analyzer</i>).....	78
Εικόνα 59. Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου έπειτα από χρωματισμό με Coomassie Blue.	82
Εικόνα 60. Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου έπειτα από χρωματισμό με ιόντα αργύρου.....	83
Εικόνα 61. Επεξεργασία του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης με το λογισμικό (<i>Quantity One, v4.6.3 Biorad</i>) με σκοπό τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών για τις προσδιοριζόμενες μπάντες πρωτεΐνης.	84
Εικόνα 62. Απεικόνιση των σωματιδίων που προέκυψαν μέσω της διεργασίας του electrospraying (συνθήκες λειτουργίας: ΑΣΑ 15 cm, ογκομετρική παροχή 300 μL/h, τάση 26 kV) με χρήση Μικροσκοπίας Ηλεκτρονικής Σάρωσης.	91

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Αντικείμενο και Στόχοι

Αντικείμενο της εν λόγω διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη των τεχνικών απομόνωσης και αξιοποίησης τοξινών από τα ξενικά είδη ιχθύων *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) και *Pterois miles* (Bennett, 1828). Τα παραπάνω είδη ιχθύων αποτελούν δύο εκ των σημαντικότερων χωροκατακτητικών ξενικών ειδών (ΧΞΕ) των Ελληνικών θαλασσών. Τα χωροκατακτητικά Λεσεψιανά είδη, δηλαδή εκείνα που εισήλθαν στην Μεσόγειο και στα Ελληνικά ύδατα μέσω της διώρυγας του Σουέζ, έχουν αναπτύξει γρήγορα μεγάλους πληθυσμούς στην Ανατολική Μεσόγειο και παρουσιάζουν ολοένα αυξανόμενα σημάδια εξάπλωσης τόσο στην Κεντρική όσο και Δυτική πλευρά αυτής. Το *L.sceleratus* αποτελεί ένα από τα πιο τοξικά είδη στον πλανήτη, καθώς οι ιστοί του περιέχουν Τετραδοτοξίνη (ΤΤΧ), μια νευροπαραλυτική τοξίνη που μπορεί να προκαλέσει τον θάνατο σε περίπτωση κατανάλωσης. Όσον αφορά το λεοντόψαρο *P.miles* παρότι δεν αποτελεί άμεσο κίνδυνο για την ανθρώπινη ζωή, το συγκεκριμένο είδος είναι επίσης δηλητηριώδες και προκαλεί ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων συμπεριλαμβανομένου του δυνατού πόνου όταν το δηλητήριό του εγχυθεί μέσω των σκληρών ακανθών των πτερυγίων του. Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται κυρίως στη βελτιστοποίηση των τεχνικών εκχύλισης και απομόνωσης τοξινών από τα δύο προαναφερθέντα ξενικά είδη εισβολέων. Αναφορικά με το λεοντόψαρο αναπτύχθηκαν και αξιολογήθηκαν πρωτόκολλα απομόνωσης του τοξικού φορτίου από τις ακάνθες του με σκοπό τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό αυτών. Όσον αφορά το λαγοκέφαλο αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα απομόνωσης της Τετραδοτοξίνης (ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός), η συγκέντρωση της οποίας προσδιορίστηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS). Τέλος στο πλαίσιο διερεύνησης για την αξιοποίηση της τετραδοτοξίνης του λαγοκέφαλου σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας (πχ καλλυντικοτεχνικά προϊόντα), πραγματοποιήθηκε μελέτη ενθυλάκωσης με τη βοήθεια της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού (electrospraying).

1.2 Τοποθέτηση διπλωματικής εργασίας – Επιμέρους στόχοι

Βασικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των τεχνικών απομόνωσης και τοξινών από τα ξενικά είδη ιχθύων *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) και *Pterois miles* (Bennett, 1828). Αναφορικά με το λαγοκέφαλο πραγματοποιήθηκε μελέτη τόσο για την απομόνωση της τοξίνης όσο και για την αξιοποίηση αυτής στον Τομέα της Κοσμετολογίας. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε πρώτα μελέτη εγκλεισμού της τετραδοτοξίνης σε πολυμερική μήτρα ζεΐνης με την τεχνική του ηλεκτροστατικού ψεκασμού. Σχετικά με το λεοντόψαρο αναπτύχθηκαν και αξιολογήθηκαν πρωτόκολλα απομόνωσης του τοξικού φορτίου από τις ακάνθες του με σκοπό τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό του δηλητηρίου που περιέχεται σε αυτές.

Οι επιμέρους στόχοι περιλαμβάνουν:

- την επιλογή και εφαρμογή των σωστών πρωτοκόλλων παραλαβής του δηλητηρίου από τις ακάνθες του λεοντόψαρου,
- την επιλογή και εφαρμογή των σωστών πρωτοκόλλων παραλαβής της τετραδοτοξίνης από το μυϊκό ιστό και τα όργανα του λαγοκέφαλου,
- τη βελτιστοποίηση όλων των τεχνικών εκχύλισης και για τα δύο είδη ιχθύων,
- τη διερεύνηση των κατάλληλων συνθηκών λειτουργίας της συσκευής ηλεκτροστατικού ψεκασμού (electrospraying) με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων,
- αξιολόγηση των παραγόμενων νανοσωματιδίων,
- ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων σε καλλυντικές κρέμες,
- αξιολόγηση των βασικών χαρακτηριστικών των καλλυντικών κρεμών.

Δεδομένου ότι οι παραπάνω στόχοι στέφθηκαν με επιτυχία, η εν λόγω εργασία θα μπορούσε να συνεισφέρει μετατρέποντας το σημερινό πρόβλημα των Χωροκατακτητικών Ξενικών Ειδών σε «win-win» λύση για τις εταιρείες που δραστηριοποιούνται στον τομέα διατροφής και κοσμετολογίας. Πέρα από την καινοτομία που μπορεί να επιφέρει στον φαρμακευτικό και διατροφικό τομέα με το άνοιγμα μιας νέας αγοράς καινοτόμων σκευασμάτων με βάση προϊόντα μοναδικής προέλευσης, η αξιοποίησή τους αναμένεται να δημιουργήσει ένα νέο είδος αλιείας που θα αποφέρει οικονομικά οφέλη στους ίδιους τους επαγγελματίες αλιείς.

1.3 Διάρθρωση διπλωματικής εργασίας

Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζονται το αντικείμενο, οι επιμέρους στόχοι και η διάρθρωση της διπλωματικής εργασίας.

Στο δεύτερο κεφάλαιο παρουσιάζεται το θεωρητικό μέρος της εργασίας και χωρίζεται σε τρία βασικά μέρη. Στο πρώτο υποκεφάλαιο γίνεται εκτενής βιβλιογραφική ανασκόπηση του *L.scleratus* με έμφαση στη βιολογία του ψαριού, τη θανατηφόρα τοξίνη που διαθέτει, την προέλευση και τις πιθανές κλινικές εφαρμογές αυτής. Στο δεύτερο υποκεφάλαιο ακολουθεί η αντίστοιχη βιβλιογραφική ανασκόπηση του *P.miles* με έμφαση στη βιολογία του ψαριού, το δηλητήριο που περιέχεται στις ακάνθες του και τις πιθανές κλινικές εφαρμογές αυτού. Στο τρίτο υποκεφάλαιο γίνεται μια επισκόπηση των τεχνολογιών ενθυλάκωσης στους τρεις βασικούς βιομηχανικούς κλάδους (Βιομηχανία Τροφίμων, Βιομηχανία Φαρμάκων και Βιομηχανία Καλλυντικών) με ειδική έμφαση στην τεχνική του ηλεκτροστατικού ψεκασμού (electrospraying) όπου πραγματοποιήθηκε κατά βάση στην εν λόγω εργασία.

Στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζεται η πειραματική διαδικασία. Συγκεκριμένα στο πρώτο υποκεφάλαιο γίνεται αναφορά στα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν (πρώτη ύλη, αντιδραστήρια κα διαλύματα), ενώ στο δεύτερο υποκεφάλαιο περιγράφεται η μεθοδολογική προσέγγιση σε συνδυασμό με τα όργανα και τις συσκευές που ήταν απαραίτητα για τη διεκπεραίωση όλων των πειραμάτων.

Στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εργασίας σε πέντε υποκεφάλαια. Τα πρώτα δύο είναι σχετικά με το λεοντόψαρο και αναφέρονται στον προσδιορισμό συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης που περιέχεται στα αγκάθια αυτού, ενώ στο τρίτο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με την τετραδοτοξίνη (TTX) του λαγοκέφαλου που προέκυψαν έπειτα από την ανάλυση των δειγμάτων με *LC-MS/MS*. Στο τέταρτο υποκεφάλαιο παρατίθενται τα αποτελέσματα από το χαρακτηρισμό των τελικών προϊόντων ενθυλάκωσης, ενώ στο πέμπτο και τελευταίο φαίνεται ο χαρακτηρισμός που πραγματοποιήθηκε σχετικά με τις καλλυντικές κρέμες.

Στο πέμπτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα συμπεράσματα της διπλωματικής εργασίας και παρατίθενται κάποιες ιδέες για μελλοντική έρευνα.

Κεφάλαιο 2: Θεωρητικό Μέρος

Η καταστροφή του φυσικού περιβάλλοντος από ανθρωπογενείς παράγοντες οδηγεί ολοένα και περισσότερο στη διασπορά των ειδών σε οικοσυστήματα τα οποία είναι ξένα. Η επίπτωση της διασποράς αυτής επηρεάζει ξεκάθαρα τα εγγενή είδη και την ισορροπία τόσο των χερσαίων όσο και των θαλάσσιων οικοσυστημάτων, οδηγώντας σε εξελικτικές οδούς που δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητές [1]. Οι εισβολείς αυτοί μπορεί να οδηγήσουν σε μείωση του αριθμού των εγγενών ειδών, σε διαταραχή συγκεκριμένων σημαντικών διεργασιών, σε οικονομικές απώλειες καθώς και στην ανάπτυξη ασθενειών και παθογόνων. Μάλιστα σε ορισμένες ακραίες περιπτώσεις, τα εγγενή είδη δύναται να εξαφανιστούν εξαιτίας του ανταγωνισμού ή της θήρευσης από τους εισβολείς [2].

Συχνά, τα χωροκατακτητικά είδη ανακαλύπτονται αφού έχουν ήδη βρεθεί στο νέο βίοτοπο για μεγάλο χρονικό διάστημα καθιστώντας δύσκολο να προσδιοριστεί πώς και πότε ξεκίνησε η εισβολή. Βέβαια υπάρχουν και περιπτώσεις όπου ένα είδος αποτυγχάνει να εδραιώσει ένα βιώσιμο πληθυσμό σε ένα συγκεκριμένο βίοτοπο.

Τα τελευταία χρόνια το πρόβλημα της κλιματικής αλλαγής περιπλέκει περαιτέρω το ζήτημα της εισβολής των ξενικών ειδών λόγω της αβέβαιης επίδρασης του στην κατανομή, την αφθονία και τη συμπεριφορά των ειδών [3],[4]. Συγκεκριμένα έχουν ήδη καταγραφεί περιπτώσεις στις οποίες τα είδη έχουν μεταναστεύσει λόγω αλλαγής περιβάλλοντος το οποίο συσχετίζεται με την ανθρώπινη κλιματική αλλαγή.

Η Μεσόγειος Θάλασσα φιλοξενεί πολλά θαλάσσια είδη εισβολέων, όπου ορισμένα από αυτά έχουν ήδη δημιουργήσει ευήμερους πληθυσμούς. Τα είδη αυτά ενδέχεται να έχουν εισέλθει από το κανάλι του Σουέζ, το στενό του Γιβραλτάρ, την απόρριψη υδάτων από το έρμα των πλοίων καθώς και από τυχαία απελευθέρωση. Ωστόσο το κανάλι του Σουέζ θεωρείται ως η κύρια οδός μεταναστευτικών ειδών από τον Ινδικό-Ειρηνικό Ωκεανό γνωστά και ως Λεσεπιανά είδη, τα οποία προσήλθαν στη Μεσόγειο Θάλασσα μέσω της Ερυθράς Θάλασσας [5]. Η επικοινωνία των δύο αυτών διαφορετικών θαλασσών είχε πολύ σημαντικές συνέπειες οι οποίες δεν είχαν ληφθεί υπόψη κατά την κατασκευή του καναλιού. Θαλάσσιοι οργανισμοί μετανάστευσαν από την Ερυθρά Θάλασσα στη Μεσόγειο σε σχετικά μεγάλους αριθμούς, αν και μεταναστεύσεις πραγματοποιούνται και προς την αντίθετη κατεύθυνση αλλά σε χαμηλότερη κλίμακα. Συνολικά, ο αριθμός των ξενικών ειδών έχει φτάσει τα 790 στη Μεσόγειο Θάλασσα, με μερικούς από τους εισβολείς μέσω του καναλιού του Σουέζ να αποτελούν αρκετά επιτυχημένοι αποικιστές των θαλάσσιων οικοσυστημάτων της Μεσογείου [6].

Το κανάλι του Σουέζ μεταξύ της Μεσογείου και της Ερυθράς Θάλασσας (Εικόνα 1) θεωρείται μακράν ως το σημαντικότερο μονοπάτι για τα χωροκατακτητικά είδη, χτίστηκε το 1869 προκειμένου να διευκολυνθεί το εμπόριο μεταξύ Ευρώπης και Άπω Ανατολής από τον μηχανικό *Ferdinand de Lesseps* και για το λόγο αυτό τα είδη που μετανάστευσαν στη Μεσόγειο πήραν το όνομα του. Το κανάλι, που συνδέει αυτά τα δύο υδρογραφικά και βιολογικά ανόμοια υδάτινα σώματα, εκτείνεται στα 162.5 km και είναι σχετικά στενό και ρηχό στο μεγαλύτερο μέρος του μήκους του. Λαμβάνοντας

υπόψη το γεγονός ότι οι θερμοκρασίες της επιφανείας της θάλασσας έχουν αυξηθεί τα τελευταία είκοσι χρόνια έχει προταθεί ότι οι συνθήκες της Ανατολικής Μεσογείου γίνονται όλο και πιο κατάλληλες για την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την επιβίωση των τροπικών ειδών, προσφέροντας στα ξενόφερτα είδη σημαντικό πλεονέκτημα όταν ανταγωνίζονται με τα εγγενή είδη [7].



Εικόνα 1. Χάρτης της Μεσόγειου θάλασσας [8].

Σήμερα, περισσότερα από 300 είδη, συμπεριλαμβανομένων ψαριών, μακροφυτών και ασπόνδυλων, έχουν εισέλθει στην Ανατολική Μεσόγειο μέσω του καναλιού του Σουέζ. Τα σχετικά ρηχά νερά του καναλιού με μέσο βάθος περίπου 10 m θεωρείται σημαντικό φυσικό εμπόδιο για τη μετανάστευση ειδών που ζουν σε βαθιά ύδατα. Συνεπώς, τα περισσότερα από τα χωροκατακτητικά είδη που εντοπίζονται στην Ανατολική Μεσόγειο βρίσκονται σε βάθη μικρότερα των 70 m [9].

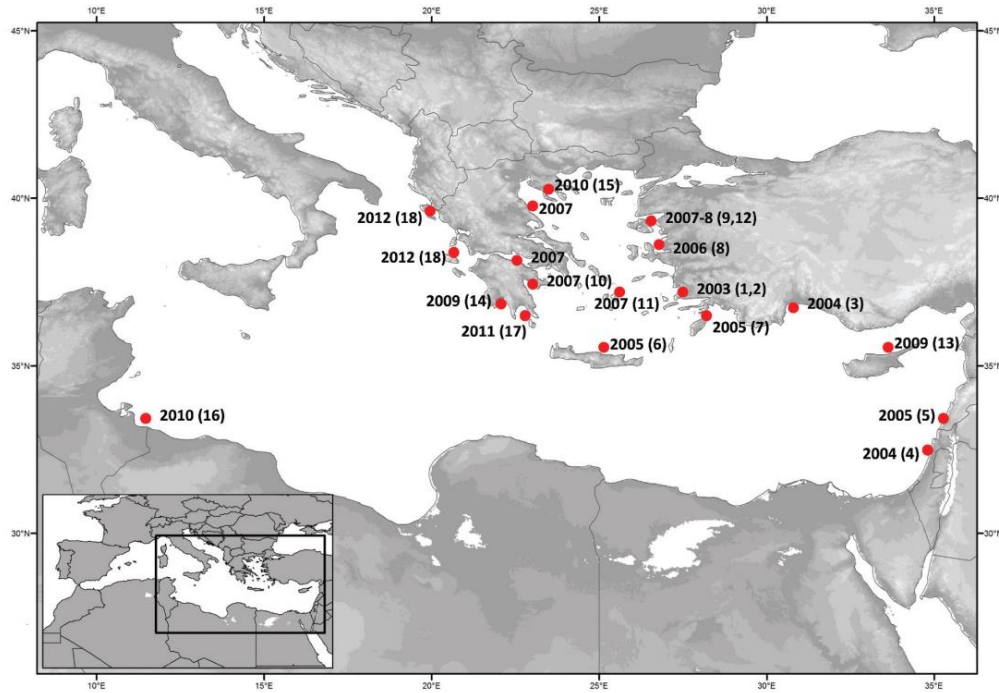
Δεδομένου ότι οι εισβολές ξενικών ειδών στη Μεσόγειο θα συνεχίσουν να λαμβάνουν χώρα και τα επόμενα χρόνια και από τη στιγμή όπου έχουν ήδη αναφερθεί αλλαγές στα οικοσυστήματα και στην παράκτια αλιεία το όλο θέμα ανάγεται σε ένα σοβαρό τόσο οικολογικό όσο και οικονομικό ζήτημα το οποίο χρήζει άμεσης αντιμετώπισης [10].

Όπως είναι αναμενόμενο οι επιπτώσεις από την εισβολή των Λεσεψιανών ειδών έχουν αντίκτυπο και στα ελληνικά θαλάσσια ύδατα. Δύο από τα σημαντικότερα χωροκατακτητικά ξένα είδη ιχθύων των Ελληνικών θαλασσών είναι το *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) και το *Pterois miles* (Bennett, 1828).

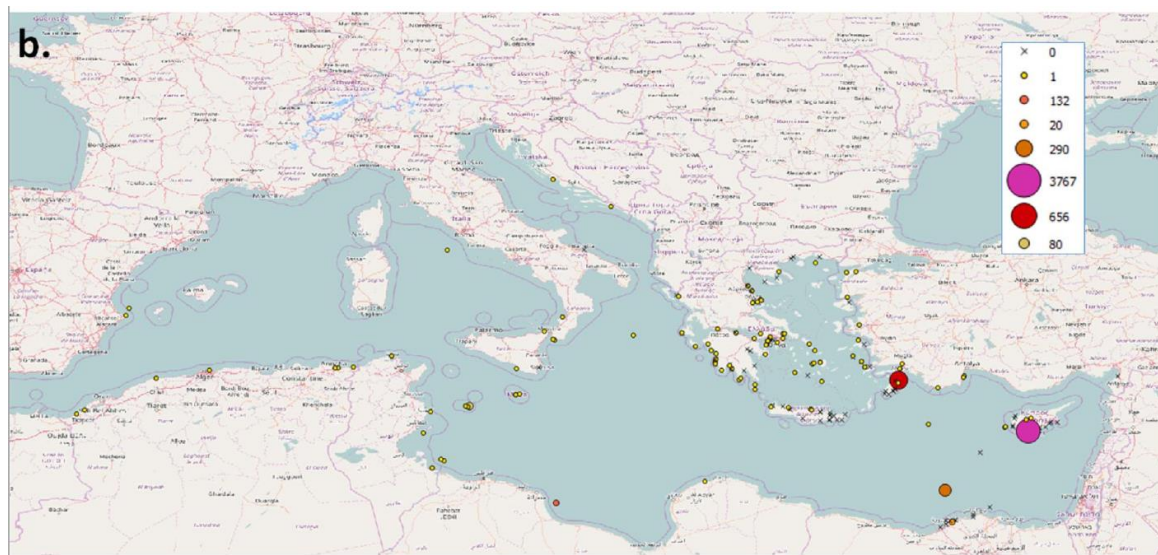
2.1 *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789)

Η πρώτη αναφορά σχετικά με την ύπαρξη του *L. sceleratus* στην ευρύτερη περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου έγινε το 2003 στον κόλπο Γόκονα στην Τουρκία. Ο *L. sceleratus* έχει ήδη δημιουργήσει έναν πληθυσμό από νέες αποικίες στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου γεγονός το οποίο αποδεικνύεται καθώς μόλις το 2006, δηλαδή τρία χρόνια αργότερα, υπήρχαν ήδη αρκετές αναφορές για την ύπαρξη του ψαριού στο

Αιγαίο Πέλαγος [11]. Έκτοτε παρουσίασε ταχεία ανάπτυξη σε όλη την Ανατολική Μεσόγειο φτάνοντας στα βορειότερα μέρη του Αιγαίου και νοτιοδυτικά προς την Τύνιδα ενώ μέχρι το 2013 δεν είχε καταγραφεί στην Ιταλία (Εικόνα 2). Έκτοτε αναφορές για την ύπαρξη του *L.sceleratus* έχουν γίνει και για την περιοχή της Ιταλίας με σαφώς λιγότερες καταγεγραμμένες περιπτώσεις συγκριτικά με τον ευρύτερο Ελλαδικό χώρο (Εικόνα 3).



Εικόνα 2. Χωροχρονική κατανομή του *Lagocerphalus sceleratus* στην ευρύτερη περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου μέχρι το έτος 2013 [12].



Εικόνα 3. Χωροχρονική κατανομή του *Lagocerphalus sceleratus* στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου μέχρι το έτος 2018 [13].

Δηλητηριάσεις οι οποίες έχουν οδηγήσει σε πολυάριθμους θανάτους έχουν καταγραφεί στη Νοτιοανατολική Ασία συμπεριλαμβανομένης της Μαλαισίας, της Ταϊβάν, του Χονγκ Κονγκ και της Κορέας [14]. Τα τελευταία χρόνια αναφέρονται ολοένα και πιο πολλά περιστατικά οξείας τροφικής δηλητηρίασης από την κατανάλωση λαγοκέφαλου στην Ανατολική Μεσόγειο και συγκεκριμένα στη Νότια Ελλάδα, η ιατρική αντιμετώπιση των οποίων είναι εξαιρετικά δύσκολη καθώς δεν υπάρχει αντίδοτο για την τετραδοτοξίνη [15].

Οι τυχαίες συλλήψεις του είδους αποτελούν συχνά μεγάλο ποσοστό της ψαριάς, ιδιαίτερα στην παράκτια αλιεία, με αποτέλεσμα να έχουν ξεκινήσει σημαντικές εθνικές προσπάθειες με σκοπό την προειδοποίηση τόσο των αλιέων όσο και του απλού κοινού για την τοξικότητα αυτού του ψαριού. Επίσης το Ελληνικό Υπουργείο Υγείας έχει κρούσει το κώδωνα του κινδύνου στους Έλληνες αλιείς καθώς μικρότερα εμπορικά βρώσιμα είδη ιχθύων όπως το *Spicara smaris* (μαρίδα), *Boops boops* (γόπα) και *Atherina hepsetus* (αθερίνα) μοιάζουν με μικρότερα άτομα λαγοκέφαλου [12].

2.1.1 Βιολογία του *L. sceleratus*

Το εν λόγω είδος ψαριού ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία της οικογένειας *Tetrodontidae*, η οποία περιλαμβάνει 187 διαφορετικά είδη παγκοσμίως [16]. Ο Γερμανός επιστήμονας, Johan Gmelin, αναγνώρισε για πρώτη φορά τον *L. sceleratus* της οικογένειας *Tetrodontidae* το 1789. Αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα μέλη της οικογένειας του φτάνοντας τα 110 cm και 7 kg. Η ράχη του έχει χρώμα σκούρο πράσινο προς καφέ με μαύρα στίγματα να είναι σχετικά όμοια κατανεμημένα σε όλη την άνω επιφάνειά του. Αντίθετα η κοιλιά του στο κάτω μέρος είναι λευκή και το σήμα κατατεθέν του είναι η μια ασημένια βούλα μπροστά από κάθε μάτι του (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Απεικόνιση του *L. sceleratus*.

Το επίμηκες σώμα του είναι ελαφρώς συμπιεσμένο πλευρικά και δεδομένης της απουσίας των πλευρών και των επίπλευρων έχει την ικανότητα να φουσκώνει απορροφώντας αέρα ή νερό με σκοπό την απόθεση των υπογλήφιων θηρευτών του (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Απεικόνιση του *L.sceleratus* όταν δαισθάνεται κίνδυνο.

Τα δύο ισχυρά δόντια του σε κάθε γνάθο είναι ικανά να σχίσουν και να καταστρέψουν δίχτυα και παραγάδια γεγονός στο οποίο εμπίπτει και η ονομασία της οικογένειας *Tetrodontidae* (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Απεικόνιση της ισχυρής οδοντοστοιχίας του *L.sceleratus*.

Στη Μεσόγειο, αυτό το ψάρι εμφανίστηκε ως σαρκοφάγο με κύρια πηγή τροφής του να αποτελούν οι γαρίδες, τα καβούρια, τα καλαμάρια, οι σουπιές αλλά και άτομα από τα δικά του είδη [17]. Συνεντεύξεις από τοπικούς ψαράδες κατά μήκος των ακτών του Λιβάνου αποκάλυψαν την ευκαιριακή συμπεριφορά αυτού του είδους καθώς επιτίθεται σε ψάρια, συλλαμβάνεται στα δίχτυα αυτών και βλάπτει σοβαρά τα αλιευτικά εργαλεία και τα αλιεύματα. Αξίζει να σημειωθεί πως παρόμοια συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί και σε άλλες χώρες όπως η Κύπρος και η Ελλάδα.

Επίσης, το είδος αυτό του λαγοκέφαλου συσσωρεύει μια ισχυρή νευροτοξίνη γνωστή ως τετραδοτοξίνη (TTX), η οποία είναι μία μη πρωτεϊνική οργανική ένωση και

αποτελεί μία εκ των πιο ισχυρών θαλάσσιων τοξινών καθώς είναι 1200 φορές πιο τοξική από τα κυανίδια.

Ο *L. sceleratus* έχει αναφερθεί ότι έχει την ικανότητα να εξαπλώνεται και να εκμεταλλεύεται γρήγορα τους πόρους που του διατίθεται ανταγωνιζόμενος τους εγγενείς σαρκοφάγους. Συνεπώς ο λαγοκέφαλος του είδους αυτού κατατάσσεται σίγουρα στους πιο γρήγορα αναπτυσσόμενους Λεσσεψιανούς μετανάστες μέχρι σήμερα.

2.1.2 Τετραδοτοξίνη (TTX)

2.1.2.1 Προέλευση Τετραδοτοξίνης

Η παραγωγή Τετραδοτοξίνης (TTX) από θαλάσσια βακτήρια διερευνήθηκε εκτενώς μέχρι τη δεκαετία του 1980 με μελέτες που εστιάζουν κυρίως σε είδη που ανήκουν στο γένος *Vibrio* και σε χαμηλότερη κλίμακα στα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*.

Τα βακτήρια *Vibrio* αποτελούν ένα είδος υδρόβιων βακτηρίων και το σχήμα τους μοιάζει με κόμμα. Θεωρούνται πολύ κινητικά, ανήκουν στην οικογένεια *Vibrionaceae* και μπορούν να προκαλέσουν πολλές σοβαρές ασθένειες στα ζώα. Η πιο κοινή πηγή βακτηρίων που σχετίζεται με την παραγωγή TTX είναι το *Vibrio alginolyticus*. Συγκεκριμένα κάποιες κατηγορίες ιχθύων όπως τα *Chaetognaths*, *Nemertean*s και *puffer* φαίνεται να περιέχουν το *V. Alginolyticus*.

Για να επιβεβαιωθεί ο ρόλος των βακτηρίων στην παραγωγή TTX έχουν γίνει πολλά πειράματα διαλογής που αποκάλυψαν ότι 10 στελέχη της οικογένειας *Vibrio* παράγουν αυτήν την τοξίνη. Η TTX λαμβάνεται από την τροφική αλυσίδα αλλά οι μηχανισμοί μεταφοράς, συσσώρευσης και εξάλειψης της που λαμβάνονται μέσω των θηραμάτων παραμένει ασαφής.

Κατά το παρελθόν οι απόψεις δίστανται στο κατά πόσο η TTX παραγόταν από το ίδιο το ψάρι ή συσσωρευόταν σε αυτό από το υδρόβιο περιβάλλον όπου ζούσε. Αρκετά ευρήματα, όπως η κατανομή της TTX μεταξύ άλλων οργανισμών, η παραγωγή TTX από ορισμένα θαλάσσια βακτήρια σε συνδυασμό και με την απουσία τοξικότητας TTX σε τεχνητά εκτρεφόμενα ψάρια της ίδιας οικογένειας με μη τοξικές δίαιτες απέδειξαν αργότερα ότι η εν λόγω νευροτοξίνη είναι εξωγενής.

Αν και η TTX έχει απομονωθεί κυρίως από ψάρια της κατηγορίας των *Tetrodontidae* υπάρχουν και άλλα έμβια θαλάσσια όντα που τη συσσωρεύουν όπως οι Σκαρίδες (Parrot fish), οι φρύνοι του γένους *Atelopus*, διάφορα είδη χταποδιών του γένους *Hapalochlaena*, αρκετοί αστερίες, πολλά είδη καβουριών του γένους *xanthid* κ.α. Η τοξίνη χρησιμοποιείται από το φορέα είτε ως αμυντική βιοτοξίνη για την αποτροπή της αρπαγής, είτε ως δηλητήριο όταν ο θηρευτής είναι σε θέση άμυνας-επίθεσης. Όλοι οι οργανισμοί που φέρουν TTX παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλή αντοχή σε αυτή και φαίνεται να διαθέτουν την τοξίνη αυτή ως μηχανισμό βιολογικής άμυνας. Συμπερασματικά αν και η ακριβής προέλευση της TTX στην τροφική αλυσίδα παραμένει άγνωστη παρόλα αυτά η πεποίθηση ότι η προέλευση αυτής είναι

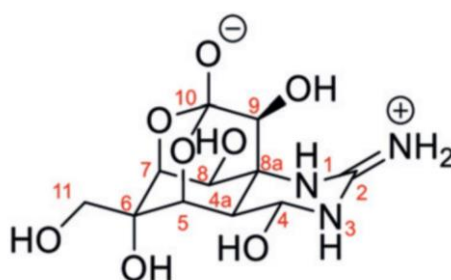
βακτηριακή είναι η μόνη πιθανή καθώς το περιβάλλον των έμβιων όντων που τη φέρουν δεν έχουν κανένα άλλο κοινό παράγοντα πέρα από τα βακτήρια [18].

Έπειτα από αρκετά χρόνια έρευνας σχετικά με τη TTX αποκαλύφθηκε ότι η τοξικότητα των ψαριών που φέρουν την τοξίνη αυτή εμφανίζει σημαντικές ατομικές και περιφερειακές παραλλαγές [19]. Οι περισσότερες μελέτες κατέληξαν πρώτον στο ότι το ήπαρ πολλών ειδών *Tetrodontidae* διαθέτει έναν ειδικό μηχανισμό πρόσληψης TTX και δεύτερον στο ότι η TTX που εισάγεται στο σώμα τους πρώτα απορροφάται στο ήπαρ και έπειτα μεταφέρεται στο δέρμα μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Αυτή η μεταφορά και συσσώρευση TTX μεταξύ των ιστών επηρεάζεται σημαντικά από την κατάσταση ωριμότητας των ψαριών.

Νέες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μία συσχέτιση μεταξύ της θερμοκρασίας του νερού της θάλασσας και της πρόσληψης TTX από τους οργανισμούς. Παραδείγματος χάρη τα ψάρια *Takifugu* προσλαμβάνουν TTX στο ήπαρ ταχύτερα με την αύξηση της θερμοκρασίας του νερού, ενώ ο *Lagocephalus lunaris* προσλαμβάνει TTX με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό κατά τους θερμότερους μήνες.

2.1.2.2 Χημεία και Βιολογία Τετραδοτοξίνης

Τόσο η χημεία όσο και η δομή της TTX (Εικόνα 7) είναι γνωστές καθώς πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει τις χημικές ιδιότητες, την προέλευση, τα παράγωγα, την μικροβιακή πηγή και τους μηχανισμούς δράσεων της [20].

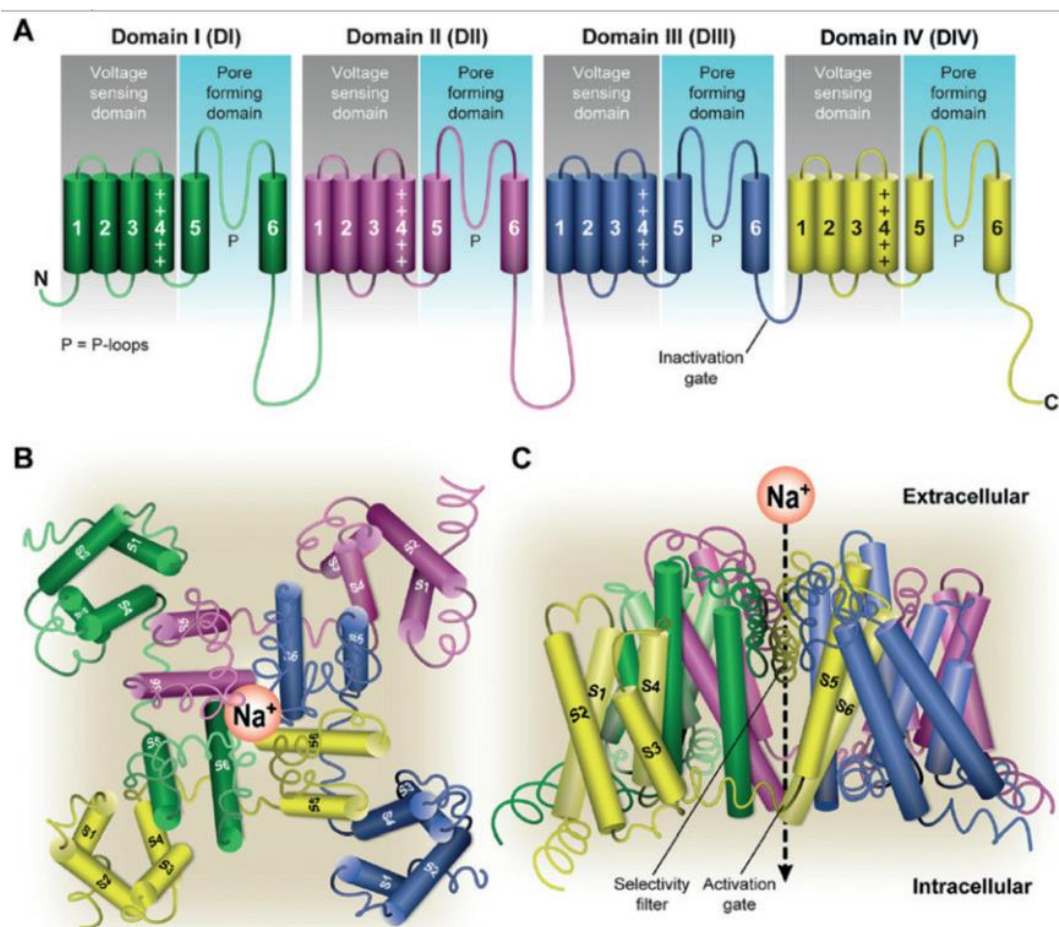


Εικόνα 7. Μοριακή δομή της Τετραδοτοξίνης στο χώρο [21].

Η TTX είναι υδατοδιαλυτή, ανθεκτική στη θερμότητα, και μπορεί να απορροφηθεί μέσω των βλεννογόνων μεμβρανών και του λεπτού εντέρου. Είναι μια θανατηφόρα νευροτοξίνη η οποία δρα αναστέλλοντας το δυναμικό δράσης τόσο στα νευρικά όσο και στα μυϊκά κύτταρα με ένα χαρακτηριστικά επιλεκτικό τρόπο.

Η βιολογική επίδραση της TTX προκαλείται από την αλληλεπίδραση της με κάποιες αναπόσπαστες πρωτεϊνικές μεμβράνες οι οποίες ονομάζονται Πύλες Τάσης Διαύλων Νατρίου (Voltage Gated Sodium Channels ή αλλιώς VGSC). Οι διαμεμβρανικές αυτές πρωτεΐνες συναντώνται στην επιφάνεια ευερέθιστων κυττάρων όπως για παράδειγμα σε νευρώνες ή μυϊκά κύτταρα. Ανακαλύφθηκαν από τους Hodgkin και Huxley το 1952 [22] και απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1978 [23]. Είναι υψίστης σημασίας καθώς διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στην έναρξη και διάδοση του νευρικού σήματος. Δομικά οι VGSC αποτελούνται από μία λειτουργικά ανεξάρτητη α-

υπομονάδα και μία ή δύο β -υπομονάδες οι οποίες εμπλέκονται στην ανίχνευση της τάσης. Η α -υπομονάδα διαιρείται περαιτέρω σε διάφορους τομείς περιβάλλοντας έναν κεντρικό πόρο του καναλιού [24] (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Δομή των VGSC [25].

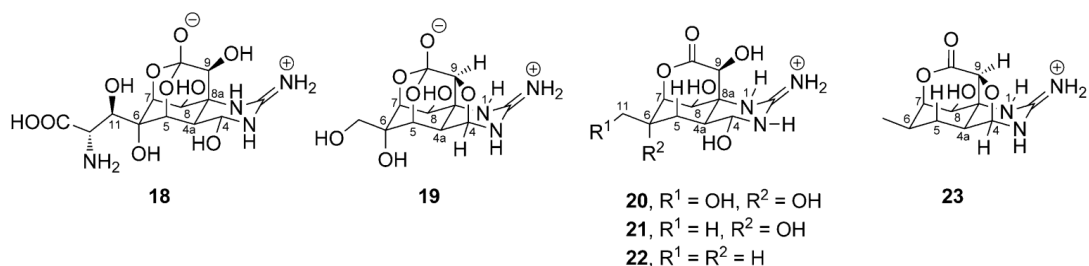
Όταν το κανάλι ενεργοποιείται ανοίγει επιλεκτικά για να περάσουν τα ιόντα νατρίου στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Η τοπική αλλαγή στο διαμεμβρανικό δυναμικό οδηγεί στο άνοιγμα των γειτονικών VGSC με αποτέλεσμα το σήμα να ταξιδεύει κατά μήκος του νευρώνα.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1960 κατέστη προφανές ότι η TTX επηρεάζει τα ρεύματα που προκαλούνται από το νάτριο μέσω μιας επιλεκτικής αλληλεπίδρασης με τα κανάλια νατρίου [26]. Η τοξικότητα της TTX προέρχεται από τη δέσμευσή της στα κανάλια νατρίου εμποδίζοντας τα ιόντα να περάσουν από την κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η επικοινωνία μεταξύ των νευρώνων. Αυτό έχει τεράστιο αντίκτυπο στον οργανισμό καθώς κατά αυτόν τον τρόπο μπορούν να επηρεαστούν βασικές διεργασίες και ζωτικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού και σε κάποιες περιπτώσεις ακόμα και να κατασταλούν (π.χ. αναπνοή). Το όριο TTX με το οποίο μπορεί να προέλθει ανθρώπινος θάνατος είναι $1.33 \frac{mg}{kg}$ [27].

Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970 υπήρξαν αναφορές σχετικά με την ανθεκτικότητα των VGSC στην TTX γεγονός το οποίο είχε σαν αποτέλεσμα των πρώτη

κατηγοριοποίηση τους. Πλέον διακρίνονται σε ευαίσθητα και ανθεκτικά κανάλια νατρίου σε TTX. Τα ευαίσθητα ισόμορφα κανάλια που αφορούν τη νανομοριακή περιοχή είναι τα Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6 και Nav1.7, ενώ τα Nav1.5, Nav1.8 και Nav1.9 είναι ευαίσθητα στη TTX μόνο σε μικρομοριακό εύρος λόγω μιας μετάλλαξης θέσης μέσα στον πόρο του καναλιού [28].

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι μέγιστες συγκεντρώσεις TTX και των διαφόρων φυσικών παραγώγων της (Εικόνα 9) σχετικά με τη δέσμευση αυτών έναντι των καναλιών Nav1.1-1.7. Όπως είναι εμφανές η παρουσία των υδροξυλομάδων και του τμήματος της γουανιδίνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δέσμευση.



Εικόνα 9. Παράγωγα της Τετροδοτοξίνης όπου δοκιμάστηκαν στα κανάλια Nav1.1-1.7.

Πίνακας 1. Μέγιστες συγκεντρώσεις TTX και των διαφόρων φυσικών παραγώγων της έναντι των VGSC [29].

Compound	Nav1.1	Nav1.2	Nav1.3	Nav1.4	Nav1.5	Nav1.6	Nav1.7
TTX (1)	4.1±0.2n m	14±2nm	5.3±0.6n m	7.6±2.6n m	1.0±0.1μ m	2.3±0.0n m	36±7nm
CHTX (18)	26±1nm	27±7nm	14±2nm	50±3nm	1.9±0.9μ m	43±10nm	471±27n m
4,9-anhydroTTX (19)	ND	ND	ND	>100nm	>100nm	294±25n m	ND
5-deoxyTTX (20)	57±6μm	>300n m	12±1μm	4.5±1.0μ m	>300nm	>300nm	>300nm
5,11-dideoxyTTX (21)	>300nm	>300n m	>300nm	>300nm	>300nm	>300nm	>300nm
5,6,11-trideoxyTTX (22)	>300nm	>300n m	>300nm	>300nm	>300nm	>300nm	>300nm
4,9-anhydro-5,6,11-trideoxyTTX (23)	ND	ND	ND	>100nm	>100nm	ND	ND

Η TTX συνδέεται μη αναστρέψιμα με το πρώτο κανάλι με αποτέλεσμα να μπλοκάρεται και να εμποδίζεται η πρόσβαση του Νατρίου. Κατά αυτόν τον τρόπο η τοξίνη οδηγεί στην απόφραξη της αγωγιμότητας των νεύρων και στη συστολή των μυών[5]. Η TTX είναι γνωστή ως μία από τις ισχυρότερες τοξικές ουσίες σε περίπτωση κατάποσής της από τον άνθρωπο καθώς είναι σε θέση να οδηγήσει σε μια σειρά γαστρεντερικών (ναυτία, διάρροια, έμετος, κοιλιακή δυσφορία) και νευρολογικών συμπτωμάτων (παραίσθησία στο πρόσωπο, κινητικός συντονισμός, και μυϊκή αδυναμία). Άλλα

συμπτώματα περιλαμβάνουν υπόταση, υποξία, δυσαρθρία και ταχυκαρδία. Άμεσες θεραπείες για την εξουδετέρωση της TTX από ασθενείς που την κατανάλωσαν δεν υπάρχουν αν και έχουν βρεθεί μονοκλωνικά αντισώματα που θα μπορούσαν να δράσουν κατά της TTX [30].

2.1.2.3 Πιθανές κλινικές εφαρμογές της TTX

2.1.2.3.1 Αναισθητικές ιδιότητες της TTX

Οι αναισθητικές ιδιότητες της TTX διερευνήθηκαν για πρώτη φορά από τον Mori το 1968 [31]. Οι σημαντικοί παράγοντες οι οποίοι συντελούν στη χρήση της Τετραδοτοξίνης ως τοπικό αναισθητικό είναι δύο. Πρώτον δεν αλληλεπιδρά έντονα με το κανάλι NaV1.5 με αποτέλεσμα να μην εμφανίζονται καρδιαγγειακές παρενέργειες ή μυοτοξικότητα [32] (σε σύγκριση με ορισμένα γνωστά τοπικά αναισθητικά όπως για παράδειγμα η βουπιβακαΐνη). Δεύτερον η θέση δέσμευσης για τη TTX βρίσκεται έξω από τη μεμβράνη και είναι διαφορετική από τη θέση δέσμευσης των τυπικών τοπικών αναισθητικών, η οποία βρίσκεται στο εσωτερικό της μεμβράνης.

Συνεπώς ένας συνδυασμός TTX με άλλα τοπικά αναισθητικά είναι όχι μόνο δυνατός αλλά και επωφελής καθώς δύναται να οδηγήσει σε συνεργιστικό αποτέλεσμα. Παραδείγματος χάρη ένας συνδυασμός TTX (1 µg/mL) και λιδοκαΐνης (0.1%) μπορεί να οδηγήσει σε ένα τοπικό αναισθητικό αποτέλεσμα μέσω αποκλεισμού του ισχιακού νεύρου σε αρουραίους το οποίο υπό άλλες προϋποθέσεις (με μεμονωμένη χρήση των δύο προηγούμενων ουσιών) δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί. Επιπλέον η εφαρμογή της TTX με αγγειοσυσταλτικά (π.χ. επινεφρίνη) οδηγεί σε μείωση των τοξικών ιδιοτήτων της [33].

2.1.2.3.2 Εφαρμογές της TTX στην καταπολέμηση του Καρκίνου

Η Τετραδοτοξίνη έχει αποδειχθεί πολύτιμος παίκτης στην καταπολέμηση του καρκίνου. Η Καναδική φαρμακολογική εταιρεία WEX Pharmaceutical Inc., πραγματοποίησε διάφορα επίπεδα κλινικών δοκιμών για την αξιολόγηση της TTX ως φάρμακο για τη θεραπεία από τον πόνο σε καρκινοπαθείς οι οποίοι υπέφεραν από τα οπιοειδή αναλγητικά που χρησιμοποιούνται συνήθως [21].

Μια γραμμή της έρευνας επικεντρώθηκε στη χρήση της TTX για τη θεραπεία του πόνου που συνδέεται άμεσα με τη συγκεκριμένη ασθένεια. Στην κλινική φάση δοκιμής Πα που ξεκίνησε η μελέτη αποτελεσματικότητας και ασφαλείας πολλαπλών δόσεων αποκάλυψε ότι δόσεις της τάξης των 7.5 mg όπου χορηγούνται δύο φορές την ημέρα μπορεί να οδηγήσουν στην ανακούφιση του πόνου, η οποία μπορεί ακόμη και να διαρκέσει πέρα από την πορεία της θεραπείας. Μετά τη χορήγηση οι ασθενείς παρουσίασαν «μυρμήγκιασμα» ή άλλα ήπια αισθητήρια φαινόμενα (υποισθησία και παραισθησία) εντός περίπου μιας ώρας από κάθε θεραπεία. Έως και τη δόση των 30 mg (δύο φορές την ημέρα) παρενέργειες όπως ναυτία ή ανεπιθύμητες ενέργειες του γαστρεντερικού και του νευρικού συστήματος ήταν γενικά ήπιες και εξαρτώμενες από τη δόση.

Η μακροχρόνια φάση μελέτης ασφάλειας και αποτελεσματικότητας της κλινικής δοκιμής III σχεδιάστηκε ως συνέχεια για τους ασθενείς όπου είχαν λάβει μέρος στις κλινικές δοκιμές της φάσης II. Στους ασθενείς χορηγήθηκαν 30 mg TTX δύο φορές ημερησίως για 4 ημέρες. Ασθενείς όπου αισθάνθηκαν τουλάχιστον 30 % μείωση της έντασης του πόνου μπήκαν στον επόμενο κύκλο θεραπείας. Στους πρώτους πέντε κύκλους παρατηρήθηκε μείωση του πόνου στο 35 %, ενώ στους επόμενους κύκλους η μείωση έφτασε μέχρι και στο 20 %. Αξίζει να σημειωθεί πως η τοξικότητα ήταν ανεκτή σε όλους ασθενείς και κατά μέσο όρο η ανακούφιση του πόνου διήρκεσε 21 ημέρες [21].

Εκτός από τη χρήση της TTX για τη θεραπεία του πόνου που σχετίζεται με τον καρκίνο διεξήχθησαν μελέτες και σε διαφορετική κατεύθυνση. Η WEX Pharmaceuticals διερεύνησε τη χρήση της TTX ως πιθανό φάρμακο για τη θεραπεία του πόνου ως συνέπεια της χημειοθεραπείας χωρίς ωστόσο να δημοσιευθούν τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης.

2.1.2.3.3 TTX και θεραπεία από τον εθισμό στα ναρκωτικά

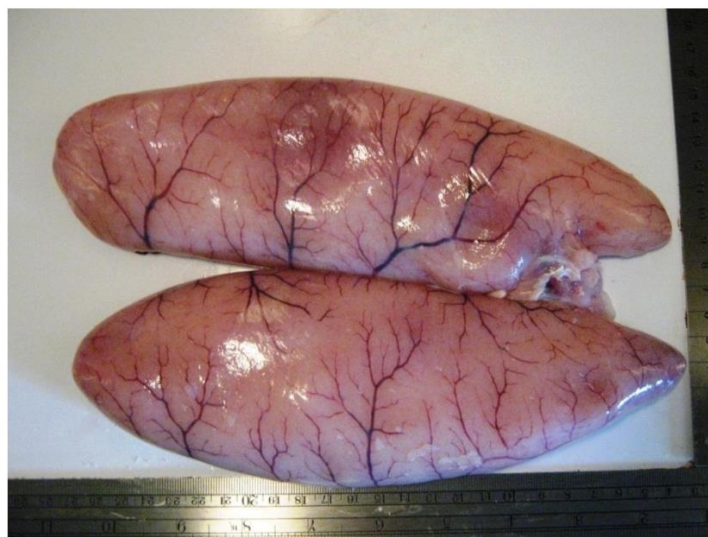
Η θεραπευτική εφαρμογή της TTX για τη θεραπεία από τον εθισμό στα οπιοειδή βασίζεται σε μια προκλινική μελέτη σε αρουραίους και ποντίκια. Αποδείχθηκε ότι η TTX μπορεί να ανακουφίσει από μία οξεία επίδραση ηρωίνης. Το 2009 η πρώτη κλινική μελέτη διενεργήθηκε από Κινέζους ερευνητές, οι οποίοι διερεύνησαν τον τρόπο με τον οποίο η TTX μπορεί να μειώσει το έντονο άγχος που προκαλείται στους τοξικομανείς [34]. Σε μια άλλη κλινική μελέτη, που πραγματοποιήθηκε δύο χρόνια αργότερα, διερευνήθηκε η ικανότητα της TTX να ανακουφίζει από το σύνδρομο που προκαλείται μετά τη διακοπή οπιούχων φαρμάκων με τα αποτελέσματα να είναι πλήρως ενθαρρυντικά.

2.1.2.4 Τοξικότητα του *L. Sceleratus*

Οι περισσότερες από τις μελέτες που σχετίζονται με την τοξικότητά του *L. Sceleratus* έχουν πραγματοποιηθεί στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου λόγω των αρνητικών επιπτώσεών της στον τομέα της αλιείας. Μελέτες από αυτή την περιοχή έδειξαν ότι λαγοκέφαλοι στο πρόωρο στάδιο ανάπτυξης (με μέγεθος μικρότερο των 16 cm) δεν διαθέτουν αρκετή θανατηφόρα TTX, ενώ στην περίπτωση ενός ενήλικα *L. Sceleratus* αρκούν μόλις 200 g σάρκας για να επιφέρουν το θάνατο [19]. Για ένα άτομο 50 kg εκτιμάται ότι η ελάχιστη θανατηφόρα δόση είναι 2 mg TTX αλλά αυτό μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ηλικία, την υγεία και την ευαισθησία του ατόμου.

Η TTX στο λαγοκέφαλο εντοπίζεται κυρίως στις γονάδες, στο ήπαρ, στα έντερα, στο δέρμα και περιστασιακά στους μύες. Οι ωοθήκες (Εικόνα 10) αναφέρονται ως πολύ τοξικές (>1000 MU/g ιστού), τα έντερα ως μέτρια τοξικά (100-1000 MU/g ιστού) ενώ το συκώτι, οι μύες και το δέρμα ως ασθενώς τοξικά (10-100 MU/g ιστού). Η θανατηφόρος δραστηριότητα εκφράζεται σε μονάδες ποντικιού (*Mouse Units MU*), όπου 1 MU ισοδυναμεί με 0.178 μg TTX και ορίζεται ως η ποσότητα τοξίνης που απαιτείται για να επιφέρει το θάνατο σε αρσενικά ποντίκια στελέχους ICE μάζας 20 g και σε χρονικό διάστημα 30 min έπειτα από μία ενδοπεριτοναϊκή ένεση [35].

Σε γενικές γραμμές τα θηλυκά είναι πιο τοξικά συγκριτικά με τα αρσενικά άτομα του *L. Sceleratus* με τα υψηλότερα επίπεδα τοξικότητας να καταγράφονται το μήνα Μάρτιο γεγονός που οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η τοξικότητα αρχίζει να αυξάνεται όσο πλησιάζει η περίοδος αναπαραγωγής. Η σοβαρότητα της δηλητηρίασης εξαρτάται από την ποσότητα TTX που καταναλώνεται και ο θάνατος εμφανίζεται συνήθως μετά από 6 – 24 h στο 60% των περιπτώσεων, αλλά μπορεί να συμβεί ακόμα και μετά από 17 min [35].



Εικόνα 10. Ωριμες ωσθήκες του *L. Sceleratus* [5].

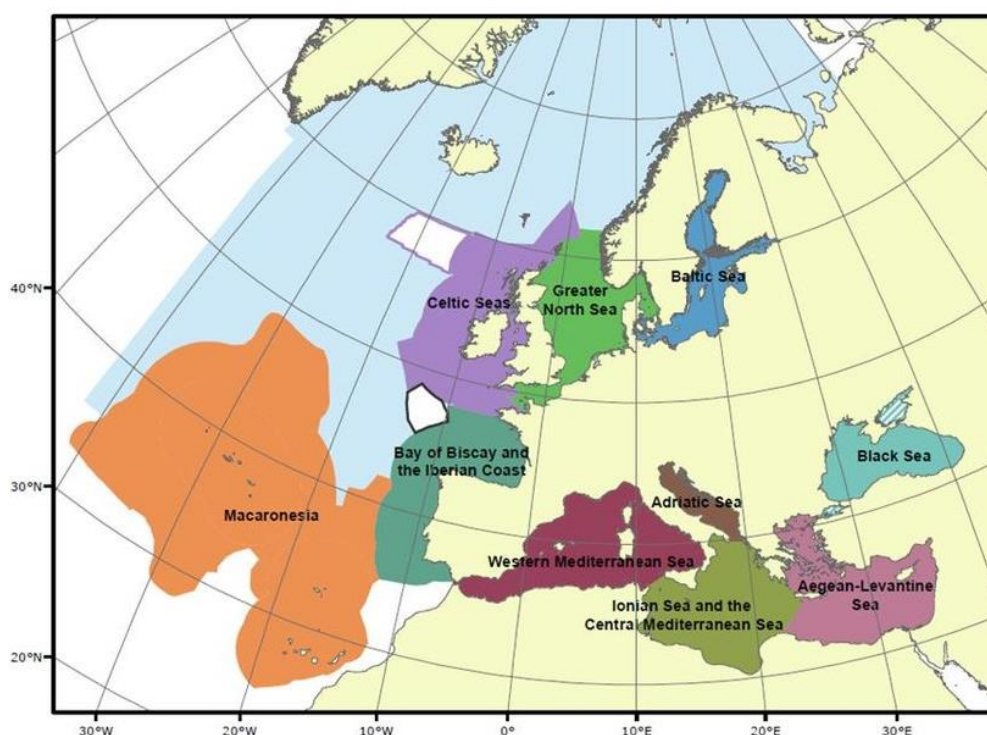
Σε περίπτωση λήψης TTX απαιτείται να πραγματοποιηθεί πλύση στομάχου τέσσερις ώρες μετά η οποία θα πρέπει να συνοδεύεται από συμπτωματικές και υποστηρικτικές θεραπείες (ενεργός άνθρακας, αλατούχο καθαρτικό και κλινική φροντίδα) [36]. Ωστόσο δεν υπάρχει θεμελιώδης θεραπεία που να αποβάλλει την τοξίνη εντελώς από το σώμα όπως ούτε και αντίδοτα ή αντί-τοξίνες.

Δυστυχώς στη Μεσόγειο έχουν καταγραφεί πολλές περιπτώσεις δηλητηρίασης από το συγκεκριμένο είδος καθώς παρά το γεγονός ότι έχει απαγορευτεί σε πολλές χώρες (Αίγυπτος, Λίβανος, Τουρκία) διατίθεται παράνομα στο εμπόριο [17].

2.2 *Pterois miles* (Bennett, 1828)

Το 2^ο είδος εισβολέα όπου έχει καταστροφικές συνέπειες για το οικοσύστημα στην ευρύτερη περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου είναι το *Pterois miles* (Bennett, 1828) ή αλλιώς λεοντόψαρο (lionfish). Το είδος *P.miles* συναντάται στην Ερυθρά Θάλασσα, τον Περσικό κόλπο και τον Ινδικό Ωκεανό (πλην της Δυτικής Αυστραλίας) [37]. Τα τελευταία χρόνια, μετά το άνοιγμα της διώρυγας του Σουέζ, παρατηρείται μια μετανάστευση ξενικών ειδών συμπεριλαμβανομένου και του λεοντόψαρου από την Ερυθρά Θάλασσα και τον Ινδικό Ωκεανό προς τη Μεσόγειο, όπου και έχουν αρχίσει να εγκαθίστανται [38].

Πλέον έχει εγκατασταθεί στην υποπεριοχή “*Aegean-Levantine Sea*”, η οποία ανήκει στην Οδηγία Πλαίσιο για τη Θαλάσσια Στρατηγική [39] (Εικόνα 11).

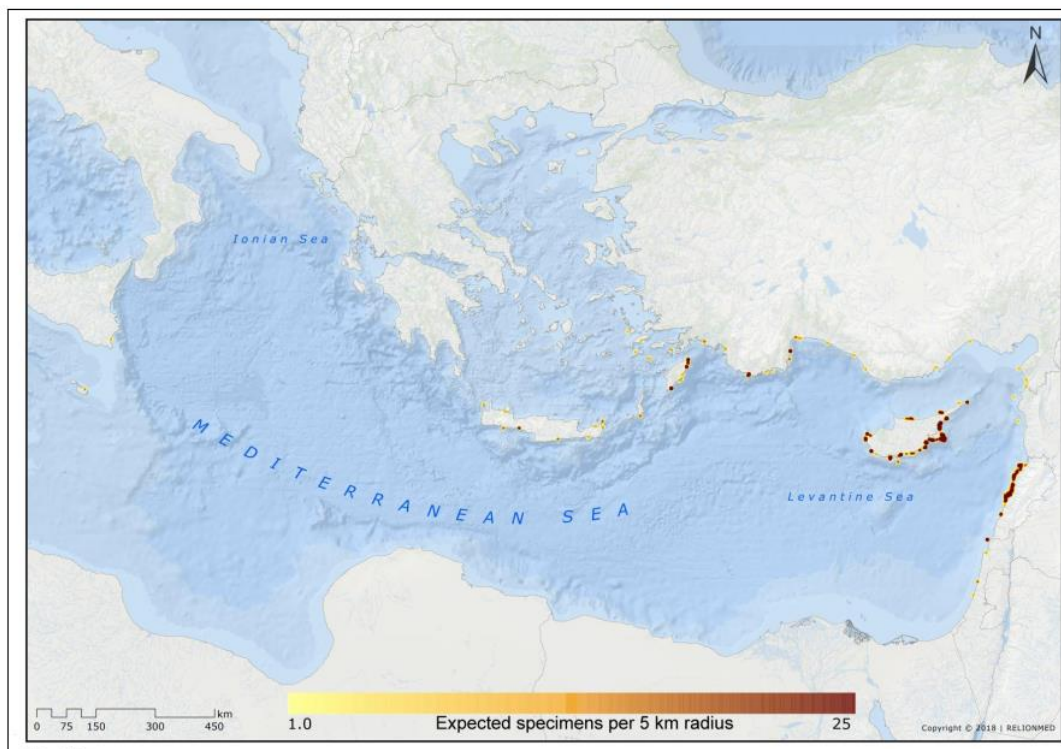


Εικόνα 11. Χάρτης των Ευρωπαϊκών περιοχών και υποπεριοχών της Οδηγίας Πλαίσιο για τη Θαλάσσια Στρατηγική (Marine Strategy Framework Directive (MSFD)) [40].

Καταγραφές για την ύπαρξη του έχουν γίνει στο Ιόνιο Πέλαγος, την Κεντρική Μεσόγειο και τις δυτικές υποπεριοχές της MSFD. Στην Εικόνα 12 παρουσιάζεται ο χάρτης χωρικής κατανομής του *P.Miles* με βάση όλες τις καταγραφές που έχουν γίνει στη βιβλιογραφία και το ερευνητικό πρόγραμμα EU-LIFE RELIONMED έως και τον Ιούλιο του 2018. Το 2019 έγιναν αναφορές για την ύπαρξη του λεοντόψαρου στο Βόρειο Ιόνιο Πέλαγος (Κεφαλονιά και Κέρκυρα) στα όρια με την Αδριατική Θάλασσα.

Πιο συγκεκριμένα το είδος *P.Miles* καθιερώθηκε στην Κύπρο το 2014-2015 [38] και στην Ελλάδα το 2016-2017. Όσον αφορά την Ελλάδα οι πρώτες καταγραφές έγιναν στην Κρήτη και τα Δωδεκάνησα, το 2018 έκανε την εμφάνισή του στη Νότια Πελοπόννησο και το 2019 στο Ιόνιο Πέλαγος [39]. Κατά τη διάρκεια του 2016-2019

οι πληθυσμοί λεοντόψαρων άρχισαν να κυριαρχούν σε βραχώδεις υφάλους για να φθάσουν σήμερα να αποτελούν ένα από τα πιο άφθονα είδη ιχθύων σε βάθη 2-30 m σε ορισμένες περιοχές της Κύπρου. Επίσης έχουν αρχίσει να εισβάλλουν και να εγκαθίστανται και σε βαθιά ύδατα όπως στην κοινότητα των κοραλλιών *Dendrophyllia ramea* (130-150 m).



Εικόνα 12. Χάρτης χωρικής κατανομής του P.Miles με βάση τις 668 αναφορές σχετικά με την ύπαρξη του που δημοσιεύθηκαν στην επιστημονική βιβλιογραφία και το πρόγραμμα RELIONMED (10/2012 – 07/2018) [41].

Το λεοντόψαρο είναι βρώσιμο ψάρι και μάλιστα με εξαιρετική γεύση με την προϋπόθεση βέβαια ότι θα έχει γίνει με σωστό τρόπο ο χειρισμός των ακάνθων του από την αλίευση μέχρι τον καθαρισμό και το μαγείρεμά του. Δυστυχώς λόγω της προσοχής όπου πρέπει να δίδεται στα αγκάθια του αποθαρρύνεται η εμπορία και κατανάλωση του στην Ελλάδα.

Παρά το γεγονός ότι έχουν ξεκινήσει κάποιες σχετικές πρωτοβουλίες ενημέρωσης και προώθησης η είσοδος του στην τοπική κουζίνα δεν είναι προς το παρόν ευρέως αποδεκτή από το καταναλωτικό κοινό.

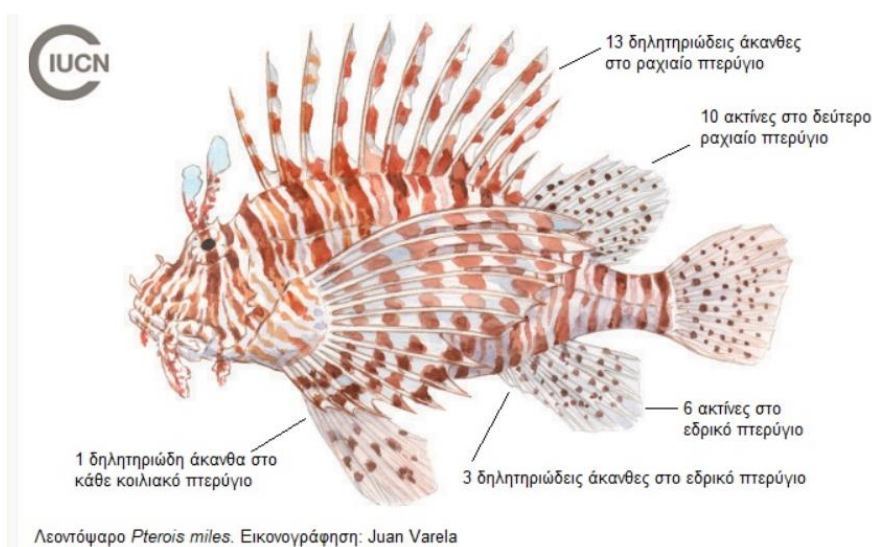
2.2.1 Βιολογία του *P.miles*

Το λεοντόψαρο *P.miles* ανήκει στην οικογένεια των Σκορπαινιδών (*Scorpaenidae*) και της υποοικογένειας των Πτεροϊνών. Έχει σχήμα ατρακτοειδές μετρίως συμπιεσμένο και χωρίς την παρουσία πλευρικής γραμμής (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Απεικόνιση του *P.miles*

Ο χρωματισμός του κυμαίνεται από εναλλασσόμενες κοκκινωπές έως μαυρισμένες και γκριζες ή άσπρες στενές ρίγες με συχνές σκοτεινές ζώνες στο κεφάλι και το κύριο σώμα του, χαρακτηριστικά τα οποία το καθιστούν ιδιαίτερα δημοφιλές μεταξύ των διακοσμητικών ψαριών. Διαθέτει 13 δηλητηριώδεις άκανθες στο ραχιαίο πτερύγιο, 9-11 ακτίνες στο δεύτερο ραχιαίο πτερύγιο, 6 ακτίνες στο εδρικό πτερύγιο, 3 δηλητηριώδεις άκανθες στο εδρικό πτερύγιο και 1 δηλητηριώδη άκανθα σε κάθε κοιλιακό πτερύγιο (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Απεικόνιση των ακάνθων και των ακτινών του *P.miles* [42].

Το κέρασ πάνω από το μάτι ενδέχεται κλιμακωτά να «αχνοφαίνεται». Οι ενήλικες φέρουν επίσης μικροσκοπικά αγκάθια στο μάγουλο και σκούρες ή λευκές κηλίδες στη μεσαία πτερύγια. Το μέσο μέγεθος των ενηλίκων (για δείγματα συνολικού μήκους μεγαλύτερο των 15 cm) είναι περίπου 11 cm². Οι ωτόλιθοι έχουν μήκος περίπου 0.5 cm και βρίσκονται μέσα στην ακουστική κάψουλα του κρανίου.

Σε γενικές γραμμές ο *P.miles* είναι ένα αργώς κινούμενο ψάρι που συνήθως βρίσκεται σε κοινότητες υφάλων [37]. Συνήθως κατοικεί μέσα σε τρύπες ή κάτω από ρωγμές και προεξοχές σε μια άνω προς τα κάτω θέση κατά τη διάρκεια της ημέρας και ενεργοποιείται το σούρουπο.

Ο *P.miles* διακρίνεται εύκολα από άλλα συγγενικά είδη με βάση τη μορφολογία. Εξαίρεση αποτελεί το συγγενές είδος *P. Volitans* το οποίο είναι αρκετά όμοιο και διακρίνεται κυρίως μέσω μικρών παραλλαγών όπως ο μικρότερος αριθμός ακτινών στο ραχιαίο και εδρικό πτερύγιο [43].

2.2.2 Δηλητήριο ακάνθων του *P.miles*

Το λεοντόψαρο αν και μπορεί να φαίνεται ιδιαίτερο λόγω του ελκυστικού του σχήματος κατατάσσεται στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας στη θαλάσσια πανίδα καθώς το τσίμπημά του αποτελεί απειλή για άλλες θαλάσσιες μορφές ζωής [44]. Οι αναφορές έχουν δείξει ότι είναι σε θέση να καταστρέψει τους κοραλλιογενείς υφάλους και να οδηγήσει σε αλλαγή της τροφικής αλυσίδα προκαλώντας επομένως ανισορροπίες στο θαλάσσιο οικοσύστημα.

Στα αγκάθια των λεοντόψαρων περιέχονται κάποιοι αδένες οι οποίοι εκκρίνουν ένα ιδιαίτερο τοξικό δηλητήριο. Αυτό αρχικά προκαλεί στο υποψήφιο θύμα μια αίσθηση καψίματος που διαρκεί περίπου 15-20 min. Στη συνέχεια εντός 3 h ακολουθεί παράλυση των άκρων ενώ καρδιαγγειακές, νευρομυϊκές και κυτταρολυτικές δυσλειτουργίες ενδέχεται να οδηγήσουν στον κυτταρικό θάνατο [45]. Επιπλέον, η δηλητηριώδης δράση του υπονομεύεται από την παρουσία τοξικών πρωτεϊνών, της ακετυλοχολίνης και άλλων δραστικών συστατικών όπως δηλητηρίων που σχηματίζουν πόρους [46].

Λόγω του αυξανόμενου ενδιαφέροντος για την εξάπλωση των ξενικών ειδών, και ειδικά για το *P.miles*, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές ερευνητικές εργασίες που ασχολούνται με το δηλητήριο που εκκρίνεται από τα αγκάθια του. Το 2013 έγινε μια πρώτη προσέγγιση για την ταυτοποίηση του δηλητηρίου των ακάνθων του [47]. Στην εργασία αυτή έγινε σύγκριση της ακατέργαστης πρωτεΐνης από τα αγκάθια στο ραχιαίο πτερύγιο (που είναι δηλητηριώδη) και από τις ακτίνες στο ραχιαίο και εδρικό πτερύγιο (που δεν περιέχουν δηλητήριο).

Για το πρωτεϊνικό μίγμα καθενός από τα δύο αυτά τμήματα του λεοντόψαρου πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμιδίου (*SDS-PAGE*) και συγκρίθηκαν οι μπάντες που προέκυψαν για τα διάφορα μοριακά βάρη της πρωτεΐνης. Οι κοινές μπάντες μεταξύ των δύο δειγμάτων δεν αποτελούσαν το δηλητήριο, εφόσον εμφανίζονταν και στο δείγμα από τις ακτίνες των πτερυγίων της ουράς τα οποία δεν είναι δηλητηριώδη. Επομένως οι μπάντες που εμφανίζονταν μόνο στο δείγμα από τα αγκάθια στη ράχη ενδεχομένως σχετίζονταν με το ζητούμενο δηλητήριο.

Για την επιβεβαίωση των παραπάνω οι μπάντες αυτές αποκόπηκαν και εξετάστηκε η κυτταροτοξικότητά τους. Από αυτές μία μπάντα που αντιστοιχούσε σε μοριακό βάρος περίπου 75 kDa βρέθηκε να διαθέτει κυτταροτοξικές ιδιότητες. Για την μπάντα αυτή πραγματοποιήθηκε Φασματομετρία Μάζας από την οποία έγινε η εξαγωγή ενός «Αποτυπώματος Πεπτιδικών Μαζών». Στο προκύπτον φάσμα εμφανίστηκαν κάποια χαρακτηριστικά θραύσματα-πεπτίδια της πρωτεΐνης τα οποία στη συνέχεια με αναζήτηση σε βάση δεδομένων ελέγχθηκε αν ταιριάζουν με πεπτίδια κάποιας πρωτεΐνης που έχει αναλυθεί στο παρελθόν. Μέσα από την αναζήτηση αυτή βρέθηκε ότι ταιριάζουν με αυτά των υπομονάδων α της πρωτεΐνης από το δηλητήριο των λεοντόψαρων *Pterois antennata* και *Pterois volitans*. Επομένως η πρωτεΐνη των 75 kDa ήταν αυτή που περιέχεται στο δηλητήριο του *P.miles*, η οποία μάλιστα παρουσίαζε πολύ μεγάλη ομοιότητα με τη δομή της αντίστοιχης τοξίνης των ειδών *P. antennata* και *P.volitans*.

Το 2017 σε μια νέα μελέτη που έγινε σε είδη *P.miles* και *P.volitans* επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα της αρχικής έρευνας καθώς και αυτή η ερευνητική ομάδα ανίχνευσε μια πρωτεΐνη (μονομερές κυτολυσίνης) με μοριακό βάρος περίπου 75 kDa, η οποία μάλιστα παρατήρησαν ότι βρίσκεται σε μικρότερη ποσότητα στα αγκάθια των νεαρών λεοντόψαρων συγκριτικά με τα αγκάθια των ενηλίκων [48]. Επίσης το πόρισμα της μελέτης αυτής ήταν ότι σύμφωνα με αναλύσεις DNA το δηλητήριο των λεοντόψαρων είναι ένα ετεροδιμερές με μοριακό βάρος περίπου 150 kDa και δομή παρόμοια με αυτή των τοξινών που υπάρχουν στις σκόρπαινες και στα πετρόψαρα.

Παρ' όλο που έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες για πλήρη ανάλυση της δομής του δηλητηρίου άλλων ειδών του γένους *Pterois*, για τον *P.miles* δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες. Για τα είδη *P.antennata*, *P.volitans* και *P.lunulata* έχει βρεθεί ακριβώς η αλληλουχία των αμινοξέων και στις δύο υπομονάδες του ετεροδιμερούς της τοξίνης τους και έχει γίνει κλωνοποίηση cDNA [49]. Επομένως από τη στιγμή όπου η δομή του δηλητηρίου-τοξίνης του *P.miles* είναι πολύ κοντά με εκείνη άλλων ειδών του γένους *Pterois* αξίζει να σημειωθούν οι αναλυτικές πληροφορίες όπου είναι γνωστές για τη δομή της τοξίνης των άλλων ειδών.

- Το δηλητήριο του *P.antennata* είναι ένα διμερές του οποίου η α υπομονάδα αποτελείται από 699 αμινοξέα που κωδικοποιούνται από ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 2097 ζευγών βάσεων, ενώ το cDNA που κωδικοποιεί την α υπομονάδα είναι 3404 ζεύγη βάσεων. Αντίστοιχα η β -υπομονάδα αποτελείται από 698 αμινοξέα που κωδικοποιούνται από ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 2094 ζευγών βάσεων, ενώ το cDNA που κωδικοποιεί την α υπομονάδα είναι 2817 ζεύγη βάσεων.
- Το δηλητήριο του *P.volitans* είναι ένα διμερές του οποίου η α υπομονάδα αποτελείται και αυτή από 699 αμινοξέα που κωδικοποιούνται από ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 2097 ζευγών βάσεων, ενώ το cDNA που κωδικοποιεί την α -υπομονάδα είναι 2519 ζεύγη βάσεων. Η β -υπομονάδα αποτελείται όπως και στο *P.antennata* από 698 αμινοξέα που κωδικοποιούνται από ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 2094 ζευγών βάσεων, ενώ το cDNA που κωδικοποιεί την α υπομονάδα είναι 2186 ζεύγη βάσεων.

- ο Το δηλητήριο του *P. lunulata*, όπως και στα δύο προηγούμενα είδη, αποτελείται από την α-υπομονάδα που διαθέτει 699 αμινοξέα και τη β-υπομονάδα που έχει 698 αμινοξέα. Η πρωτεΐνη της α-υπομονάδας προκύπτει από ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 2097 ζευγών βάσεων και το cDNA που την κωδικοποιεί αποτελείται από 2243 ζεύγη βάσεων. Αντίστοιχα, η πρωτεΐνη της β-υπομονάδας προκύπτει από ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 2094 ζευγών βάσεων και το cDNA που την κωδικοποιεί αποτελείται από 3074 ζεύγη βάσεων.

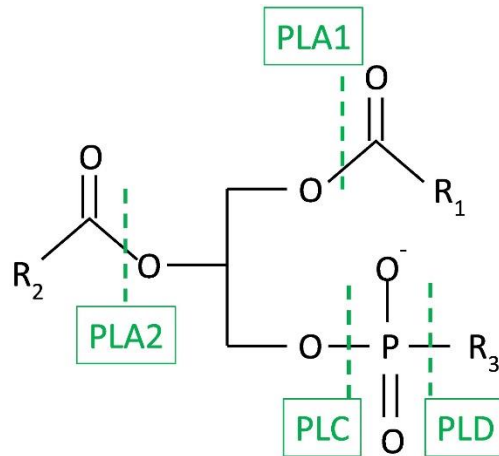
Επομένως μπορεί να υποτεθεί ότι και η τοξίνη του *P. miles* θα έχει πολύ κοντινές αλληλουχίες αμινοξέων.

2.2.2.1 Πιθανές κλινικές εφαρμογές του δηλητηρίου του *P. miles*

Ενδιαφέρουσες είναι οι πιθανές εφαρμογές στην ιατρική που μπορούν να βασιστούν στην τοξίνη του λεοντόψαρου, μιας και σύμφωνα με πειράματα, το ομογενοποιημένο μίγμα από τα αγκάθια του *P. miles* περιέχει ένα ισχυρό αντικαρκινικό συστατικό [47]. Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας που προκαλεί το ακατέργαστο μίγμα της πρωτεΐνης από τα αγκάθια του λεοντόψαρου χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες ανθρώπινων ηπατικών καρκινικών κυττάρων (HepG2) και χρήση MTT assay. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή σε υψηλές συγκεντρώσεις (1000 μg/ml και 500 μg/ml) μπορεί να προκαλέσει θάνατο στο 78% και 59% των κυττάρων αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί όμως πως και σε μικρές συγκεντρώσεις (7,8 μg/ml και 3,9 μg/ml) προκαλείται μεγάλη νέκρωση κυττάρων, της τάξης του 50% και 42% αντίστοιχα.

Σε άλλη πρόσφατη έρευνα βρέθηκε, επίσης, ότι η τοξίνη του *P. miles* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πιθανή θεραπεία για τη στυτική δυσλειτουργία [50]. Επιπλέον, στην τοξίνη του είδους *P. volitans* βρέθηκαν ενεργοί πηκτικοί παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως θεραπεία για αιματολογικές ασθένειες όπως η αιμορροφιλία [51]. Συνεπώς την ίδια ιδιότητα ίσως παρουσιάζει και η τοξίνη του είδους *P. miles*.

Επίσης στο εν λόγω δηλητήριο περιέχονται τα ένζυμα *PLA2s* τα οποία θεωρείται ότι διαθέτουν αντιβακτηριδιακούς παράγοντες. Οι φωσφολιπάσες A2 (*PLA2s*) είναι ένζυμα που διασπών το λιπαρό οξύ στη θέση δύο των φωσφολιπιδίων υδρολύοντας το δεσμό μεταξύ της «ουράς» του δεύτερου λιπαρού οξέος και του μορίου της γλυκερόλης (Εικόνα 15). Αυτή η συγκεκριμένη φωσφολιπάση αναγνωρίζει ειδικά τον δεσμό *sn-2* του ακυλίου των φωσφολιπιδίων και υδρολύει καταλυτικά τον δεσμό, απελευθερώνοντας αραχιδονικό και λυσοφωσφατιδικό οξύ.

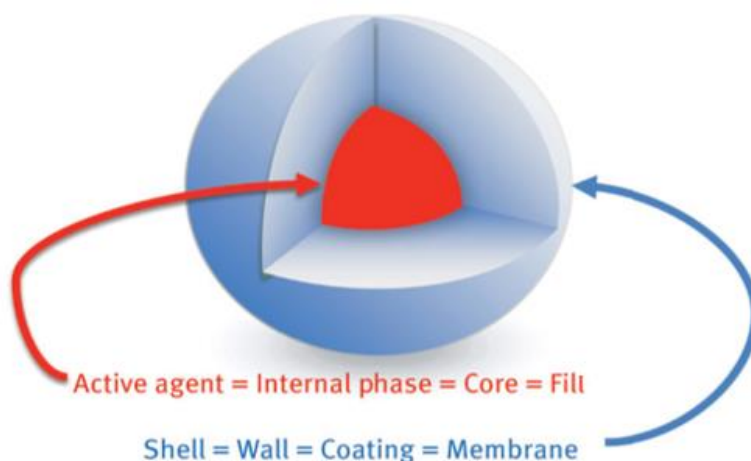


Εικόνα 15. Τοποθεσίες δράσης των φωσφολιπασών στα γλυκεροφωσφολιπίδια.

Τα ένζυμα *PLA2*, πέρα από το δηλητήριο του λεοντόψαρου, απαντώνται συνήθως σε ιστούς θηλαστικών, στα αραχνίδια, τα έντομα και το δηλητήριο του φιδιού [52]. Το δηλητήριο τόσο από φίδια όσο και από έντομα αποτελείται σε μεγάλο ποσοστό από μελιτίνη, η οποία είναι διεγερτικό του *PLA2*. Λόγω της αυξημένης παρουσίας και δραστηριότητας του *PLA2* το αραχιδονικό οξύ απελευθερώνεται δυσανάλογα από τη μεμβράνη του φωσφολιπιδίου με αποτέλεσμα να εμφανίζονται στο σημείο του τσιμπήματος η φλεγμονή και ο πόνος [53].

2.3 Επισκόπηση των Τεχνολογιών Ενθυλάκωσης

Η ενθυλάκωση ορίζεται ως μια διεργασία όπου ο κύριος στόχος της είναι ο εγκλεισμός μιας ουσίας ή ενός μίγματος ουσιών (core material) σε μια άλλη ουσία η οποία ουσιαστικά θα αποτελεί το μέσο εγκλεισμού (wall material). Η εγκλεισμένη ουσία εναλλακτικά στη διεθνή βιβλιογραφία καλείται πυρήνας, ενεργώς ουσία, εσωτερική ή ωφέλιμη φάση, ενώ το μέσο εγκλεισμού καλείται και ως επικάλυψη, μεμβράνη, κέλυφος, κάψουλα, υλικό του φορέα, εξωτερική φάση ή ακόμα και μήτρα [54] (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Παράδειγμα ενθυλάκωσης [55].

Η μικροενθυλάκωση είναι μια διεργασία κατά την οποία πολύ μικροσκοπικά σταγονίδια ή σωματίδια υγρού/στερεού υλικού επικαλύπτονται από μία συνεχής μεμβράνη πολυμερικού υλικού. Η μικροενθυλάκωση περιλαμβάνει τη βιοενθυλάκωση η οποία περιορίζεται περισσότερο στην παγίδευση μιας βιοδραστικής ουσίας (από το DNA σε ολόκληρο το κύτταρο ή ομάδα κυττάρων) με σκοπό τη βελτίωση της απόδοσης και της διάρκειας ζωής του [56].

Η ενθυλάκωση υπό την ευρύτερη έννοια εισήχθη αρχικά στον τομέα της Βιοτεχνολογίας με σκοπό να καταστήσει τις παραγωγικές διεργασίες πιο αποτελεσματικές καθώς η μήτρα γύρω από τα κύτταρα επιτρέπει τον πιο γρήγορο και αποτελεσματικό διαχωρισμό των παραγωγικών κυττάρων και μεταβολιτών. Τέτοιες τεχνολογίες αναπτύχθηκαν πριν από περίπου 70 χρόνια και παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον τόσο στη βιομηχανία φαρμάκων (ειδικά για τη διανομή φαρμάκων και εμβολίων) όσο και στη βιομηχανία τροφίμων [57].

2.3.1 Εφαρμογές Ενθυλάκωσης στη Βιομηχανία Τροφίμων

Όσον αφορά τον τομέα των τροφίμων η ενθυλάκωση είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τη βελτίωση της παροχής βιοδραστικών συστατικών (αντιοξειδωτικά, μέταλλα, βιταμίνες, φυτοστερόλες, λουτεΐνη, λιπαρά οξέα, λυκοπένιο) και ζωντανών κυττάρων (προβιοτικά). Στις περισσότερες περιπτώσεις ο εγκλεισμός αναφέρεται σαν μια τεχνολογία όπου τα εγκλεισμένα συστατικά καλύπτονται και προστατεύονται πλήρως μέσω ενός φυσικού φράγματος. Επίσης ορίζεται ως μία τεχνολογία συσκευασίας στερεών, υγρών ή αέριων υλικών σε μικρά κάψουλες που απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους σε ελεγχόμενους ρυθμούς για παρατεταμένες περιόδους και κάτω υπό συγκεκριμένες συνθήκες [58]. Τα παραγόμενα σωματίδια έχουν συνήθως διαμέτρους από μερικά nm έως μερικά mm.

Τα τελευταία χρόνια η βιομηχανία τροφίμων απαιτεί την προσθήκη λειτουργικών ενώσεων στα προϊόντα. Οι ενώσεις αυτές συνήθως είναι αρκετά επιρρεπής σε περιβαλλοντικές, μεταποιητικές και γαστρεντερικές συνθήκες. Ως εκ τούτου η τεχνολογία της ενθυλάκωσης υπόσχεται την αποτελεσματική προστασία της εγκλεισμένης ουσίας από όλους αυτούς του ανεπιθύμητους παράγοντες. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι όλες αυτές οι θερμοευαίσθητες ουσίες θα επωφεληθούν από τη διεργασία του εγκλεισμού καθώς θα επιβραδυνθούν οι διεργασίες υποβάθμισης-αποδόμησης τους (π.χ. οξείδωση ή υδρόλυση) [59].

Τέλος εκτός των παραπάνω η ενθυλάκωση μπορεί να εφαρμοστεί για την τροποποίηση των φυσικών χαρακτηριστικών του αρχικού υλικού ώστε:

- να διευκολύνεται ο χειρισμός τους,
- σε περίπτωση μίγματος να διαχωρίζονται τα στοιχεία που υπό άλλες συνθήκες θα αντιδρούσαν το ένα με το άλλο,
- να παρέχει μία επαρκή συγκέντρωση και ομοιόμορφη διασπορά του δραστικού παράγοντα.

Για την ενθυλάκωση στερεών υγρών ή αέριων διαφορετικών τύπων και ιδιοτήτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες ουσίες. Ενώσεις οι οποίες είναι ευρέως αποδεκτές σε άλλους τομείς (τομέας φαρμάκων, τομέας κοσμετολογίας κλπ) δεν είναι αποδεκτές στον τομέα των τροφίμων και αυτό διότι πολλές από αυτές τις ουσίες δεν έχουν πιστοποιηθεί ως «γενικά αναγνωρισμένες ως ασφαλή υλικά (Generally Recognized as Safe GRAS).

Τα σημαντικότερα κριτήρια για την επιλογή της κατάλληλης μήτρας στον Τομέα των Τροφίμων είναι η λειτουργικότητα που θα πρέπει να παρέχει στο τελικό προϊόν, πιθανοί περιορισμοί που επιβάλει το υλικό που εγκλείεται, η τελική συγκέντρωση εγκλεισμού, ο τύπος απελευθέρωσης, οι απαιτήσεις σταθερότητας και οι περιορισμοί στο κόστος. Το υλικό θα πρέπει να είναι βιοαποικοδομήσιμο και ικανό να σχηματίζει ένα εμπόδιο μεταξύ της εσωτερικής φάσης και του περιβάλλοντος χώρου. Η πλειονότητα των υλικών που χρησιμοποιούνται είναι βιομόρια και θα πρέπει:

- να παρέχουν τη μέγιστη προστασία στο υλικό του πυρήνα έναντι περιβαλλοντικών συνθηκών,
- να διατηρούνται ενεργά καθόλη τη διάρκεια της διεργασίας και αποθήκευσης,
- να μην αντιδρούν με το υλικό του πυρήνα,
- να έχουν καλά ρεολογικά χαρακτηριστικά σε υψηλή συγκέντρωση,
- να είναι εύκολα διαχειρίσιμα κατά τη διάρκεια της ενθυλάκωσης.

Μεταξύ όλων των υλικών τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα για εγκλεισμό σε εφαρμογές τροφίμων είναι τα εξής [54]:

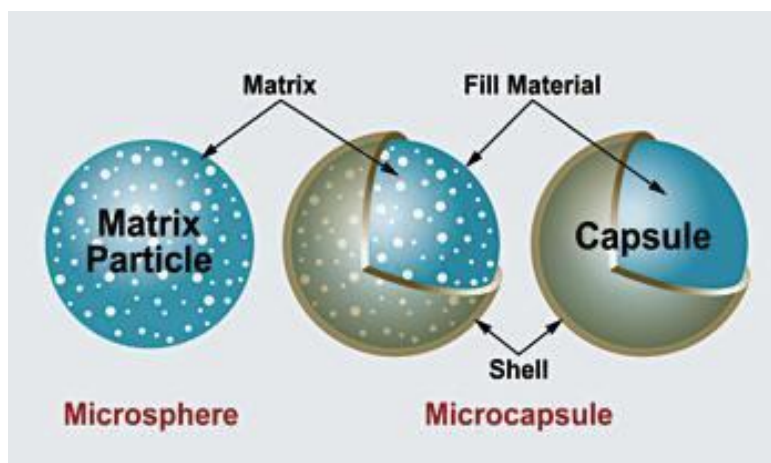
- ✓ το άμυλο με τα παράγωγά του (αμυλόζη, αμυλοπηκτίνη, δεξτρίνες, μαλτοδεξτρίνες, πολυδεξτρόζη, σιρόπια) και η κυτταρίνη με τα παράγωγά της,
- ✓ φυτικά εκκρίματα και εκχυλίσματα όπως αραβικό κόμμι, τραγακάνθινο κόμμι, το κόμμι *karaya*, το κόμμι *mesquite*, οι γαλακτομαννάνες, οι πηκτίνες και οι διαλυτοί πολυσακχαρίτες σόγιας,
- ✓ θαλάσσια εκχυλίσματα όπως καραγενάνες και αλγινικό άλας,
- ✓ μικροβιακοί και ζωικοί πολυσακχαρίτες όπως δεξτράνη, χιτοζάνη, ξανθάνη και γελλάνη,
- ✓ πρωτεΐνες και λιπίδια,
- ✓ πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP), παραφίνη, γομαλάκα (Shellac) και άλλα ανόργανα υλικά.

2.3.2 Εφαρμογές Ενθυλάκωσης στη Βιομηχανία Φαρμάκων

Για να επιτευχθεί η μέγιστη θεραπευτική αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου θα πρέπει να ικανοποιούνται ταυτόχρονα κάποιες βασικές συνθήκες. Συγκεκριμένα θα πρέπει η δραστική ουσία να παραδοθεί στοχευμένα στον ανθρώπινο ιστό, στη βέλτιστη ποσότητα, στην κατάλληλη χρονική στιγμή και με την πρόκληση όσο το δυνατόν λιγότερων παρενεργειών [60].

Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις σχετικά με την παροχή μιας θεραπευτικής ουσίας στη θέση στόχο με τρόπο παρατεταμένης ελεγχόμενης απελευθέρωσης. Μία τέτοια προσέγγιση περιλαμβάνει τη χρήση μικροσφαιριδίων ως φορέας φαρμάκων (Εικόνα 17). Τα εν λόγω μικροσφαιρίδια είναι χαρακτηριστικές σκόνες ελεύθερης ροής και αποτελούνται από πρωτεΐνες ή συνθετικά πολυμερή (τα οποία είναι βιοαποικοδομήσιμα) και το μέγεθός τους ιδανικά είναι μικρότερο των 200 μm.

Οι λόγοι για τους οποίους ο τομέας των φαρμάκων απαιτεί τη μικροενθυλάκωση είναι αμέτρητοι. Σε ορισμένες περιπτώσεις ο πυρήνας πρέπει να απομονώνεται από τον περιβάλλοντα χώρο, όπως για παράδειγμα στην απομόνωση βιταμινών από τις αρνητικές συνέπειες της έκθεσης σε οξυγόνο, επιβραδύνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την εξάτμιση ενός πτητικού εγκλεισμένου υλικού, βελτιώνοντας τις ιδιότητες ενός κολλώδους υλικού ή απομονώνοντας μία ανεπιθύμητη χημική αντίδραση μεταξύ του υλικού του πυρήνα και του υλικού επικάλυψης. Σε άλλες περιπτώσεις ο στόχος δεν είναι να απομονωθεί πλήρως η εγκλεισμένη ουσία αλλά να ελεγχθεί ο ρυθμός με τον οποίο αυτή αφήνει τη μικροκάψουλα, όπως στην ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων ή φυτοφαρμάκων.



Εικόνα 17. Απεικόνιση μικροσφαιριδίων και μικροκαψουλών [60].

Το πρόβλημα μπορεί να είναι τόσο απλό όσο η κάλυψη της γεύσης ή της οσμής της δραστικής ουσίας ή τόσο περίπλοκο όσο η αύξηση της επιλεκτικότητας διεργασιών προσρόφησης και εκχύλισης.

Οι μηχανισμοί απελευθέρωσης ενός φαρμάκου από μικροσφαιρίδια συνοψίζονται στους εξής τέσσερις [61]:

- 1) Ελεγχόμενη υποβάθμιση μονολιθικού συστήματος,
- 2) Ελεγχόμενη διάχυση μονολιθικού συστήματος,
- 3) Σύστημα ελεγχόμενης διάχυσης
- 4) Διάβρωση

Στην πρώτη περίπτωση το φάρμακο διαλύεται ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνεια της μήτρας και η διαδικασία της διάχυσης είναι αργή συγκριτικά με την υποβάθμιση της μήτρας. Στη δεύτερη περίπτωση ο δραστικός παράγοντας απελευθερώνεται μέσω διάχυσης πριν ή ταυτόχρονα από την υποβάθμιση της πολυμερούς μήτρας. Στην τρίτη περίπτωση ο δραστικός παράγοντας εγκλείεται μέσω μιας μεμβράνης η οποία ελέγχει το ρυθμό με τον οποίο διαχέεται η δραστική ουσία. Επίσης η μεμβράνη αυτή διαβρώνεται μόνο μετά την ολοκλήρωση της όλης διαδικασίας. Τέλος η διάβρωση του υλικού επικάλυψης λόγω του pH και της ενζυμικής υδρόλυσης προκαλεί απελευθέρωση του φαρμάκου μόνο με την κατάλληλη μήτρα όπως ο μονοστεατικός εστέρας της γλυκερίνης, το κερί της μέλισσας, η στεαρυλική αλκοόλη κ.α.

Για τη διεργασία του εγκλεισμού χρησιμοποιούνται γενικά υδρόφιλα και υδρόφοβα πολυμερή (ή ένας συνδυασμός αυτών). Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα υλικά που χρησιμοποιούνται σαν μήτρες στον τομέα των φαρμάκων είναι τα εξής:

- Υδατοδιαλυτές ρητίνες: ζελατίνη, αραβικό κόμμι, άμυλο, PVP, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη, υδροξυαιθυλοκυτταρίνη, μεθυλοκυτταρίνη, αραβινογαλακτάνη, πολυβινυλική αλκοόλη, πολυακρυλικό οξύ
- Αδιάλυτες στο νερό ρητίνες: αιθυλοκυτταρίνη, πολυαιθυλένιο, πολυαμίδιο (νάιλον), αιθυλενικός οξικός βινυλεστέρας, νιτρική κυτταρίνη, σιλκόνες,
- Κεριά και λιπίδια: παραφίνη, καρναουβικό κερί (κερί φοίνικα), κερί Spermaceti (κηρώδης ουσία που βρίσκεται στις κοιλότητες της κεφαλής της φάλαινας),

κερί μέλισσας, στεατικό οξύ, στεαρυλική αλκοόλη, μονοστεατικός εστέρας της γλυκερίνης

- Εντερικές ρητίνες: γομαλάκα (Shellac), φθαλική οξική κυτταρίνη, ζεΐνη

2.3.3 Εφαρμογές Ενθυλάκωσης στη Βιομηχανία της Κοσμετολογίας

Ο τομέας των καλλυντικών και των προϊόντων προσωπικής φροντίδας είναι μια διεθνής αγορά πολλών δισεκατομμυρίων δολαρίων όπου τα τελευταία χρόνια έχει γνωρίσει μεγάλη άνθηση [62]. Η επιτυχία σε έναν τόσο ανταγωνιστικό και απαιτητικό κλάδο δεν είναι εύκολη υπόθεση. Συνεπώς τα προϊόντα πρέπει να διαφοροποιούνται κάτι το οποίο μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση αναδυόμενων τεχνολογιών, όπως η μικροενθυλάκωση [63].

Τα προϊόντα κοσμετολογίας και προσωπικής φροντίδας συχνά περιέχουν δραστικές ουσίες που είναι ασταθείς και ευαίσθητες στη θερμοκρασία, το pH, το φως και την οξείδωση. Οι εν λόγω ουσίες πολύ εύκολα μπορεί να υποστούν ανεπιθύμητες αντιδράσεις οι οποίες οδηγούν στη μείωση ή ακόμα και απώλεια της αποτελεσματικότητάς τους γεγονός όπου υποβαθμίζει σε σημαντικό βαθμό το τελικό προϊόν. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται οι τεχνολογίες μικροενθυλάκωσης με σκοπό την αύξηση της σταθερότητας, την προστασία από την υποβάθμιση, καθώς και τον έλεγχο του ρυθμού απελευθέρωσης των δραστικών συστατικών. Επιπλέον η τοπική και διαδερμική μεταφορά των δραστικών συστατικών, που περιέχουν τα προϊόντα της κοσμετολογίας, απαιτεί ασφαλή και μη τοξικά μέσα έτσι ώστε να φτάσει στις περιοχές στόχου στο δέρμα.

Η σωστή επιλογή της μήτρας είναι πρωταρχικής σημασίας καθώς επηρεάζει την αποτελεσματικότητα του εγκλεισμού και τη σταθερότητα των μικροκαψουλών. Οι παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή του υλικού επικάλυψης είναι η τοξικότητα, η βιοσυμβατότητα, η σταθερότητα, το ιξώδες με τις μηχανικές ιδιότητες, η συμβατότητα μεταξύ του δραστικού συστατικού και της μήτρας, η απελευθέρωση του δραστικού συστατικού στο δέρμα, η ενίσχυση της ενεργού διείσδυσης στην κεράτινη στιβάδα, το προβλεπόμενο μέγεθος σωματιδίων, οι μικροσκοπικές ιδιότητες της επιφάνειας των μικροσωματιδίων και το κόστος.

Τα υλικά ενθυλάκωσης μπορούν να επιλεγούν από μια μεγάλη ποικιλία φυσικών και συνθετικών πολυμερών. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα υλικά περιλαμβάνουν [64]:

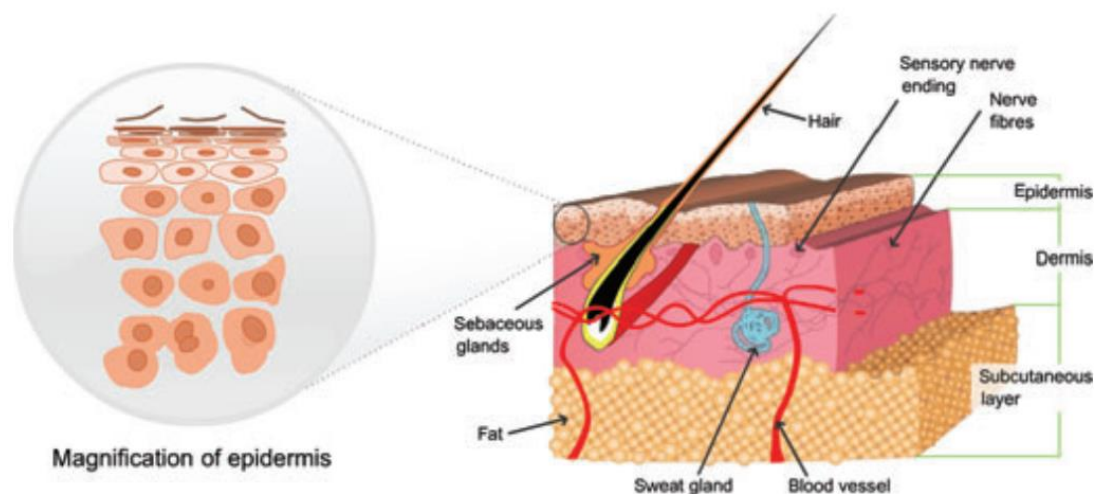
- πολυσακχαρίτες (κόμμεα, άμυλα, κυτταρίνες, κυκλοδεξτρίνες, χιτοζάνη),
- πρωτεΐνες (ζελατίνη, καζεΐνη, πρωτεΐνες σόγιας),
- λιπίδια (κεριά, παραφίνη, έλαια),
- συνθετικά πολυμερή (ακρυλικά πολυμερή, πολυβινυλική αλκοόλη, PVP),
- ανόργανα υλικά όπως πυριτικά άλατα, άργιλοι και πολυφωσφορικά

Στο σημείο αυτό όμως αξίζει να σημειωθεί ότι προτιμάται η χρήση βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών σε εφαρμογές καλλυντικών έναντι μη βιοαποικοδομήσιμων [65]. Τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή δεν αντιδρούν όταν έρχονται σε επαφή με το ανθρώπινο σώμα και μπορούν να διασπαστούν ή να μεταβολιστούν και να απομακρυνθούν από το σώμα μέσω φυσιολογικών μεταβολικών μονοπατιών. Αντιθέτως τα μη βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή θα μπορούσαν ενδεχομένως να συσσωρευτούν σε διάφορους ιστούς του σώματος και να προκαλέσουν ερεθισμό. Ο συνήθης μηχανισμός για την αποικοδόμηση των βιοαποικοδομήσιμων

πολυμερών είναι μέσω υδρόλυσης ή ενζυμικής διάσπασης των ασταθών δεσμών μεταξύ των ετεροατόμων [66]. Για χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές το βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές πρέπει επίσης να είναι βιοσυμβατό. Η χημική φύση των προϊόντων αποδόμησης, παρά το ίδιο το προϊόν, είναι συχνά αυτό που επηρεάζει τη βιοσυμβατότητα.

2.3.3.1 Δομή του δέρματος

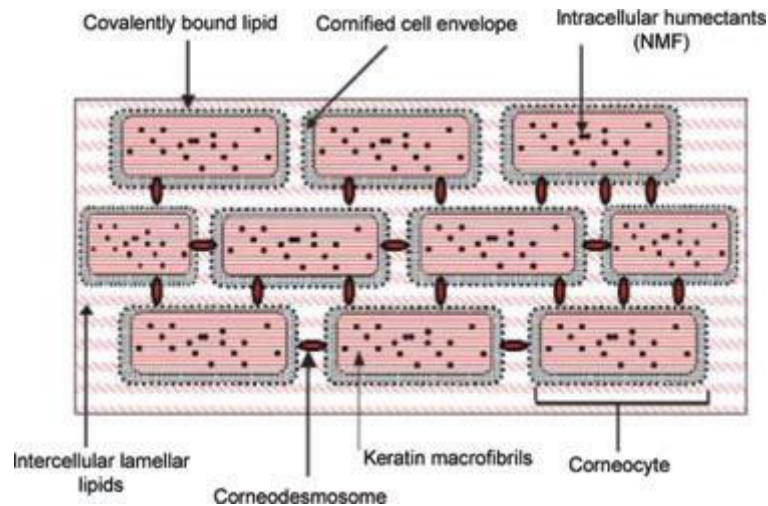
Το ανθρώπινο δέρμα αποτελείται από πολλά διαφορετικά στρώματα (Εικόνα 18). Η επιδερμίδα είναι το πιο απομακρυσμένο στρώμα και δρα ως προστατευτικό περίβλημα από περιβαλλοντικές επιδράσεις. Αποτελείται από πολλά στρώματα που ξεκινούν από την κεράτινη στιβάδα έως το βασικό κυτταρικό τοίχωμα και συνεχώς αναγεννάται.



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση (τομή) του ανθρώπινου δέρματος [67].

Το χόριο (dermis) εντοπίζεται κάτω από την επιδερμίδα και περιέχει κολλαγόνο και γλυκοζαμινογλυκάνες. Στο στρώμα αυτό συντίθεται το κολλαγόνο και η ελαστίνη που περιέχουν τα αιμοφόρα αγγεία, τα νεύρα, οι ιδρωτοποιοί αδένες, τα τριχοθυλάκια και οι σμηγματογόνοι αδένες.

Το υποδόριο στρώμα περιέχει το λιπώδη ιστό (υποδόριο λίπος) και είναι αυτό που λειτουργεί ως θερμικό φράγμα. Η κεράτινη στιβάδα είναι το άνω στρώμα (10-20 μm) και αποτελεί μία μήτρα πλούσια σε λιπίδια που αποτελείται κυρίως από κηραμίδια, χοληστερόλη και λιπαρά οξέα που συναρμολογούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίσουν μία πολυστρωματική δομή διπλής στιβάδας. Σύμφωνα με το μοντέλο του «τούβλου και κονιάματος», το οποίο χρησιμοποιείται συχνά για να περιγράψει τη δομή της κεράτινης στιβάδας, τα τούβλα αντιπροσωπεύουν τα πλούσια σε πρωτεΐνη κύτταρα όπου είναι ενσωματωμένα στις ενδοκυτταρικές περιοχές λιπιδίων (κονίαμα) [68] (Εικόνα 19).



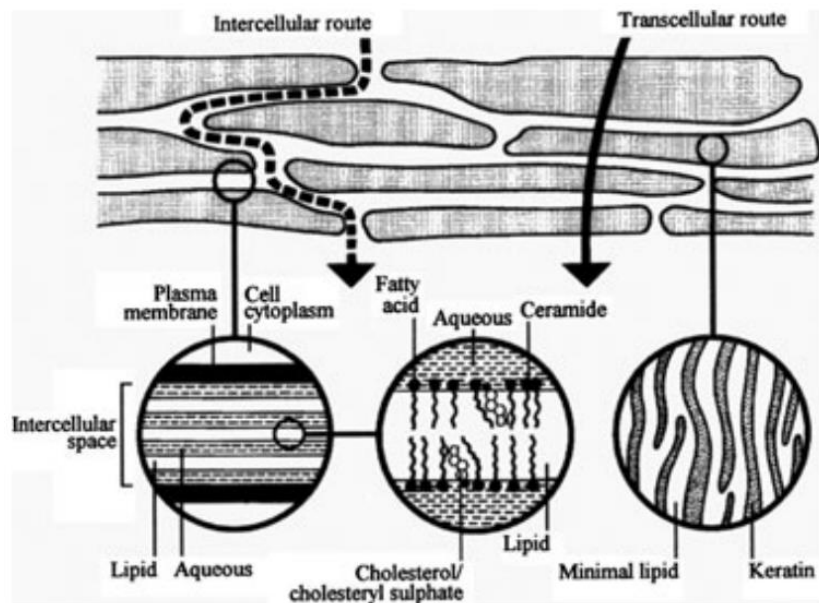
Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση του μοντέλου τούβλου και κονιάματος της κεράτινης στιβάδας [69].

Τα κορνεοσώματα (corneodesmosomes) δρουν για τη σύνδεση των γειτονικών κερατινοκυττάρων και παρέχουν δομική ακεραιότητα στην κεράτινη στιβάδα. Μεγάλες διακυμάνσεις στη διαπερατότητα μπορούν να παρατηρηθούν σε διαφορετικές περιοχές του σώματος (π.χ. πρόσωπο έναντι ποδιών ή έναντι των παλαμών) που μαζί με παράγοντες όπως η ηλικία και το εξωτερικό περιβάλλον διαμορφώνουν τη λειτουργία του φραγμού του δέρματος. Το λιπόφιλο στρώμα της στιβάδας αυτής περιέχει περίπου 13% νερό σε αντίθεση με την επιδερμίδα η οποία καθίσταται σημαντικά πιο υδρόφιλη (50% νερό). Η περιεκτικότητα σε νερό στο χόριο είναι ακόμη πιο υψηλή (70% νερό) [70].

Τα εξαιρετικά λιπόφιλα δραστικά συστατικά δεν μεταφέρονται καλά κατά μήκος της εξαιρετικά λιπόφιλης κεράτινης στιβάδας και ειδικά εντός της πιο υδατικής επιδερμίδας. Συνεπώς είναι εξαιρετικά σημαντικό να κατανοηθούν οι ιδιότητες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχεδιασμό φορέων με στόχο την επιθυμητή μεταφορά της δραστικής ουσίας από το καλλυντικό σκεύασμα στο ανθρώπινο δέρμα.

Υπάρχουν διάφορα «μονοπάτια» για τη μεταφορά μορίων μέσω του δέρματος (Εικόνα 20). Η ενδοκυτταρική οδός εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των κυττάρων μέσω των λιπιδικών διπλών στρωμάτων ακολουθώντας μια ελικοειδή διαδρομή διείσδυσης. Αντιθέτως διακυτταρικές οδοί μπορεί να εμφανιστούν κατευθείαν μέσω των κυττάρων.

Η μεταφορά μορίων μέσω της επιδερμίδας περιορίζεται σε μόρια χαμηλού μοριακού βάρους ($< 500 Da$) και μέτριας λιποφιλότητας (συντελεστές κατανομής K_o/K_w μεταξύ 1 και 3). Επίσης πρέπει να εμφανίζουν αρκετή διαλυτότητα στην περιοχή των λιπιδίων της κεράτινης στιβάδας ενώ ταυτόχρονα πρέπει να εξακολουθούν να διατηρούν επαρκή την υδρόφιλη φύση τους ώστε να επιτρέπουν το διαχωρισμό στην επιδερμίδα.



Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση των δύο ειδών διείσδυσης μέσω της κεράτινης στιβάδας [71].

2.3.4 Τεχνικές Μίκρο και Νάνο-Ενθυλάκωσης

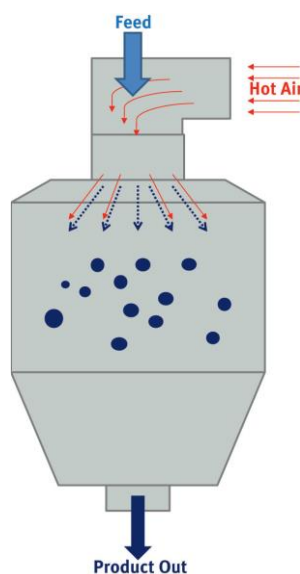
Η επιλογή της μεθόδου ενθυλάκωσης είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη μικρο-ή νάνο-δομών εγκλεισμού. Γενικά ακολουθούνται δύο τύποι προσεγγίσεων: η προσέγγιση από πάνω προς τα κάτω και η προσέγγιση από κάτω προς τα πάνω [72].

Η προσέγγιση από πάνω προς τα κάτω περιλαμβάνει τη μετατροπή και διαμόρφωση μεγάλων δομημένων υλικών σε μικρότερα μέσω εξωτερικών μηχανικών δυνάμεων διάρρηξης. Η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει τεχνικές γαλακτωματοποίησης, γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη και φυγοκεντρικής εκβολής. Είναι κατάλληλες για εγκλεισμό υδρόφιλων και υδρόφοβων ενώσεων αλλά απαιτούν εξειλιγμένα εργαλεία (π.χ. ομογενοποιητή). Επίσης δε μπορούν να ελέγξουν σε ικανοποιητικό βαθμό το μέγεθος και τη δομή των σωματιδίων και ισχύουν μόνο για περιορισμένους τύπους μήτρας [73].

Από την άλλη πλευρά η προσέγγιση από κάτω προς τα πάνω αναφέρεται στην ανάπτυξη μεγάλων σωματιδίων με τη σύνδεση μορίων ή μικρών σωματιδίων μέσω αυτοσυναρμολόγησης και αυτοοργάνωσης των μορίων-σωματιδίων. Τα αυτοσυναρμολογούμενα μόρια ή σωματίδια μπορούν να επηρεαστούν από το pH, τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση και την ιοντική ισχύ, με συνέπεια να απαιτούν ειδική μεταχείριση. Η προσέγγιση από κάτω προς τα πάνω περιλαμβάνει τη ξήρανση με ψεκασμό (spray drying), τη ξήρανση υπό κατάψυξη (freeze drying), την τεχνική του υπερκρίσιμου ρευστού, τεχνικές σχηματισμού συμπλόκων εγκλεισμού (inclusion complex), τεχνικές όπου χρησιμοποιούνται κολλοειδή διαλύματα (coacervation) την ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning), τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό (electrospraying) κ.α. Τέλος αξίζει να σημειωθεί πως οι τεχνικές αυτές καταναλώνουν λιγότερη ενέργεια και έχουν μεγαλύτερο έλεγχο της κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων σε σύγκριση με το προσεγγίσεις από πάνω προς τα κάτω.

2.3.4.1 Ξήρανση με ψεκασμό (*spray drying*)

Η ξήρανση με ψεκασμό αποτελεί μία από τις πιο εκτεταμένες εφαρμοζόμενες τεχνικές μικροενθυλάκωσης. Είναι μια απλή, γρήγορη και σχετικά χαμηλού κόστους διεργασία με το κυριότερο πλεονέκτημά της να είναι η ικανότητα χειρισμού ασταθών υλικών λόγω του σύντομου χρόνου επαφής τους στη συσκευή ξήρανσης. Χρησιμοποιείται ως τεχνική μικροενθυλάκωσης όταν ένα δραστικό υλικό διαλύεται ή εναιωρείται σε τήγμα ή σε ένα πολυμερικό διάλυμα με αποτέλεσμα να παγιδεύεται στο αποξηραμένο σωματίδιο [60]. Συγκεκριμένα κατά τη διεργασία της ξήρανσης με ψεκασμό η υγρή φάση (γαλάκτωμα, εναιώρημα ή διάλυμα) αναγκάζεται να σχηματίσει σταγονίδια μέσω του ψεκαστήρα ή του ακροφύσιου ψεκασμού (Εικόνα 21).



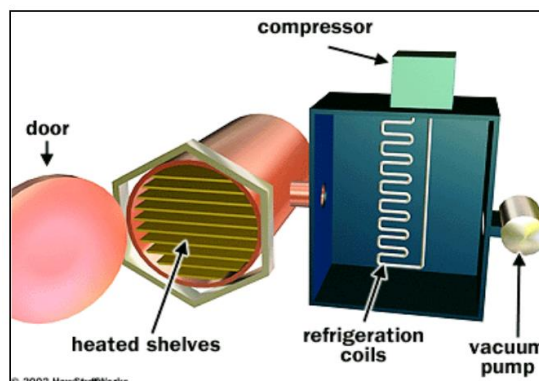
Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση της βασικής διεργασίας ξήρανσης με ψεκασμό [55].

Στο προηγμένο ανεπτυγμένο τμήμα της συσκευής τα σταγονίδια ξηραίνονται με ζεστό αέρα, δημιουργούνται και συλλέγονται σαν στερεοποιημένες κάψουλες.

2.3.4.2 Ξήρανση υπό κατάψυξη (*freeze drying*)

Η ξήρανση υπό κατάψυξη αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τη μικροενθυλάκωση θερμοευαίσθητων ενώσεων. Είναι μια λειτουργία πολλαπλών σταδίων η οποία αποτελείται από τρία στάδια (κατάψυξη, πρωτογενή ξήρανση και δευτερογενή ξήρανση). Κατά το στάδιο της κατάψυξης μετατρέπεται το μεγαλύτερο μέρος του νερού σε πάγο. Στη συνέχεια ο πάγος απομακρύνεται μέσω εξάχνωσης (πρωτογενή ξήρανση) σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία και πίεση. Η χρονική διάρκεια του σταδίου αυτού ποικίλει ανάλογα με τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του δείγματος και μπορεί να χρειαστούν από μερικές ώρες έως και αρκετές ημέρες. Η δευτερογενής ξήρανση περιλαμβάνει την απομάκρυνση του νερού που δεν κατάφερε να παγώσει μέσω εκρόφησης. Το στάδιο αυτό συνεχίζεται έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή περιεκτικότητα σε υγρασία [74]. Η ξήρανση υπό κατάψυξη είναι μια αποτελεσματική τεχνική ξήρανσης για τη σταθεροποίηση ναοκαψουλών. Μπορεί να διατηρήσει το μέγεθος των σωματιδίων σε νάνο-κλίμακα, να βελτιώσει τη σταθερότητα

της δραστικής ένωσης και να οδηγήσει σε καλύτερη απόδοση εγκλεισμού. Στην Εικόνα 22 παρουσιάζεται μια τυπική διάταξη ξήρανσης υπό κατάψυξη η οποία αποτελείται από έναν θάλαμο με πολλά ράφια προσαρτημένα σε μονάδες θέρμανσης, ένα πηνίο κατάψυξης συνδεδεμένο με έναν συμπιεστή ψυγείου και μία αντλία κενού.



Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση διάταξης ξήρανσης υπό κατάψυξη [75].

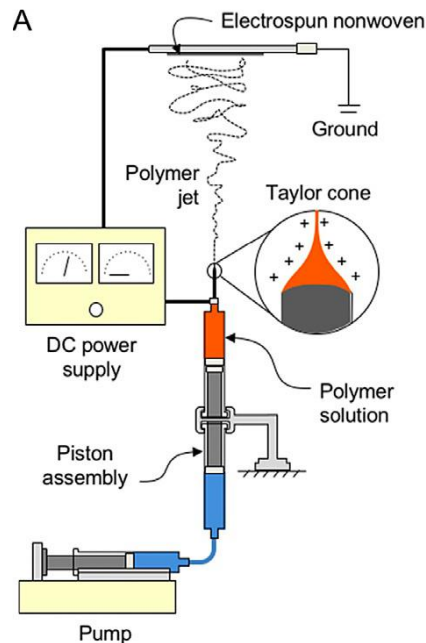
2.3.4.3 Ηλεκτροϋδροδυναμικές διεργασίες

Η ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning) είναι μια τεχνική σχηματισμού ινών που εκμεταλλεύεται την ηλεκτροστατική δύναμη προκειμένου να σχηματίσει πολυμερή υπό τη μορφή συνεχών ινών. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα των ινών αυτών είναι το εξαιρετικά λεπτό πάχος τους, συνήθως της τάξης των εκατοντάδων νανομέτρων, που βρίσκονται μεταξύ των διαστάσεων των νανοσωληνών άνθρακα και των μικροϊνών της κλωστοϋφαντουργίας. Ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός (electrospraying) είναι μία συγγενής τεχνική η οποία εκμεταλλεύεται και αυτή τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις αλλά για το σχηματισμό λεπτών σταγονιδίων.

Τις τελευταίες δεκαετίες οι δύο προαναφερθείσες τεχνικές, γνωστές και ως ηλεκτροϋδροδυναμικές διεργασίες, χρησιμοποιούνται κατά κόρον έναντι άλλων τεχνικών εγκλεισμού καθώς εμφανίζουν πληθώρα πλεονεκτημάτων. Συγκεκριμένα προσφέρουν τη δυνατότητα οικονομικής παραγωγής υψηλής απόδοσης νάνο και μικροσωματιδίων/ινών χωρίς τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών όπως παραδείγματος χάρη στην ξήρανση με ψεκασμό. [76]. Επίσης δεν απαιτείται περαιτέρω στάδιο ξήρανσης αφού τα σωματίδια ξηραίνονται στιγμιαία κατά τη διάρκεια της διεργασίας και υπάρχει ενισχυμένος έλεγχος της κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων με τη δυνατότητα παραγωγής οιονεί μονοδισπαρμένων σωματιδίων [77]. Τέλος αν και το electrospraying μέσω ενός ακροφύσιου (uniaxial process) έχει χαμηλή απόδοση, η ευελιξία της τεχνικής επιτρέπει τη χρήση πολλών ακροφυσίων παράλληλα (coaxial process).

2.3.4.3.1 Ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning)

Κατά την ηλεκτροστατική ινοποίηση απαιτείται πρώτα η διαλυτοποίηση του πολυμερούς σε ένα συμβατό διαλύτη, μαζί με τα κατάλληλα πρόσθετα, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα θερμοδυναμικά σταθερό διάλυμα πολυμερούς (*dope solution*). Μία τυπική διάταξη electrospinning περιλαμβάνει μία υψηλή τάση συνεχούς ρεύματος, μία/δύο σύριγγες με μεταλλική βελόνα και μία γειωμένη επιφάνεια συλλογής. Το διάλυμα αντλείται μέσω της σύριγγας σε μία μεταλλική βελόνα η οποία είναι συνδεδεμένη σε ένα θετικό ή αρνητικό ηλεκτρόδιο τροφοδοσίας συνεχούς ρεύματος (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Σχηματική αναπαράσταση μιας διάταξης electrospinning [76].

Ένας ηλεκτρικός γειωμένος συλλέκτης τοποθετημένος σε απόσταση που κυμαίνεται από αρκετά έως δεκάδες εκατοστά μακριά από τη μεταλλική βελόνα δημιουργεί ένα ηλεκτρικό πεδίο (συνήθως $1 - 5 \text{ kV/cm}$) το οποίο με τη σειρά του προκαλεί ένα λεπτό, φορτισμένο πίδακα (jet) διαλύματος πολυμερούς που εκβάλλεται από την άκρη της βελόνας. Η κωνική γεωμετρία της προκύπτουσας σταγόνας είναι γνωστή ως «κώνος Taylor» και πήρε το όνομά της από τον *Geoffrey Taylor* που μελέτησε το ηλεκτροστατικό φαινόμενο των ρευστών με μεγάλη λεπτομέρεια κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1960 [78],[79].

Η γεωμετρία του κώνου *Taylor* εξαρτάται από την εφαρμοζόμενη τάση, τον ρυθμό ροής της τροφοδοσίας και τη διαμόρφωση του ηλεκτροδίου. Οι ιδιότητες του υγρού και συγκεκριμένα η ηλεκτρική αγωγιμότητα, το ιξώδες και η επιφανειακή τάση είναι καθοριστικοί παράγοντες που υπαγορεύουν τη δυνατότητα του πολυμερικού διαλύματος να σχηματίσει ίνες [80]. Πάνω από μια κρίσιμη εφαρμοζόμενη τάση η δημιουργία ηλεκτροστατικής αποθητικής φόρτισης ξεπερνά την επιφανειακή τάση του διαλύματος σχηματίζοντας ένα ηλεκτρικό λεπτό πίδακα που εκπέμπεται από την

κορυφή του κώνου *Taylor* και επιταχύνεται (με τιμές επιτάχυνσης έως και 600 m/s^2) προς τον γειωμένο συλλέκτη.

2.3.4.3.2 Ηλεκτροστατικός ψεκασμός (electrospraying)

Η αρχή της διεργασίας του electrospraying βασίζεται στη θεωρία των φορτισμένων σταγονιδίων, η οποία δηλώνει ότι αν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο πάνω σε μία υγρή σταγόνα που βγαίνει από ένα τριχοειδή σωλήνα τότε η διεπιφάνεια του σταγονιδίου είναι δυνατόν να παραμορφωθεί [81]. Η αρχή λειτουργίας είναι ίδια με αυτή του electrospraying καθώς το ηλεκτρικό φορτίο παράγει ηλεκτροστατική δύναμη η οποία ανταγωνίζεται την επιφανειακή τάση του σταγονιδίου με αποτέλεσμα το σχηματισμό του κώνου *Taylor* γεγονός όπου είναι χαρακτηριστικό ενός φορτισμένου σταγονιδίου. Το πλεόνασμα φορτίου εν συνεχεία διασκορπίζεται και μικρότερα φορτισμένα σταγονίδια (στη μικρο-νανο-κλίμακα) εξάγονται από το αρχικό σταγονίδιο μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο το φορτίο του χωρίς να μειώνεται σημαντικά η μάζα του. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια του electrospraying δεν είναι προφανές ότι θα σχηματιστεί ο κώνος *Taylor*. Για να γίνει αυτό θα πρέπει να ικανοποιούνται ταυτόχρονα κάποιες βασικές συνθήκες λειτουργίας (κατάλληλη εφαρμοζόμενη τάση, σωστή απόσταση μεταξύ της μεταλλικής βελόνας και του γειωμένου συλλέκτη, κατάλληλη συγκέντρωση του διαλύματος και άλλα πολλά που θα αναλυθούν στη συνέχεια). Είναι προφανές ότι η παρουσία του κώνου *Taylor* είναι σημάδι βέλτιστης λειτουργίας της διεργασίας λόγω της σταθερότητας και της αναπαραγωγιμότητάς της [82].

Οι δύο κύριες παράμετροι που χαρακτηρίζουν το αερόλυμα είναι το μέγεθος των σταγονιδίων και το ηλεκτρικό φορτίο. Το ηλεκτρικό φορτίο είναι δύσκολο να προσδιοριστεί, λόγω παρασιτικής ηλεκτρικής εκφόρτισης, αν και το μέγιστο επιφανειακό φορτίο ενός σταγονιδίου q έχει βρεθεί ότι εξαρτάται από την επιφανειακή τάση γ και την ακτίνα του R [83] (Σχέση 2.1).

$$q = 8\pi\sqrt{\varepsilon_0\gamma R^3} \quad (2.1)$$

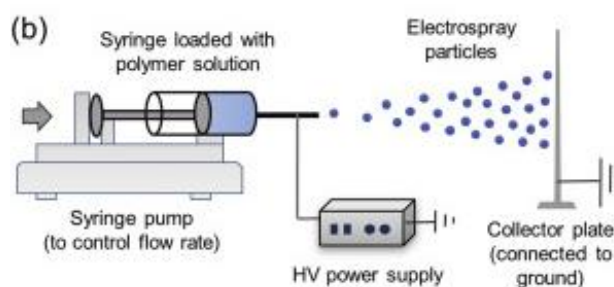
Το όριο Rayleigh L_R μπορεί να ανιχνευθεί από την επιφανειακή φόρτιση, η οποία καθορίζει το φορτίο που οδηγεί στη διάσπαση των σταγονιδίων και εκφράζεται μέσω της Σχέσης 2.2.

$$L_R = q(64\pi^2\varepsilon\gamma R^3) \quad (2.2)$$

ε: διαπερατότητα του περιβάλλοντος μέσου

Τα σταγονίδια που παράγονται με electrospraying είναι πολύ φορτισμένα και εμφανίζουν τιμές συνήθως κοντά στο ήμισυ του ορίου Rayleigh. Παρομοίως, ο μηχανισμός εκτόξευσης φαίνεται να εξαρτάται από την αναλογία της ηλεκτρικής κανονικής τάσης έναντι της επιφανειακής. Εξαρτάται από το ιζώδες και την επιφανειακή φόρτιση, όπως και στην περίπτωση του ορίου Rayleigh, αλλά και από την επιτάχυνση του πίδακα. Με την αύξηση του ρυθμού ροής αυξάνεται τόσο το ρεύμα όσο και ο λόγος τάσης του πίδακα και μάλιστα για πάνω από μια ορισμένη τιμή κατωφλίου ο πίδακας οδηγεί στην παραγωγή σταγονιδίων ετερογενούς μεγέθους.

Κατά αναλογία με το electrospinning η διάταξη παραμένει ίδια. Το πολυμερικό διάλυμα, στο οποίο έχει εισαχθεί και η επιθυμητή/ες ουσία/ουσίες προς ενθυλάκωση, αντλείται μέσω της σύριγγας σε έναν τριχοειδή σωλήνα από ανοξείδωτο χάλυβα και εγχέεται με τον επιθυμητό ρυθμό. Ο τριχοειδής αυτός σωλήνας υπόκειται σε υψηλή τάση (της τάξης των kV) και σε απόσταση που κυμαίνεται από μερικά εκατοστά έως αρκετές δεκάδες εκατοστά από το ακροφύσιο τοποθετούνται διάφοροι τύποι συλλεκτών (συνήθως γειωμένοι ή σπάνια αρνητικά φορτισμένοι). Από τη στιγμή όπου τα σταγονίδια εξαχθούν από τον κώνο Taylor η εξάτμιση του διαλύτη οδηγεί προοδευτικά στη συστολή και στερεοποίηση των σταγονιδίων (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση μιας διάταξης electrospaying [84].

Ουσιαστικά με τον ίδιο εξοπλισμό μπορούν να εκτελεστεί τόσο η διεργασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης όσο και η διεργασία του ηλεκτροστατικού ψεκασμού μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση ή το ιξώδες του υγρού ανάλογα πάντα και με το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η μεγάλη καινοτομία της εν λόγω τεχνολογίας είναι ότι μπορεί να εκτελεστεί με δύο διαφορετικούς τρόπους: την ομοαξονική (coaxial) και την μονοαξονική (uniaxial) διεργασία. Ανάλογα με τη φύση και την αναμιξιμότητα του πυρήνα και της μήτρας υπάρχει η δυνατότητα να συνδιαλυτοποιηθούν στον ίδιο διαλύτη και να σχηματιστεί ένα διάλυμα (uniaxial approach) ή να εισαχθούν τα δύο υλικά στη διεργασία μέσω δύο διαφορετικών τροφοδοσιών (coaxial approach) [85].

2.3.4.3.2.1 Επιδράσεις παραμέτρων κατά τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό

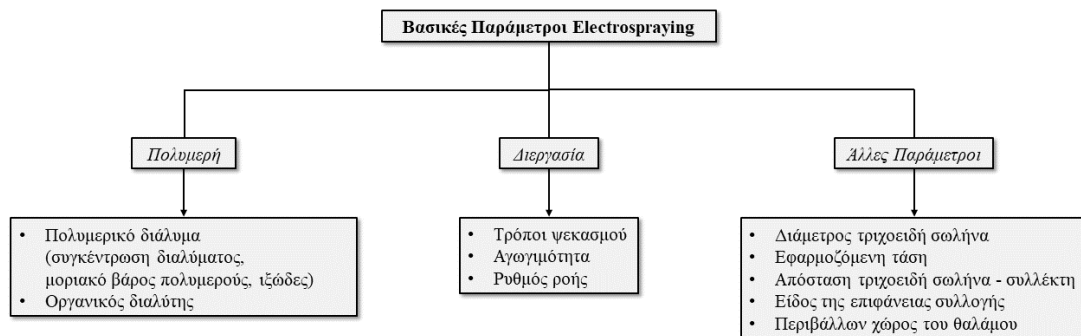
Η βασική προϋπόθεση για τη σωστή λειτουργία του electrospaying και της παραγωγής σωματιδίων ομοιόμορφου μεγέθους είναι η σταθερή λειτουργία του κώνου Taylor. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να εξεταστούν όλες εκείνες οι παράμετροι που σχετίζονται με το προκύπτον πολυμερικό διάλυμα, με τη διεργασία και με το περιβάλλοντα χώρο του θαλάμου (Εικόνα 25).

Παράμετροι σχετικά με το πολυμερικό διάλυμα και τους οργανικούς διαλύτες

Κατά τη διάρκεια του electrospaying λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα τόσο εξάτμιση του διαλύτη όσο και διάχυση πολυμερούς. Οι πολυμερικές αλυσίδες εμπλέκονται κατά τη διάρκεια αυτών των διεργασιών και είναι υπεύθυνες για την τελική μορφολογία των σωματιδίων. Στην προκειμένη περίπτωση για το σχηματισμό ομοιόμορφων μικροσωματιδίων και μικρότερων σταγονιδίων προτιμάται ο περιορισμός αυτών των αλυσίδων [86]. Ο αριθμός των διαπλοκών ή περιπλοκών (entanglements) ανά αλυσίδα σε ένα διάλυμα $[n_e]_{sol}$ (Σχέση 2.3) μπορεί να εκφραστεί μέσω του κλάσματος όγκου

του πολυμερούς φ , το μέσο μοριακό βάρος M_w και το μοριακό βάρος πάνω από το οποίο εμφανίζονται περιπλοκές M_e

$$[n_e]_{sol} = \frac{\varphi M_w}{M_e} \quad (2.3)$$



Εικόνα 25. Παράμετροι που επηρεάζουν τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό.

Στην περίπτωση του electrospaying ο αριθμός των περιπλοκών πρέπει να μην ξεπερνά την τιμή 2 (1 περιπλοκή ανά αλυσίδα), ενώ για τιμή του $[n_e]_{sol}$ πάνω από 3.5 (2.5 περιπλοκές ανά αλυσίδα) ευνοείται ο σχηματισμός ινών (electrospinning). Η τιμή του M_e είναι άμεσα διαθέσιμη για περισσότερα από 70 πολυμερή αλλά απουσία πειραματικών δεδομένων μπορεί να εκτιμηθεί θεωρητικά με τη χρήση ενός μοντέλου περιορισμού των περιπλοκών [86].

Η συγκέντρωση του πολυμερούς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο καθεστώς διαπλοκής και αποτελεί μια ουσιαστική παράμετρος η οποία υπαγορεύει το σχηματισμό σωματιδίων ή ινών. Η κρίσιμη συγκέντρωση C_{ov} είναι γνωστή ως το σημείο εκείνο κατά το οποίο η συγκέντρωση διαλύματος είναι ίση με τη συγκέντρωση εντός της ακτίνας περιστροφής κάθε μεμονωμένης μακρομοριακής αλυσίδας και είναι αντιστρόφως ανάλογη στο εγγενούς ιξώδους (Σχέση 2.4).

$$C_{ov} \propto \frac{1}{[\eta]} \quad (2.4)$$

Όταν η συγκέντρωση C είναι κάτω από το C_{ov} , δεν υπάρχουν αλυσίδες περιπλοκής (*dilute regime*). Για τιμές πάνω από C_{ov} η συγκέντρωση είναι αρκετά μεγάλη για την αλληλοεπικάλυψη των αλυσίδων αλλά όχι αρκετή για δημιουργηθεί ένας σημαντικός βαθμός περιπλοκής (*semi-dilute unentangled regime*) αφού τα σωματίδια έχουν την ικανότητα να παραμορφώνονται κατά την εξάτμιση οδηγώντας σε κατώτερη μη επιθυμητή μορφολογία. Το καθεστώς επιλογής για τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό παρατηρείται για τιμές συγκέντρωσης παρόμοιας με το προηγούμενο στάδιο αλλά για ένα πιο περιπλεγμένο καθεστώς (*semi-dilute moderately entangled regime*), κατά το οποίο παρατηρείται σημαντικός βαθμός περιπλοκής και μπορούν να παραχθούν πυκνά, στερεά και αναπαράξιμα σωματίδια. Τέλος για $C > C_{ov}$ (*semi-dilute highly entangled regime*) η μοριακή συνοχή είναι πολύ υψηλή και ευνοείται η παραγωγή ινών [87] (Εικόνα 26).

Στην αριστερή στήλη της Εικόνας 26 φαίνεται η φυσική αναπαράσταση σε μοριακό επίπεδο, ενώ στη δεξιά στήλη παρουσιάζονται τα αντίστοιχα παραδείγματα που προέκυψαν έπειτα από την Ηλεκτρονική Μικρογραφία Σάρωσης σε αποξηραμένα σωματίδια PCL [88].

Για την επίτευξη βέλτιστης λειτουργίας η συγκέντρωση είναι αναγκαίο να είναι μεγαλύτερη του C_{ent} αλλά μικρότερη του $3C_{ov}$.

Για τη διαλυτοποίηση των πολυμερών πριν λάβει χώρα ο ψεκασμός απαιτείται η χρήση οργανικών διαλυτών. Μερικοί εκ των πιο διαδεδομένων διαλυτών (κατά αυξανόμενη θερμοκρασία βρασμού) για την παραγωγή σωματιδίων είναι το διχλωρομεθάνιο, το οποίο χρησιμοποιείται κατά κόρον στην ενθυλάκωση φαρμακευτικών σκευασμάτων, η ακετόνη, το χλωροφόρμιο, η μεθανόλη, η αιθανόλη, το ακετονιτρίλιο, το διχλωροαιθάνιο, το οξικό οξύ και το διμεθυλομεθαναμίδιο.

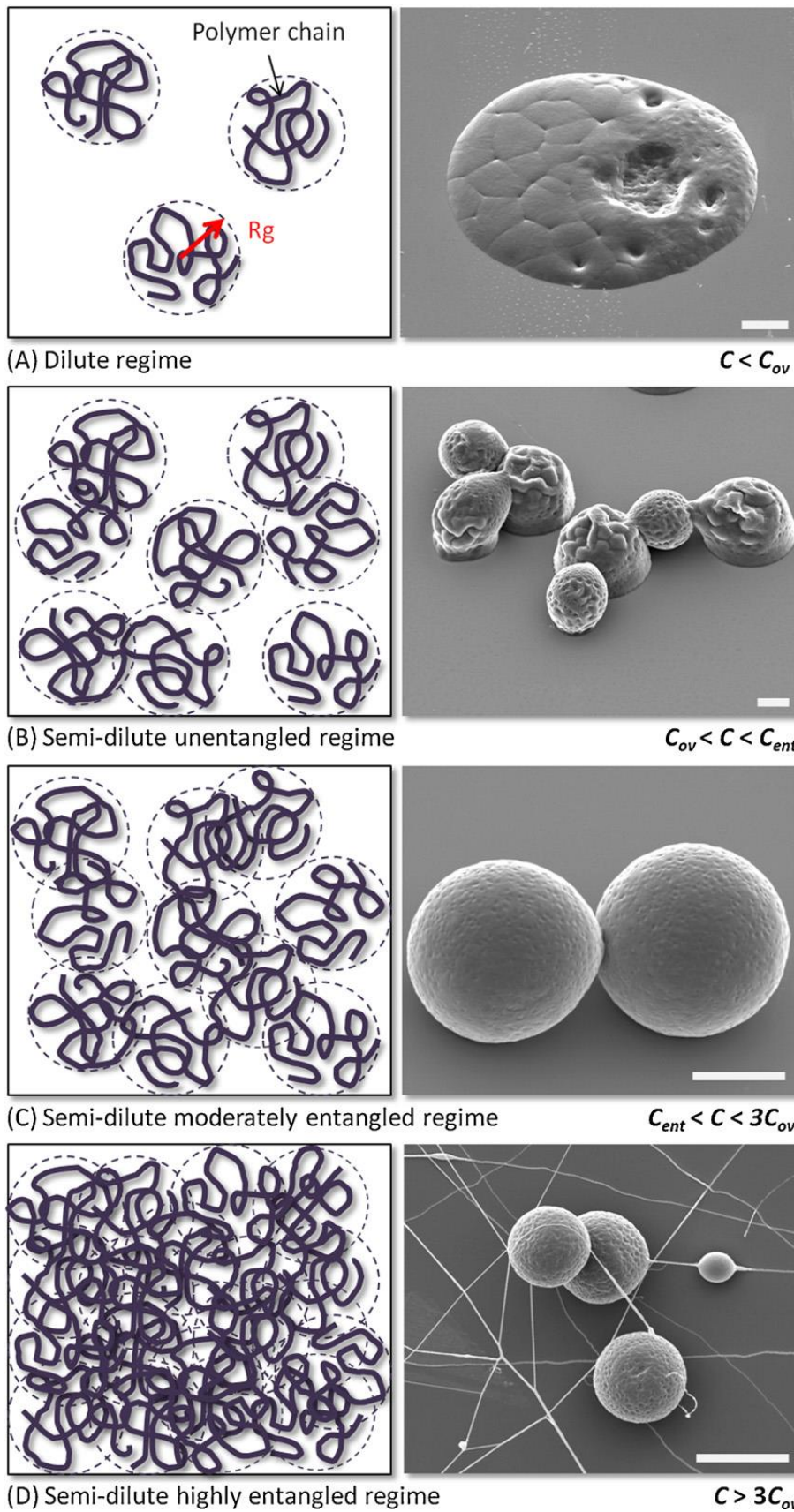
Η θερμοκρασία βρασμού ενός διαλύτη είναι η θερμοκρασία κατά την οποία η τάση ατμών εξισώνεται με την ατμοσφαιρική πίεση και είναι αντιπροσωπευτική της πτητικότητας του διαλύτη. Οι διαλύτες με χαμηλή τάση ατμών (υψηλές θερμοκρασίες βρασμού) εξατμίζονται δυσκολότερα από τους διαλύτες με υψηλή τάση ατμών (χαμηλές θερμοκρασίες βρασμού). Αυτό σημαίνει ότι στα σωματίδια που προκύπτουν από τη διεργασία του electrospraying η διάχυση του πολυμερούς μειώνεται με χρήση διαλυτών που εμφανίζουν μεγάλη τάση ατμών.

Με αύξηση του σημείου βρασμού (θερμοκρασίες άνω των 140 °C) προκύπτει μειωμένο μέγεθος σωματιδίων, ενώ για μεγαλύτερο μέγεθος σωματιδίων προτιμώνται διαλύτες με χαμηλότερα σημεία βρασμού (θερμοκρασίες μικρότερες των 70 °C) [89],[90]. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ταχεία εξάτμιση του διαλύτη καθώς στην περίπτωση αυτή δεν υπάρχει αρκετός διαθέσιμος χρόνος για τις πολυμερικές αλυσίδες να συσταλούν και να τακτοποιηθούν εκ νέου μέσα στο σταγονίδιο.

Επίσης έχει αποδειχθεί ότι μια μείωση της τάσης ατμών αποδυναμώνει τις δυνάμεις περιπλοκής των πολυμερών αλυσίδων. Συνεπώς η απόθεση λόγω Coulomb είναι σε θέση να ξεπεράσει την επιφανειακή τάση των εξατμιζόμενων σταγονιδίων οδηγώντας στην εξαγωγή μικρών και πολύ φορτισμένων σταγονιδίων.

Παράμετροι Διεργασίας

Κατά τη διάρκεια του electrospraying μπορούν να λάβουν χώρα διαφόρων ειδών ψεκασμοί (από στάγδην μέχρι και τη μετάβαση σε πίδακα-κόνιο) οι οποίοι ποικίλλουν ανάλογα με τη δυναμικότητα του πεδίου και το ρυθμό ροής του πολυμερικού διαλύματος. Η εκτόξευση μικρών και πολύ φορτισμένων σταγονιδίων υποθέτει το σχηματισμό ενός κώνου ο οποίος αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση της απόστασης τριχοειδή σωλήνα – γειωμένου συλλέκτη. Αυτή η μονή λειτουργία κώνου-πίδακα που παρατηρείται για μέτριες δυνάμεις πεδίου είναι σταθερή και αρκετά συνεπής από τη μία επανάληψη στην επόμενη [91]. Αντιθέτως με την αύξηση της δυναμικότητας του πεδίου σχηματίζονται πίδακες και κατά επέκταση κώνοι οι οποίοι είναι ασταθείς και απρόβλεπτοι και μπορούν να ποικίλλουν σημαντικά καθ' όλη τη διάρκεια του ηλεκτροστατικού ψεκασμού.



Εικόνα 26. Αναπαράσταση των 4 διαφορετικών περιπτώσεων περιπλοκής που λαμβάνονται για τις διάφορες συγκεντρώσεις πολυμερούς [88].

Δεδομένου ότι η διεργασία του electrospraying εξαρτάται από την ηλεκτροστατική έλξη φορτισμένων σωματιδίων σε έναν γειωμένο ή αντίθετα φορτισμένο συλλέκτη, η ηλεκτρική αγωγιμότητα, K , του πολυμερούς και του διαλύτη είναι μια σημαντική παράμετρος κατά την προσπάθεια βελτιστοποίησης της διεργασίας. Μαζί με το ρυθμό ροής η ηλεκτρική αγωγιμότητα παρέχει ένα ισχυρό μέσο για τον έλεγχο του μεγέθους των σωματιδίων, όπως αποδεικνύεται από τους νόμους κλιμάκωσης από το *Ganan-Calvo*, όπου μια υψηλή αγωγιμότητα οδηγεί σε μείωση του μεγέθους [92].

Η αυξημένη αγωγιμότητα ενός διαλύματος υποδηλώνει ότι απαιτείται περισσότερη φόρτιση από τον ψεκαστήρα του electrospraying. Γενικά για τη λήψη ομοιόμορφων σωματιδίων (*quasi monodisperse particles*) προτιμάται χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα καθώς μια υψηλότερη αγωγιμότητα ενδέχεται να ευνοεί το σχηματισμό επιμηκών σωματιδίων ή ακόμη και ινών εάν μάλιστα η συγκέντρωση του πολυμερούς είναι αρκετά υψηλή [93].

Μία σωστή διεργασία ηλεκτροστατικού ψεκασμού επιτυγχάνεται μόνο όταν το ιζώδες είναι υψηλό ή η αγωγιμότητα χαμηλή. Μεταβολές στην ηλεκτρική αγωγιμότητα μπορούν να επιτευχθούν αλλάζοντας τον διαλύτη ή χρησιμοποιώντας συνδιαλύτες αν και η χρήση αυτών μπορεί να είναι επιζήμια για την κατανομή του μεγέθους και της μορφολογίας των σωματιδίων. Οι οργανικοί διαλύτες είναι γενικά λιγότερο αγωγάιμοι από τους υδατικούς διαλύτες και η αγωγιμότητά τους μπορεί να αυξηθεί με την προσθήκη ηλεκτρολυτών, όπως DTAB ή υδροξείδιο του αμμωνίου. Σε σύγκριση με τους καθαρούς διαλύτες η προσθήκη πολυμερούς πιθανότατα θα μειώσει την ηλεκτρική αγωγιμότητα, αν και παραμένει στην ίδια τάξη μεγέθους.

Όταν η ηλεκτρική αγωγιμότητα του διαλύματος είναι μικρότερη από 0.01 S/m τότε είναι πιθανό η ροή του υγρού ρεύματος να μην είναι αρκετή ώστε να μπορεί να υποστεί ψεκασμό. Βέβαια και μια πολύ υψηλή τιμή αγωγιμότητας είναι ανεπιθύμητη συνεπώς ο παράγοντας της ηλεκτρικής αγωγιμότητας είναι ιδιαίτερος κρίσιμος.

Μετά τη σωστή επιλογή του πολυμερικού διαλύματος ο ρυθμός ροής είναι αναμφισβήτητα η δεύτερη πιο σημαντική παράμετρος και μαζί με τις παραμέτρους του διαλύματος (M_w πολυμερούς, συγκέντρωση, διαλύτης και αγωγιμότητα) μπορούν να ρυθμιστούν οι περιπλοκές των πολυμερών και η σχάση Coulomb. Ο ρυθμός ροής επηρεάζει τόσο τη μορφολογία όσο και το μέγεθος των σωματιδίων και πρέπει να επιλεγεί με σύνεση καθώς και τα δύο αυτά χαρακτηριστικά επηρεάζουν τη διασπορά της υπό ενθυλάκωσης ουσίας εντός της πολυμερικής μήτρας. Πρώτον, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί ένας ρυθμός ροής που να επιτρέπει την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη, κάτι που δεν είναι δυνατό να επιτευχθεί με υψηλούς ρυθμούς ροής. Επίσης υψηλότεροι ρυθμοί ροής μπορούν να προκαλέσουν το σχηματισμό δευτερευόντων σταγονιδίων που προσδίδουν διτροπικό (bimodal) και μη ομοιόμορφο χαρακτήρα στο μέγεθος των τελικών σωματιδίων. Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί μέσω των διεργασιών που εμπλέκονται στην εξάτμιση του διαλύτη από το φορτισμένο σταγονίδιο, με βάση το κλάσμα όγκου του πολυμερούς σε ένα σταγονίδιο στο όριο Rayleigh φ_{ray} (Σχέση 2.5)

$$\varphi_{ray} = \varphi \cdot \frac{288 \cdot \varepsilon_{air} \cdot \varepsilon \cdot \gamma}{[I/Q]^2 \cdot d^3} \quad (2.5)$$

Q : ρυθμός ροής υγρού

I : ρεύμα

ϵ_{air} : διαπερατότητα του αέρα

γ : επιφανειακή τάση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου

d : αρχική διάμετρος σταγονιδίων

Ο λόγος I/Q και η αρχική διάμετρος μπορούν να εκφραστούν συναρτήσει του ρυθμού ροής και των ιδιοτήτων του πολυμερικού διαλύματος. Σύμφωνα με τη Σχέση 2.5 ο ρυθμός ροής έχει σημαντική επιρροή στο φ_{ray} καθώς μεγαλύτεροι ρυθμοί ροής οδηγούν σε μείωση του κλάσματος όγκου και συνεπώς οδηγούν σε σχηματισμό μη σφαιρικών σωματιδίων.

Στην περίπτωση όπου το πείραμα λάβει χώρα μέσω της ομοαξονικής προσέγγισης τότε ισχύουν τα ίδια με παραπάνω. Οι ρυθμοί εσωτερικής και εξωτερικής ροής μπορεί να επηρεάσουν έντονα τις ιδιότητες των τελικών προϊόντων ψεκασμού. Για την παραγωγή σφαιριδίων με ομοιόμορφο μέγεθος ο ρυθμός ροής του διαλύματος του πυρήνα πρέπει να είναι πολύ χαμηλότερος από αυτόν του κελύφους.

Άλλες Παράμετροι

Η διάμετρος μιας βελόνας εκφράζεται συνήθως σε gauge (G) και συσχετίζεται με πολλαπλάσια 0.001 της ίντσας [94]. Για την περίπτωση του electrospraying αυτές οι διαμέτροι κυμαίνονται από 18 G έως 29 G. Σε γενικές γραμμές η επίδραση αυτή στη μορφολογία ή το μέγεθος των σωματιδίων δεν είναι ιδιαίτερα σημαντική.

Όσον αφορά την επίδραση της εφαρμοζόμενης τάσης για να ευνοηθεί ο σχηματισμός σφαιριδίων και όχι ινών απαιτούνται γενικά ούτε πολύ χαμηλές αλλά και ούτε πολύ υψηλές τιμές τάσης.

Το κατώτερο όριο απόστασης μεταξύ του μεταλλικού ακροφύσιου και του συλλέκτη καθορίζεται από την ηλεκτρική εκκένωση. Μια μικρή απόσταση μπορεί να επηρεάσει την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη το οποίο έχει ως αποτέλεσμα στη συλλογή υγρών σωματιδίων που οδηγούν σε μία συνένωση και ευρεία κατανομή μεγέθους (μη επιθυμητό). Η αύξηση της απόστασης οδηγεί σε περισσότερες σφαιρικές μορφολογίες δεδομένου ότι οι πολυμερικές αλυσίδες έχουν αρκετό χρόνο για να διαχυθούν εντός του σταγονιδίου. Σε σταθερή τάση η μείωση της απόστασης οδηγεί σε αύξηση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου οδηγώντας έτσι σε μείωση του μεγέθους των σωματιδίων. Συνεπώς κρίνεται αναγκαία η απόσταση αυτή να μην είναι μικρότερη των 12-13 cm αν και αυτό εξαρτάται από το εκάστοτε πείραμα.

Άλλη μια σημαντική παράμετρος είναι ο τύπος της επιφάνειας συλλογής. Συνήθως ως επιφάνεια συλλογής χρησιμοποιείται το φύλλο αλουμινίου αλλά λόγω της δυσκολίας μεταφοράς των συλλεχθέντων μικροσφαιριδίων δύναται να χρησιμοποιηθούν και άλλες επιφάνειες όπως το αγωγίμο χαρτί, το αγωγίμο ύφασμα κ.α. Επιφάνειες λιγότερο αγωγίμες συνήθως αποφεύγονται καθώς παρουσιάζουν ανασταλτική επίδραση στη συλλογή.

Τελειώνοντας να σημειωθεί ότι σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και οι συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία) που επικρατούν στον περιβάλλον χώρο του θαλάμου. Μεγάλη αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να προκαλέσει μείωση στο μέγεθος των παραγόμενων σωματιδίων, ενώ μειωμένα επίπεδα υγρασίας είναι ανεπιθύμητα διότι μπορεί να οδηγήσουν στο σχηματισμό πόρων στη σφαιρική επιφάνεια αυτών.

Κεφάλαιο 3: Πειραματική Διαδικασία

3.1 Υλικά (Α' ύλη, Αντιδραστήρια και Διαλύματα)

3.1.1 Εκχύλιση δηλητηρίου από τα αγκάθια του λεοντόψαρου *Pterois miles*

Τα υλικά όπου χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της διεργασίας της εκχύλισης του δηλητηρίου από τις ακάνθες του *P.miles* είναι τα εξής:

- Ακάνθες λεοντόψαρου (1.15 g για το 1^ο πείραμα, 10 g για το 2^ο πείραμα),
- Ιστοί από την εξωτερική επιφάνεια και τη βάση των ακάνθων (0.36 g),
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM και pH 7.0 που περιείχε $CaCl_2$ 1 mM (2.3 mL για το 1^ο πείραμα, 0.72 mL για την εκχύλιση των ιστών, 20 mL για το 2^ο πείραμα),
- $(NH_4)_2SO_4$ (1.53 g για επίπεδο κορεσμού 80 %)

3.1.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης που περιέχεται στα αγκάθια του λεοντόψαρου *Pterois miles*

Τα διαλύματα και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεΐνης από το λεοντόψαρο *P.miles* είναι:

- Πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) διαφορετικών συγκεντρώσεων,
- Αντιδραστήριο BCA (δικινοχονικό οξύ),
- Αντιδραστήριο Bradford (όξινο διάλυμα βαφής Coomassie G-250)

3.1.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών – Ηλεκτροφόρηση στα αγκάθια του λεοντόψαρου *Pterois miles*

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών από τις ακάνθες του *P.miles* έλαβε χώρα ηλεκτροφόρηση και τα υλικά όπου χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Gel πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE),
- Μίγμα πρωτεϊνών συγκεκριμένου μοριακού βάρους (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards, Biorad)

3.1.4 Απομόνωση τετραδοτοξίνης από το μυϊκό ιστό και τα εσωτερικά όργανα του λαγοκέφαλου *L. Sceleratus*

Για την απομόνωση της θανατηφόρας τετραδοτοξίνης από το λαγοκέφαλο *L.sceleratus* (μυϊκός ιστός και εσωτερικά όργανα) χρησιμοποιήθηκαν:

- 100 mL μεθανολικού διαλύματος οξικού οξέος 1 % *v/v*,
- 100 mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1 % *v/v*,
- 30 g μυϊκού ιστού του *L.sceleratus*,

- 30 g μίγματος από τα εσωτερικά όργανα (νεφρό, χολή, έντερα και ωοθήκες) του *L.sceleratus*

3.1.5 Ενθυλάκωση της τετραδοτοξίνης από τον *L.sceleratus* σε πολυμερική μήτρα

Για τον εγκλεισμό της TTX σε πολυμερική μήτρα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

- Εκχυλισμένη TTX από τον *L.sceleratus* (συγκέντρωσης $0.782 \frac{\mu g}{mL}$),
- Νιφάδες ζεΐνης,
- Διάλυμα ζεΐνης (70 % EtOH και 30 % H_2O),
- Διάλυμα οξικού οξέος.
- Αλουμινόχαρτο

3.1.6 Ανάπτυξη και μικροβιολογική ανάλυση καλλυντικών κρεμών (ανάμιξη κρέμας βάσης με το τελικό προϊόν ενθυλάκωσης από το electrospraying)

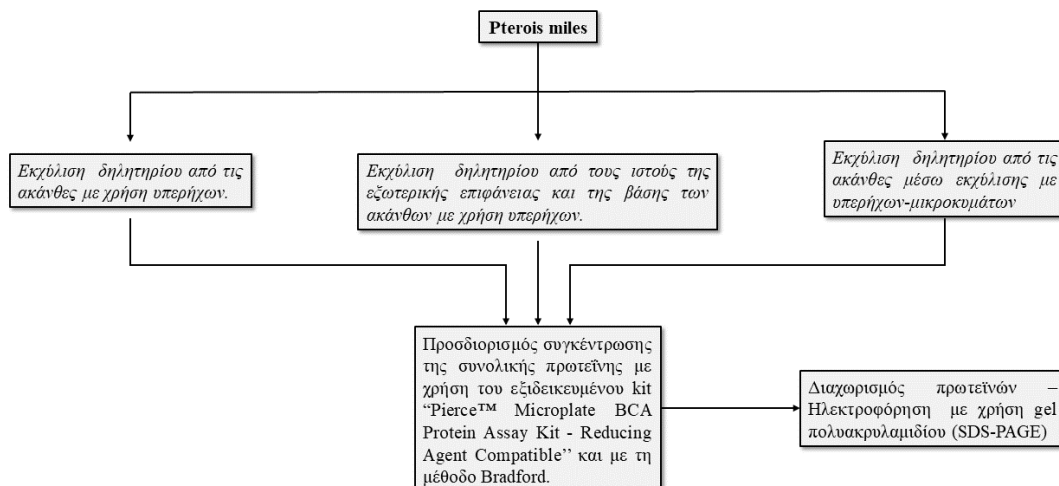
Για την ανάπτυξη και μικροβιολογική ανάλυση των καλλυντικών κρεμών που προέκυψαν από την ανάμιξη της κρέμας βάσης με το τελικό προϊόν εγκλεισμού του ηλεκτροστατικού ψεκασμού χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

- Ταμπλέτες Ringer,
- Απιονισμένο νερό,
- Διάλυμα αιθανόλης,
- Τρυβλία προσδιορισμού του ολικού μικροβιακού φορτίου,
- Τρυβλία προσδιορισμού των ζυμών και μυκήτων,
- Τρυβλία προσδιορισμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli*.

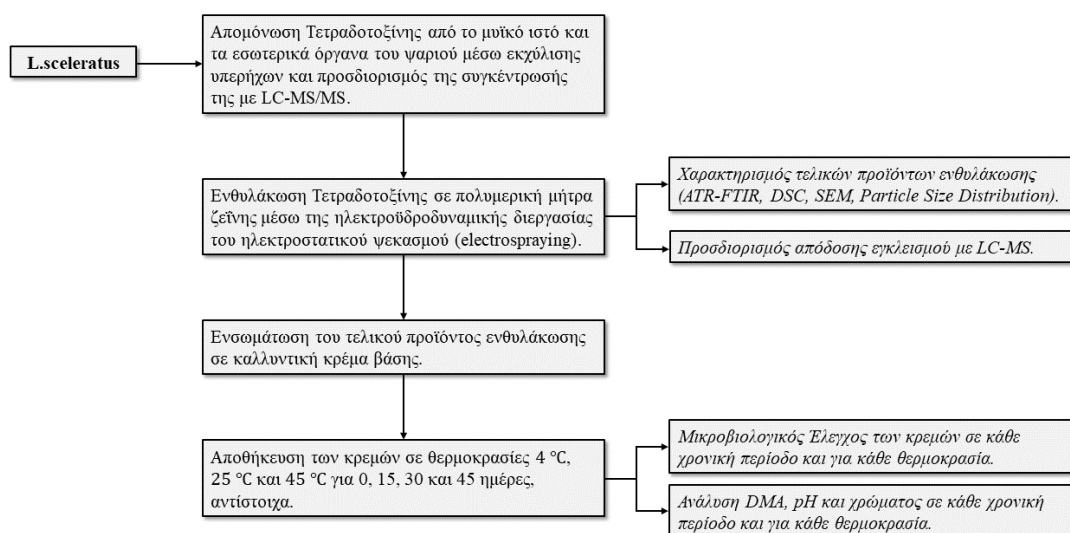
3.2 Μεθοδολογική Προσέγγιση – Όργανα και συσκευές

Στο υποκεφάλαιο αυτό θα γίνει αναφορά σε όλα τα πρωτόκολλα καθώς και στα αντίστοιχα όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση όλων των πειραμάτων της εν λόγω διπλωματικής.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται με συνοπτικό τρόπο υπό μορφή διαγραμμάτων ροής όλα τα πειράματα που έλαβαν χώρα τόσο για το λεοντόψαρο *P.miles* (Εικόνα 27) όσο και για το λαγοκέφαλο *L.sceleratus* (Εικόνα 28).



Εικόνα 27. Πειραματική διαδικασία για το ξενικό είδος ψαριού *Pterois miles*.



Εικόνα 28. Πειραματική διαδικασία για το ξενικό είδος ψαριού *Lagocephalus sceleratus*.

3.2.1 Πρωτόκολλο παραλαβής του δηλητηρίου από τα αγκάθια και τους ιστούς της εξωτερικής επιφάνειας και της βάσης του λεοντόφαρου *P.miles* μέσω εκχύλισης με χρήση υπερήχων

Το εν λόγω πρωτόκολλο εφαρμόστηκε για την εκχύλιση πρωτεϊνών από τα αγκάθια και τους ιστούς της εξωτερικής επιφάνειας και της βάσης του *P.miles* με χρήση υπερήχων (Εικόνα 29).

Ραχιαία, πλευρικά και κοιλιακά αγκάθια κόπηκαν από τη βάση τους και διατηρήθηκαν στους $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την ημέρα της εκχύλισης. Πριν την έναρξη της εκχύλισης αφαιρέθηκαν από τα αγκάθια το εξωτερικό τους περίβλημα και οι ιστοί από τη βάση τους. Τα καθαρά πλέον αγκάθια κόπηκαν σε μικρά κομμάτια, πολτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πορσελάνινο γουδί και ζυγίστηκαν (1.15 g). Οι ιστοί από την εξωτερική επιφάνεια και τη βάση των ακάνθων συλλέχθηκαν σε φιαλίδιο για να εκχυλιστούν ξεχωριστά (0.36 g).

Συγκεκριμένα τα βήματα όπου ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- Ανάμιξη 1.15 g ακάνθων με 2.3mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 10 mM (pH 7.0) που περιείχε 1 mM CaCl_2 ,
- εκχύλιση με χρήση υπερήχων (Hielscher UP 100H, 100W, 30kHz) σε ένταση 80% για 2 min (Εικόνα 29),
- φυγοκέντρηση (3500 rpm) για 20 min από την οποία συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό, το οποίο περιείχε το ακατέργαστο δηλητήριο (**Δείγμα Α**).



Εικόνα 29. Συσκευή υπερήχων (Hielscher UP 100H).

Η ίδια διαδικασία εκχύλισης πραγματοποιήθηκε και για τους ιστούς της εξωτερικής επιφάνειας και της βάσης των ακάνθων.

- Ανάμιξη 0.36 g ιστών με 0.72 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 10 mM (pH 7.0) που περιείχε 1 mM CaCl_2 ,
- εκχύλιση σε υπερήχους για 30 sec,
- φυγοκέντρηση του μίγματος (3500 rpm) για 20 min και παραλαβή του υπερκείμενου υγρού (**Δείγμα Β**).

3.2.2 Πρωτόκολλο παραλαβής του δηλητηρίου από τα αγκάθια του λεοντόψαρου *P.miles* μέσω εκχύλισης υπερήχων-μικροκυμάτων

Το πρωτόκολλο αυτό στοχεύει κυρίως στην απομόνωση καθαρής φωσφολιπάσης A₂ που περιέχεται στο δηλητήριο των ακάνθων λεοντόψαρου και ευθύνεται για τη βιολογική δράση του δηλητηρίου.

Πιο συγκεκριμένα τα βήματα όπου ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

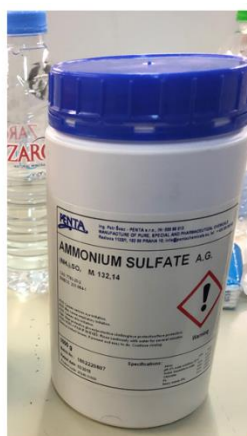
- Κόψιμο των ακάνθων σε μικρότερα κομμάτια και ξέπλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM (pH 7.0) που περιείχε 1 mM $CaCl_2$ για να απομακρυνθούν πιθανές ακαθαρσίες. Η προσθήκη του $CaCl_2$ βοηθάει στην μεγαλύτερη διαλυτοποίηση της φωσφολιπάσης [95],
- ζύγιση 10 g ακάνθων και ανάμιξη με 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Η αναλογία μεταξύ ακάνθων και ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να είναι 1:2 [96],
- επώαση στους 4 °C για 24 ώρες,
- εκχύλιση στη συσκευή υπερήχων-μικροκυμάτων για 10 min έντασης 80 % (Εικόνα 31)
- φυγοκέντρηση στις 4500 rpm για 30 min και συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος,
- θέρμανση του εκχυλίσματος στους 60 °C για 40 min, αναδεύοντας κάθε 10 min [97]. Η θέρμανση έχει ως στόχο την συλλογή του ενζύμου-στόχου σε καθαρότερη μορφή καθώς οι περισσότερες πρωτεΐνες σε αυτή τη θερμοκρασία μετουσιώνονται και καθιζάνουν ενώ η πρωτεΐνη φωσφολιπάση A₂, η οποία είναι θερμοσταθερή στους 75 °C, παραμένει διαλυτοποιημένη στο υδατικό εκχύλισμα [98],
- φυγοκέντρηση στις 4500 rpm για 30 min με στόχο το διαχωρισμό των μετουσιωμένων πρωτεϊνών από το επιθυμητό ένζυμο,
- συλλογή του υπερκείμενου υγρού (2.7 mL), το οποίο περιείχε το ακατέργαστο δηλητήριο,
- προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας στερεού $(NH_4)_2SO_4$ (Εικόνα 32) στο υπερκείμενο διάλυμα. Η προσθήκη θειικού αμμωνίου γίνεται για να κατασταλεί το στρώμα διάλυσης μεταξύ πρωτεΐνης και νερού και να αυξηθεί η αλληλεπίδραση και πρόσδεση μεταξύ των πρωτεϊνών. Η αύξηση της συγκέντρωσης άλατος πάνω από 0.15 M προκαλεί τη μείωση της διαλυτότητας ορισμένων πρωτεϊνών στο νερό και την κατακρήμνιση τους (salting-out effect). Για να επιτευχθεί επίπεδο κορεσμού 20% και για χρόνο θέρμανσης 40 λεπτών προστέθηκαν 0.31 g $(NH_4)_2SO_4$, ενώ για επίπεδο κορεσμού 80% έγινε προσθήκη 1.53 g $(NH_4)_2SO_4$,
- επώαση για 30 min ώστε να διασφαλιστεί η ποσοτική διάλυση του άλατος,
- φυγοκέντρηση του ομοιογενούς διαλύματος στις 4500 rpm για 30 min. Το υπερκείμενο υγρό που συλλέχθηκε περιείχε τη φωσφολιπάση, η οποία παρέμεινε διαλυτοποιημένη παρά την παρουσία θειικού αμμωνίου,
- ανάμιξη του διαλύματος με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM (pH 7.0) που περιείχε 1 mM $CaCl_2$ έως ότου ο τελικός όγκος φτάσει τα 3 mL (Δείγμα C).



Εικόνα 30. Ανάμιξη 10 g ακάνθων του λειοντόφαρου *P.miles* με 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 10 mM (pH 7.0) που περιέχει 1 mM $CaCl_2$.



Εικόνα 31. Σύστημα αντίδρασης υπερήχων-μικροκυμάτων (Ultrasonic microwave reaction system) της εταιρίας Nanjing Xianou Instruments Manufacture Co., Ltd.



Εικόνα 32. Θεϊκό Αμμόνιο.

3.2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης από τις ακάνθες του λεοντόψαρου *Pterois miles*

Για την εύρεση της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης στα δείγματα A, B και C εφαρμόστηκε το εξειδικευμένο kit “Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit-Reducing Agent Compatible” της Thermo Scientific (Εικόνα 33). Η δοκιμασία Pierce BCA βασίζεται στη γνωστή αναγωγή Cu^{2+} προς Cu^+ των πρωτεϊνών σε αλκαλικό μέσο και στην επακόλουθη ευαίσθητη και εκλεκτική χρωματομετρική ανίχνευση του κατιόντος χαλκού με τη χρήση δικινοχονικού οξέος (BCA).



Εικόνα 33. Συμβατό αντιδραστήριο ακριβείας για τη μέτρηση της συνολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης έναντι προτύπου πρωτεΐνης (Pierce BCA Protein Assay Kit).

Ωστόσο, η μέθοδος είναι επιρρεπής σε παρεμποδίσεις από άλλες ενώσεις με ισχυρή αναγωγική δράση από ενώσεις όπως η διθειοθρεϊτόλη (DTT), η 2-μερκαπτοαιθανόλη και η τρις-2-καρβοξυαιθυλο-φωσφίνη (TCEP) που χρησιμοποιούνται συνήθως στα διάφορα στάδια κατεργασίας/ανάλυσης των πρωτεϊνών. Για να ελαχιστοποιηθεί η παρεμποδιστική δράση αυτών των αναγωγικών ενώσεων, η μέθοδος ανάλυσης περιλαμβάνει ένα αντιδραστήριο συμβατότητας αναγωγικών παραγόντων, το οποίο προστίθεται στο δείγμα πριν από την εκτέλεση της ανάλυσης και τροποποιεί τους αναγωγικούς παράγοντες δισουλφιδίου.

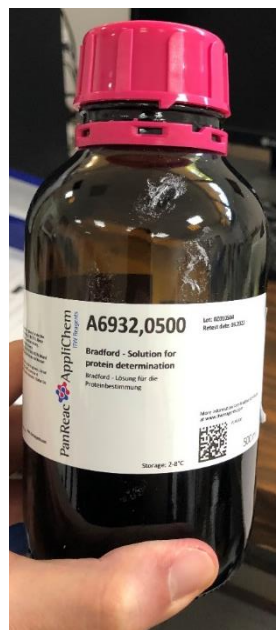
Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Τοποθέτηση σε μια μικροπλάκα 96 θέσεων δείγματα στην κανονική τους συγκέντρωση, δείγματα σε δύο αραιωμένες μορφές (1:4 και 1:10), πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) διαφορετικών συγκεντρώσεων και τυφλά δείγματα,
- προσθήκη αντιδραστηρίου συμβατότητας αναγωγικών παραγόντων σε κάθε δείγμα,
- επώαση της μικροπλάκας στους 37 °C για 15 min,
- προσθήκη αντιδραστηρίου BCA σε όλα τα δείγματα,

- επώαση της μικροπλάκας στους 37 °C για 15 min, έπειτα από μια σύντομη ανακίνηση,
- μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων στα 562 nm έπειτα από την επαναφορά της μικροπλάκας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος,
- κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης (με βάση τις απορροφήσεις που παρουσίασαν τα δείγματα γνωστής συγκέντρωσης και το τυφλό) από την οποία υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των άγνωστων δειγμάτων A, B και C και των αραιωμένων τους μορφών.

Στο δείγμα C έγινε προσδιορισμός της συνολικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και με βάση τη μέθοδο Bradford. Πιο συγκεκριμένα αρχικά φωτομετρήθηκαν στα 595 nm 3 mL διαλύματος Bradford (Εικόνα 34) το οποίο και αποτελεί το τυφλό δείγμα. Στη συνέχεια μέσα στα 3 mL προστέθηκαν 0.1 ml εκχυλίσματος (συνολικός όγκος διαλύματος κυψελίδας 3.1 mL) και μετρήθηκε εκ νέου η απορρόφηση. Τέλος με τη βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) διαφορετικών συγκεντρώσεων κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη μέσω της οποίας προσδιορίστηκε η τελική συγκέντρωση σε mg/mL (με βάση τη διαφορά των απορροφήσεων).

Η ανάλυση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι όταν συνδέονται μόρια πρωτεΐνης με τη βαφή Coomassie κάτω υπό όξινες συνθήκες πραγματοποιείται αλλαγή χρώματος από καφέ σε μπλε. Στην πραγματικότητα, αυτή η μέθοδος μετρά την παρουσία των βασικών υπολειμμάτων αμινοξέων, αργινίνης, λυσίνης και ιστιδίνης, τα οποία συμβάλλουν στο σχηματισμό του συμπλόκου πρωτεΐνης-βαφής. Αντιθέτως κατά τον προσδιορισμό με BCA τα αναγωγικά μέσα (δηλαδή, DTT και β-μερκαπτοαιθανόλη) και οι χηλικοποιητές μετάλλων (δηλ., EDTA, EGTA) σε χαμηλή συγκέντρωση δεν προκαλούν παρεμβολές.



Εικόνα 34. Διάλυμα Bradford.

Εκχύλιση με υπερήχους (ultrasound)

Η χρήση υπερήχων είναι μια νέα τεχνολογία καθαρής, πράσινης εκχύλισης που χρησιμοποιείται για διάφορα μόρια και βιοϋλικά συμπεριλαμβανομένων πολυσακχαριτών, αιθέριων ελαίων, πρωτεϊνών, πεπτιδίων, χημικών ουσιών υψηλής καθαρότητας (βαφές και πηγμένα) και βιοδραστικά μόρια εμπορικής σημασίας [99].

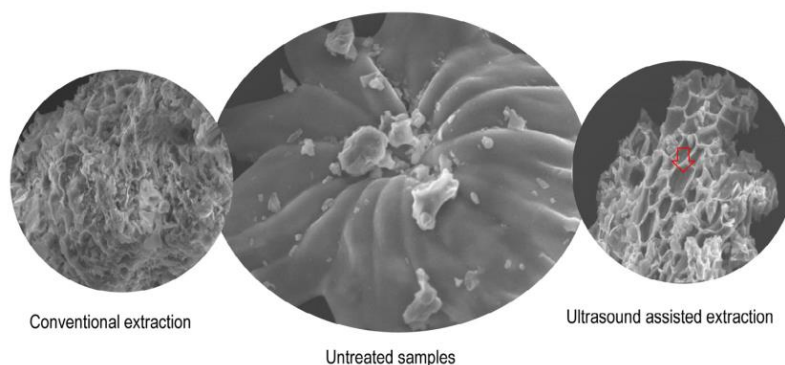
Η θεμελιώδης διαφορά μεταξύ του ήχου και του υπερήχου είναι η συχνότητα κύματος. Τα υπερηχητικά κύματα έχουν συχνότητες πάνω από το ακουστικό εύρος ($> 20 \text{ kHz}$) και μικρότερες από αυτές των μικροκυμάτων (έως 10 MHz). Οι υπέρηχοι χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση την ένταση του υπερήχου [W/cm^2]: στους υπερήχους χαμηλής έντασης ($< 1 \text{ W}/\text{cm}^2$) και στους υπερήχους υψηλής έντασης ($10 - 1000 \text{ W}/\text{cm}^2$). Η πρώτη κατηγορία υπερήχων χρησιμοποιείται συνήθως ως μη καταστρεπτική αναλυτική τεχνική για τη διασφάλιση της ποιότητας και τον έλεγχο της διεργασίας (ιδιαίτερα των φυσικοχημικών ιδιοτήτων όπως π.χ. σύνθεση, δομή και φυσική κατάσταση της ύλης) ενώ οι υπέρηχοι υψηλής έντασης χρησιμοποιούνται κυρίως σε εφαρμογές διεργασιών εκχύλισης.

Η κύρια κινητήρια δύναμη για την πραγματοποίηση της εκχύλισης μέσω υπερήχων είναι η ακουστική σπηλαίωση (*acoustic cavitation*). Όταν ο υπέρηχος διαδίδεται μέσα από ένα μέσο προκαλείται μια σειρά συμπίεσεων και αντιδράσεων στα μόρια αυτού. Τέτοιες εναλλασσόμενες αλλαγές πίεσης προκαλούν αρχικά το σχηματισμό και εν συνεχεία την κατάρρευση φυσαλίδων σε ένα υγρό μέσο. Το φαινόμενο αυτό της δημιουργίας, της διαστολής και της έκρηξης μικροφυσαλίδων σε υγρά που ακτινοβολούνται από υπερήχους είναι γνωστό ως «ακουστική σπηλαίωση».

Η μορφολογία των σχηματιζόμενων φυσαλίδων καθορίζει και το είδος της σπηλαίωσης. Οι δύο βασικές κατηγορίες είναι η παροδική σπηλαίωση (αδρανειακή) και η σταθερή σπηλαίωση (μη αδρανειακή). Οι σταθερές κοιλότητες είναι σχετικά μακράς διάρκειας φυσαλίδες αερίου και υπάρχουν για πολλούς κύκλους συμπίεσης [100]. Από την άλλη πλευρά η παροδική σπηλαίωση υφίστανται για πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, μερικές φορές για λιγότερο από έναν κύκλο, ώσπου οι φυσαλίδες φθάνουν και καταρρέουν βίαια. Σε ένα υγρό υπάρχουν χιλιάδες τέτοιες φυσαλίδες μερικές από τις οποίες δύναται να παράξουν θερμοκρασίες της τάξης των 5000 K και πιέσεις της τάξης των 50 MPa .

Οι αλλαγές θερμοκρασίας και πίεσης που προκύπτουν από αυτές τις εκρήξεις προκαλούν διαταραχές στη διάτμηση, αραιώση των κυτταρικών μεμβρανών και διάσπαση των κυττάρων το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη διείσδυση διαλυτών στα κύτταρα και την ενίσχυση των φαινομένων μεταφοράς μάζας μεταξύ των ενώσεων στόχων και διαλύτη. Επίσης η έκρηξη των φυσαλίδων σπηλαίωσης δημιουργεί αναταράξεις σε μικροσκοπικό επίπεδο, υψηλή ταχύτητα μεταξύ των σωματιδίων και αναταράξεις σε μικροπορώδη σωματίδια της μήτρας οι οποίες επιταχύνουν το φαινόμενο της διάχυσης [101]. Η ικανότητα των υπερήχων να προκαλούν σπηλαίωση εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά τους (π.χ. συχνότητα και ένταση), ιδιότητες του μέσου (π.χ. ιξώδες και επιφανειακή τάση) και περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία και πίεση).

Εικόνες εκχύλισης μέσω υπερήχων από ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης της κυτταρικής μήτρας υποδεικνύουν την αυξημένη προσβασιμότητα του διαλύτη στην εσωτερική δομή διευκολύνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την απελευθέρωση της ένωσης-στόχου μέσω του σχηματισμού μικρών σχισμών και μικροκαναλιών που διευκολύνουν τη διείσδυση του διαλύτη στη μήτρα. Η τροποποίηση της επιφάνειας της μήτρας αυξάνει την προσβασιμότητα του διαλύτη στην εσωτερική δομή του και επιτρέπει στην ένωση στόχο να διαλυθεί σε αυτόν (Εικόνα 35).



Εικόνα 35. Εικόνες SEM φύλλων ελιάς έπειτα από συμβατική εκχύλιση (αριστερά) και εκχύλιση μέσω υπερήχων (δεξιά) [102].

Εκχύλιση υπερήχων-μικροκυμάτων

Η ακουστική σπηλαιώση που προκαλείται από τους υπερήχους παρέχει ένα μεγάλο ποσό συσσωρευμένης ενέργειας που απελευθερώνεται από τα καυτά σημεία ενώ τα μικροκύματα παρέχουν διηλεκτρική θέρμανση και επιλεκτική θέρμανση των στερεών σωματιδίων. Οι δύο αυτοί τύποι εκχύλισης μπορούν να θεωρηθούν ως συμπληρωματικοί ενώ ο συνδυασμός τους παρέχει ένα καλύτερο περιβάλλον εκχύλισης.

Αυτός ο συνδυασμός πηγών ενέργειας μπορεί να βελτιώσει μια σειρά χημικών διεργασιών όπως η σύνθεση, η εκχύλιση φυσικών προϊόντων και την προετοιμασία δειγμάτων για χημική ανάλυση. Το κύριο ερώτημα σχετικά με τη συνδυασμένη τεχνολογία είναι το πώς γίνεται να συνδυαστούν δύο ξεχωριστές τεχνολογίες δεδομένου ότι η τοποθέτηση μεταλλικού κέρατος υπερήχων μέσα σε μία ζώνη μικροκυμάτων είναι επικίνδυνη. Ο ένας τρόπος είναι με χρήση ξεχωριστών αντιδραστήρων οι οποίοι θα συνδέονται με αντλία ανακυκλοφορίας έτσι ώστε να επιτρέπεται η μεταφορά του υγρού από τον έναν αντιδραστήρα στον άλλο και ο δεύτερος τρόπος είναι με χρήση ενός μόνο αντιδραστήρα.

Η χρήση ενός μόνο αντιδραστήρα είναι και αυτή η οποία προτιμάται με την προϋπόθεση ότι εάν η πηγή του υπερήχου είναι ένα κέρας βυθισμένο στο υγρό αντίδρασης (μέσα στην κοιλότητα των μικροκυμάτων) τότε αυτό δεν πρέπει να είναι μεταλλικό αλλά κεραμικό. Αν το κέρας είναι μεταλλικό τότε θα πρέπει να βρίσκεται έξω από τη ζώνη των μικροκυμάτων. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα του πλεονεκτήματος που προσφέρει η ταυτόχρονη χρήση των υπερήχων και των μικροκυμάτων φαίνεται από τη σημαντική μείωση του χρόνου πέψης για τον προσδιορισμό του συνολικού αζώτου κατά Kjeldahl. Συγκεκριμένα με χρήση της

κλασικής τεχνικής κατά Kjeldahl απαιτούνται 30 min, με χρήση υπερήχων χρειάζονται 25 min ενώ με το συνδυασμό υπερήχων-μικροκυμάτων ο απαιτούμενος χρόνος είναι μόλις 7 min [103].

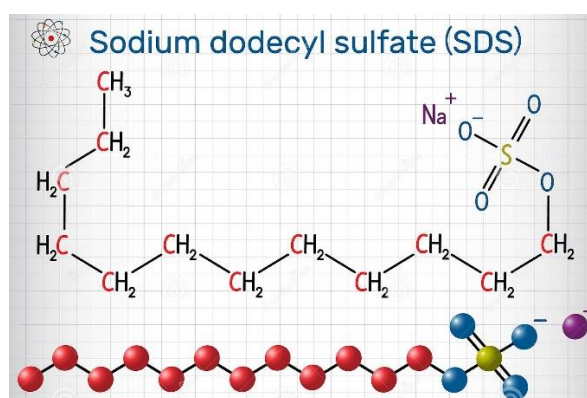
3.2.4 Διαχωρισμός πρωτεϊνών – Ηλεκτροφόρηση των ακάνθων του λεοντόψαρου *Pterois miles*

Μετά τον προσδιορισμό της συνολικής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμιδίου (*SDS-PAGE*) με σκοπό:

- 1) το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος,
- 2) τον ποιοτικό προσδιορισμό των ειδών των πρωτεϊνών από τις οποίες αποτελούνται τα δείγματα.

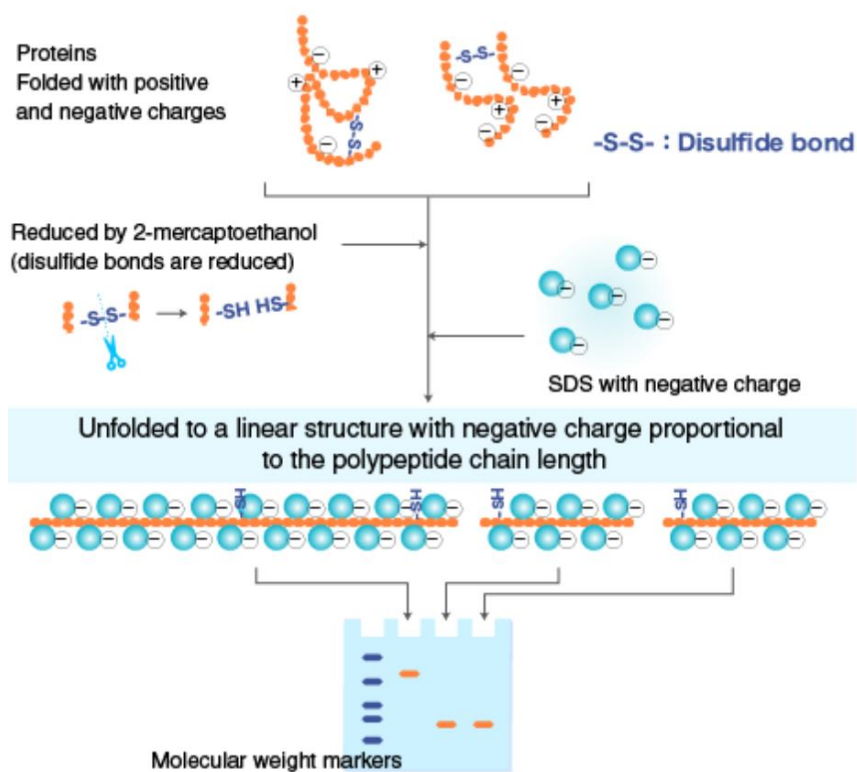
Όταν οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση μέσω μιας μήτρας πηκτής, οι μικρότερες πρωτεΐνες μεταναστεύουν γρηγορότερα λόγω της μικρότερης αντίστασης που συναντούν από τη μήτρα πηκτής. Άλλοι παράγοντες του ρυθμού μετανάστευσης μέσω μιας μήτρας πηκτής περιλαμβάνουν τη δομή και το φορτίο των πρωτεϊνών.

Στο *SDS-PAGE* η χρήση του θειικού δωδεκύλιο νατρίου (Εικόνα 36) ή αλλιώς λαουροθειικού νατρίου (*SDS, Sodium Dodecyl Sulfate*) και γέλης πολυακρυλαμιδίου εξαλείφει σε μεγάλο βαθμό την επίδραση της δομής και του φορτίου και βοηθά στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών αποκλειστικά με βάση το μήκος της αλυσίδας του πολυπεπτιδίου.



Εικόνα 36. Θειικό Δωδεκύλιο Νάτριο ή Λαουροθειικό Νάτριο (*SDS, Sodium Dodecyl Sulfate*) [104].

Το SDS είναι ένα απορρυπαντικό που επιδρά ισχυρά στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και συνδέεται κατά μήκος της πρωτεΐνης σε σταθερή γραμμομοριακή αναλογία. Παρουσία του SDS και ενός αναγωγικού παράγοντα που διασπά δισουλφιδικούς δεσμούς κρίσιμους για τη σωστή αναδίπλωση, οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται σε γραμμικές αλυσίδες με αρνητικό φορτίο ανάλογο του μήκους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Εικόνα 37).



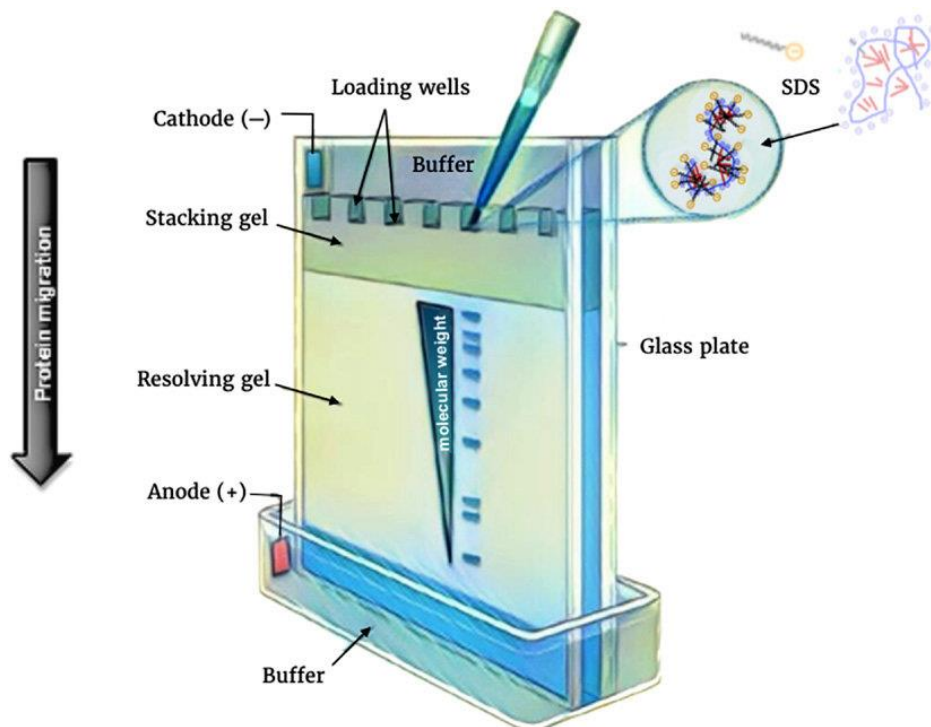
Εικόνα 37. Διαδικασία ξεδίπλωσης της πρωτεϊνικής αλυσίδας με χρήση του SDS [105].

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται από την αντίδραση ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου (N,N-μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδιο) που οδηγεί σε πλέγμα πηκτής με διασταυρούμενη σύνδεση. Το gel δρα ως κόσκινο μέσω του οποίου οι πρωτεΐνες κινούνται λόγω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου. Οι πρωτεΐνες περιέχουν ένα συνολικό θετικό ή αρνητικό φορτίο. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την κίνηση ενός μορίου πρωτεΐνης προς το ισοηλεκτρικό σημείο, εκεί όπου το μόριο είναι ηλεκτρικά ουδέτερο. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται και αποκτούν ένα ομοιόμορφο αρνητικό φορτίο το οποίο καθιστά εφικτό το διαχωρισμό τους βάσει μεγέθους.

Συγκεκριμένα κατά την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου όλες οι συνδεδεμένες με SDS πρωτεΐνες σε ένα δείγμα μετακινούνται μέσα στο gel προς το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο, με διαφορετική ταχύτητα. Οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες κινούνται πιο αργά, ενώ αντίθετα οι μικρότερες σε μέγεθος προχωρούν πολύ γρήγορα μέσα στο gel ελκνόμενες από το θετικό ηλεκτρόδιο.

Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός διαφόρων ζωνών κατά μήκος της πηκτής πολυακρυλαμιδίου όπου σε κάθε μία από τις οποίες συσσωρεύονται πρωτεΐνες παραπλήσιων μοριακών μαζών. Οι ζώνες αυτές στη συνέχεια χρωματίζονται με ειδικές τεχνικές βαφής προκειμένου να γίνουν εμφανείς.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται συνοπτικά η διαδικασία (Εικόνα 38).



Εικόνα 38. Αναπαράσταση της διεργασίας της ηλεκτροφόρησης με το *SDS-PAGE*.

Στο *SDS-PAGE* που πραγματοποιήθηκε για τα δείγματα A, B και C φορτώθηκαν τα ίδια τα δείγματα σε δύο διαφορετικές ποσότητες 13 και 6,5 μL . Επίσης, στις δύο άκρες του gel φορτώθηκε ένα μίγμα πρωτεϊνών συγκεκριμένου μοριακού βάρους (*Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards, Biorad*), το οποίο σχηματίζει 10 ζώνες σε διαφορετικές αποστάσεις από την κορυφή του gel και λειτουργεί ως οδηγός για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών στα άγνωστα δείγματα. Έπειτα από τη διαδικασία ηλεκτροφόρησης, το gel χρωματίστηκε αρχικά με *Coomassie Blue G-250*, αλλά επειδή οι μπάντες των πρωτεϊνών που εμφανίστηκαν από τα δείγματα A, B και C ήταν ελάχιστες, ακολουθήθηκε χρωματισμός του gel και με χρώση αργύρου (*silver staining*). Η λογική σε αυτή την τεχνική χρωματισμού βασίζεται στη σύνδεση των πρωτεϊνών με ιόντα αργύρου, τα οποία κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να αναχθούν και να φτιάξουν μια ορατή εικόνα με μεταλλικό άργυρο [106].

3.2.5 Πρωτόκολλο παραλαβής Τετραδοτοξίνης από το μυϊκό ιστό και τα εσωτερικά όργανα του λαγοκέφαλου *L. sceleratus*

Για την απομόνωση της TTX του λαγοκέφαλου *L. sceleratus* από το μυϊκό ιστό και τα εσωτερικά του όργανα έλαβε χώρα η ίδια πειραματική διαδικασία και για τα δύο είδη διαλυτών. Στη συνέχεια ακολουθεί η περιγραφή για την παραλαβή της TTX από το μυϊκό ιστό με χρήση του υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1 % v/v:

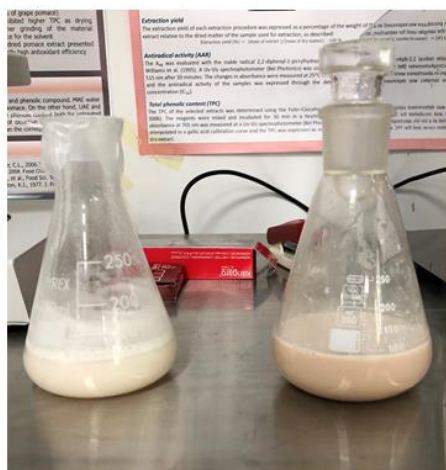
- Ζύγιση 30 g μυϊκού ιστού τα οποία εν συνεχεία τεμαχίστηκαν σε μπλέντερ,
- μεταφορά του δείγματος σε κωνική φιάλη των 250 mL όπου και αναμίχθηκαν με 100 mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1 % v/v,
- συσκευασία του μίγματος και μεταφορά σε ομογενοποιητή (BagMixer, Interscience) για 10 min (Εικόνα 39),
- μεταφορά σε κωνική φιάλη των 250 mL και βύθιση σε λουτρό υπερήχων (Witeg A22H Ultrasonic Bath) για 10 min (Εικόνα 40),
- κατάψυξη του μίγματος σε θερμοκρασία $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 10 min,
- φυγοκέντρωση για 30 min στις 3500 rpm,
- λήψη του υπερκείμενου υγρού και διατήρηση στην κατάψυξη μέχρι την πραγματοποίηση της ανάλυσης με υγρή χρωματογραφία με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS).

Για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμός της TTX με LC-MS/MS, τα δείγματα με το υπερκείμενο υγρό εστάλησαν στο Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών στο Ηράκλειο Κρήτης. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

- Καθαρισμός 0.5 mL του δείγματος με εφαρμογή εκχύλισης στερεής φάσης. Το προσροφητικό στις μικροστήλες SPE (10 mg) αποτελείται από πολυμερικό υλικό ανταλλαγής ισχυρών κατιόντων,
- έκλουση της τετραδοτοξίνης και των αναλόγων της από τις μικροστήλες με χρήση 0.8 mL $\text{HCl}_{(aq)}$ συγκέντρωσης 0.1 N,
- αραίωση των δειγμάτων με νερό σε αναλογία 1:20,
- ανάλυση με LC-MS/MS (Agilent 6460C triple quadrupole mass spectrometer συζευγμένο με Agilent 1260 Infinity binary HPLC),
- ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της TTX και των παραγώγων της με τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου με χρήση του πιστοποιημένου υλικού αναφοράς (CRM-03-TTXs) της εταιρείας CIFGA.



Εικόνα 39. Ομογενοποιητής (BagMixer, Interscience).



Εικόνα 40. Λουτρό υπερήχων (Witeg A22H Ultrasonic Bath) στο οποίο λαμβάνει χώρα η εκχύλιση του μυϊκού ιστού (διαυγές χρώμα) και των οργάνων (σκούρο χρώμα) του *L. sceleratus*.

Το σύστημα LC λειτουργεί μέσω του περιβάλλοντος του προγράμματος ESI (electrospray ionization) σε λειτουργία θετικού ιόντος χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες παραμέτρους:

- ✓ αέριο κουρτίνας (curtain gas) πίεσης 15 psi,
- ✓ αέριο διάσπασης που ενεργοποιείται από σύγκρουση πίεσης 6 psi,
- ✓ τάση ψεκασμού ιόντων 4000 V,
- ✓ θερμοκρασία 350 °C,
- ✓ πίεση νεφελοποιητή 40 psi,

Αυτή η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη στήλη Supelco C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm). Οι τοξίνες εκλούστηκαν εντός της στήλης με δύο κινητές φάσεις οι οποίες σχηματίστηκαν χρησιμοποιώντας 1% ακετονιτρίλιο, 20 mM επταφθοροβουτυρικό οξύ, 20 mM υδροξείδιο του αμμωνίου και 10 mM μυρμηκικού

αμμωνίου (pH 4.0 με μυρμηκικό οξύ) (**έκλουσμα Α**) και το ίδιο μίγμα αλλά με 5% ακετονιτρίλιο (**έκλουσμα Β**) χρησιμοποιώντας την ακόλουθη διαβάθμιση: 100% Α για τα πρώτα 22 min, 100% Β για τα επόμενα 18 min και ξανά 100% Α για τα επόμενα 3 min πριν από την επόμενη ένεση. Επίσης ο ρυθμός ροής ήταν $0.4 \frac{mL}{min}$. Η θερμοκρασία του φούρνου στήλης ρυθμίστηκε στους 20 °C και ο όγκος της ένεσης στα 4 μL.

Το σύστημα MS χρησιμοποιήθηκε σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (Multiple Reactions Monitoring, MRM), αναλύοντας δύο προϊόντα ιόντων ανά ένωση: το ένα για ποσοτικοποίηση και το άλλο για επιβεβαίωση. Οι παράμετροι φασματομέτρου μάζας προσαρμόστηκαν έτσι ώστε να ληφθεί ένα σήμα μέγιστης έντασης και σταθερότητας. Για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας του MS το διάλυμα του δείγματος εγχύθηκε απευθείας στην πηγή ηλεκτροψεκασμού με ταχύτητα ροής $0.2 \frac{mL}{min}$ με τη βοήθεια μιας αντλίας σύριγγας. Το σύστημα MS προγραμματίστηκε να λειτουργεί στη θετική λειτουργία ιόντων χρησιμοποιώντας τη παραγωγή ιόντων σάρωσης με κώνο αερίου τάσης 40 V, τριχοειδής τάσης 2.8 kV, θερμοκρασία πηγής 100 °C, θερμοκρασία αποσύνθεσης 350 °C και ενέργεια σύγκρουσης 3 eV.

3.2.6 Ενθυλάκωση της Τετραδοτοξίνης του *L.scleratus* σε μήτρα ζεΐνης μέσω ηλεκτροστατικού ψεκασμού

Έπειτα από την απομόνωση της TTX από το λαγοκέφαλο *L.scleratus* επόμενος στόχος της εν λόγω διπλωματικής αποτέλεσε η προσπάθεια ενθυλάκωσης της τοξίνης αυτής με σκοπό την αξιοποίησή της σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως τα καλλυντικοτεχνικά προϊόντα. Η μελέτη εγκλεισμού έγινε με χρήση της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού (electrospraying) και η πολυμερική μήτρα που χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό ήταν η ζεΐνη.

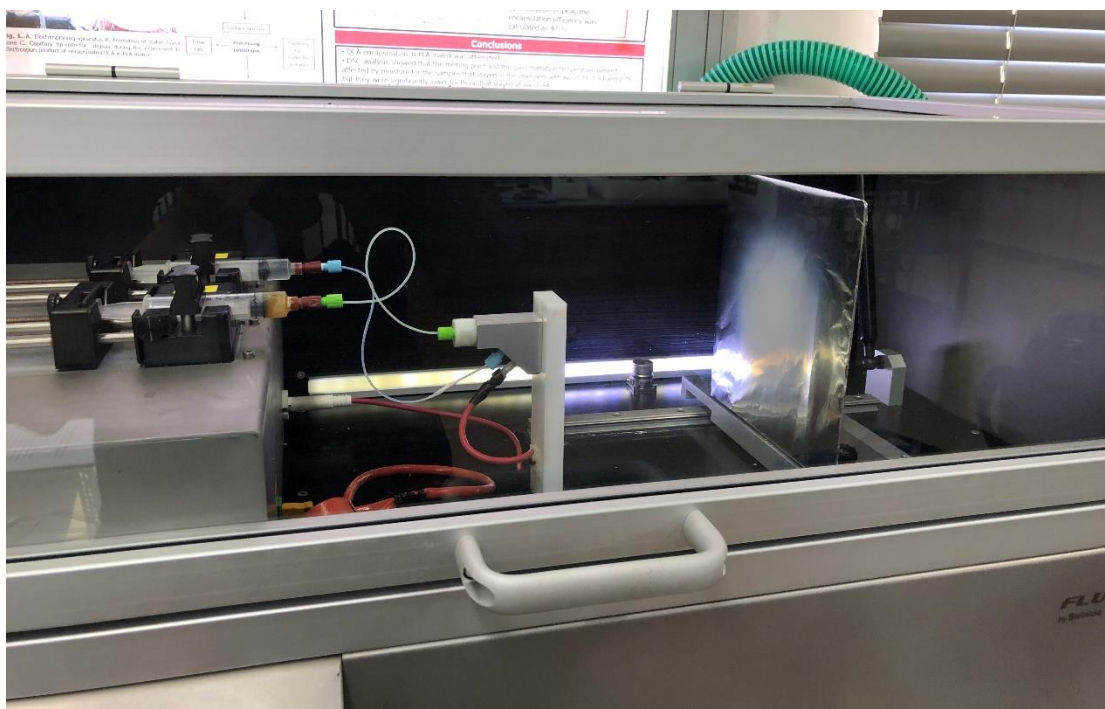
Η ζεΐνη είναι μια προλαμίνη του αραβόσιτου η οποία χρησιμοποιείται ως υλικό μήτρας για την παραγωγή τροφίμων και φαρμάκων λόγω των σπουδαίων ιδιοτήτων της. Οι προλαμίνες είναι μια ομάδα πρωτεϊνών αποθήκευσης φυτών που έχουν αυξημένη περιεκτικότητα σε αμινοξέα προλίνης και εντοπίζονται κυρίως σε σπόρους δημητριακών όπως σιτάρι, κριθάρι, σίκαλη, καλαμπόκι, σόργο και βρώμη. Η ζεΐνη είναι αδιάλυτη στο νερό και στην καθαρή αλκοόλη (εκτός από την περίπτωση της μεθανόλης) αλλά διαλυτή σε δυαδικό διάλυμα αλκοόλης (60-90 %) νερού. Έχει επίσης υψηλή θερμοκρασία θερμικής αποσύνθεσης (> 300 °C) και εξαιρετικές μηχανικές, αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Επίσης, η ζεΐνη περιέχει σχεδόν ίση ποσότητα υδρόφοβων (λευκίνη, αλανίνη, προλίνη) και υδρόφιλων αμινοξέων (γλουταμινικό οξύ) και είναι άγευστη και άοσμη [107]. Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος και την έγκρισή της ως GRAS από τον FDA συνιστούν τη ζεΐνη ως ένα ιδανικό υλικό για χρήση ως μήτρα [108].

Οι νανοδομές της ενθυλακωμένης τοξίνης θα αναπτυχθούν και θα χαρακτηριστούν χρησιμοποιώντας ως υλικό τοιχώματος τη ζεΐνη. Οι αναπτυγμένες δομές θα χαρακτηριστούν πλήρως σύμφωνα με την απόδοση εγκλεισμού και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους χρησιμοποιώντας αναλυτικές μεθόδους και κατάλληλα πρωτόκολλα. Συγκεκριμένα, ο χαρακτηρισμός θα εφαρμοστεί μέσω Μικροσκοπία Ηλεκτρονικής Σάρωσης (SEM), Ανάλυσης Μεγέθους Σωματιδίων (Particle Size Distribution), Φασματοσκοπία Υπερύθρου Ολικής Ανάκλασης (ATR-FTIR), Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) και Υγρής χρωματογραφίας-Φασματομετρία μάζας (LC-MS).

Οι νιφάδες ζεΐνης διαλύθηκαν σε ένα διάλυμα μεθανόλης/νερού (70 % MeOH, 30 % H₂O) με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα (*M 6.1, Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer 141 GmbH, Ballrechten-Dottingen, Germany*) για 3 ώρες. Η συγκέντρωση της ζεΐνης ήταν 10 % w/v και ο συνολικός όγκος του διαλύματος που προετοιμαζόταν κάθε εργαστηριακή ημέρα για τη συσκευή του electrospraying ήταν 10 mL καθώς σε περίπτωση όπου το διάλυμα αποθηκευόταν στη συντήρηση για την επόμενη ημέρα αυτό δε μπορούσε να χρησιμοποιηθεί διότι η ζεΐνη σχημάτιζε μεγάλα συσσωματώματα όπου ήταν αδύνατο να επαναδιαλυτοποιηθούν.

Στη συνέχεια μέσα στο διάλυμα αυτό προστέθηκε η εκχυλισμένη τετραδοτοξίνη συγκέντρωσης $0.782 \frac{\mu\text{g TTX}}{\text{mL } \delta/\tau\omicron\varsigma}$ με τη βοήθεια πιπέτας με την αναλογία μεταξύ τοξίνης-πολυμερικής μήτρας να είναι 1:12. Η ανάδευση συνεχίστηκε για άλλη μία ώρα

προκειμένου να διασφαλιστεί η πλήρης διάλυση των υλικών πριν από τη διεργασία του electro spraying.



Εικόνα 41. Διάταξη Electro spraying (Biolnacia FLUIDNATEK LE-10) σε λειτουργία.

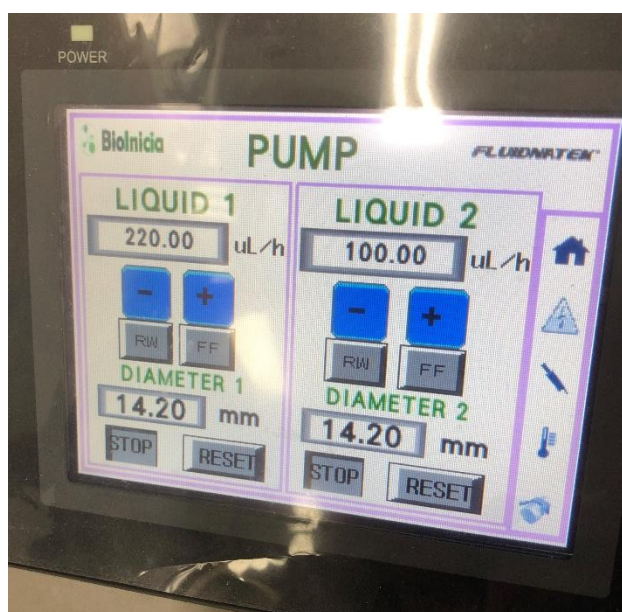
Αξίζει να σημειωθεί ότι από τη στιγμή όπου τόσο το πολυμερικό διάλυμα όσο και η ουσία προς εγκλεισμό εντοπίζονται στο ίδιο διάλυμα η προσέγγιση η οποία ακολουθήθηκε είναι η μονοαξονική (uniaxial approach), γεγονός το οποίο όμως δε συνάδει με την Εικόνα 42. Η ύπαρξη της 2^{ης} τροφοδοσίας (σωληνάκι με τη μπλε υποδοχή) δεν εμπλέκεται στη διεργασία της μονοαξονικής προσέγγισης (σωληνάκι με την πράσινη υποδοχή) καθώς στη 2^η σύριγγα υπάρχει οξικό οξύ το οποίο τροφοδοτείται με πολύ αργό ρυθμό έτσι ώστε να βοηθά στη σωστή λειτουργία του electro spraying καθώς με την πάροδο του χρόνου το ιξώδες της ζεΐνης αυξάνεται μέχρι που φθάνει στο σημείο και φράζει την οπή του μεταλλικού ακροφύσιου (Εικόνα 42) από την οποία λαμβάνει χώρα ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός.



Εικόνα 42. Εξάρτημα της συσκευής του electro spraying. Πάνω δεξιά φαίνεται το μεταλλικό ακροφύσιο από όπου λαμβάνει χώρα ο ψεκασμός.

Συνοψίζοντας στη θέση 1 (σωληνάκι τεφλόν με την πράσινη υποδοχή) περιέχεται το βασικό διάλυμα όπου περιέχει τη μήτρα και την τοξίνη υπό ενθυλάκωση, στη θέση 2 (σωληνάκι τεφλόν με τη μπλε υποδοχή) περιέχεται καθαρό οξικό οξύ που βοηθά στη σωστή λειτουργία του electrospraying, ενώ το κόκκινο καλώδιο που συνδέεται διαγώνια κάτω από το σωληνάκι της θέσης 2 είναι η τροφοδοσία της τάσης. Για τη συλλογή των τελικών μικρο/νάνο σφαιριδίων έχει χρησιμοποιηθεί αλουμινόχαρτο καλής ποιότητας το οποίο και απλώνεται πάνω στην επιφάνεια συλλογής (200 mm x 200 mm). Η χρήση του αλουμινόχαρτου δεν είναι υποχρεωτική αλλά είναι εξαιρετικά βοηθητική καθώς επιτρέπει την εύκολη συλλογή και επανατοποθέτηση νέου χωρίς να λερώνεται η αρχική επιφάνεια. Επίσης η απόσταση μεταξύ του μεταλλικού ακροφυσίου και της επιφάνειας συλλογής αυξομειώνεται εύκολα από το χειριστή του πειράματος αφού πρώτα όμως έχει μηδενιστεί η τάση.

Η ρύθμιση της ροής των δύο τροφοδοσιών καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση γίνεται μέσω της οθόνης που βρίσκεται κάτω αριστερά του οργάνου (Εικόνα 43). Η ογκομετρική παροχή εκφράζεται είτε σε $\frac{\mu L}{h}$ είτε σε $\frac{mL}{h}$ ανάλογα με το μέγεθος (διάμετρο) της σύριγγας. Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν οι σύριγγες ήταν χωρητικότητας 10 mL και για το λόγο αυτό η επιλεγμένη μονάδα μέτρησης ογκομετρικής παροχής ήταν τα $\frac{\mu L}{h}$. Επίσης στην περίπτωση αυτή η ενδεδειγμένη διάμετρος είναι 14.2 mm.



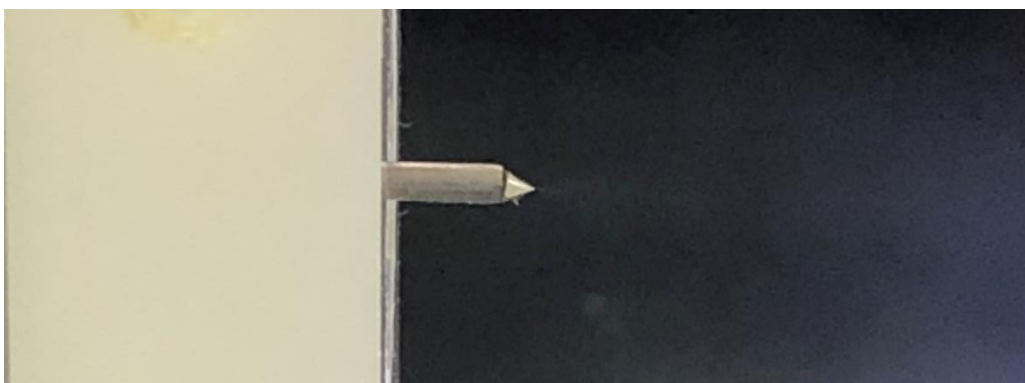
Εικόνα 43. Οθόνης ρύθμισης του ρυθμού ροής των 2 τροφοδοσιών (3^ο σύμβολο στα δεξιά της εικόνας) και της εφαρμοζόμενης τάσης (2^ο σύμβολο που έχει ένα κεραυνό).

Η συσκευή FluidNatek της εταιρίας (BioInicia S.L., Valencia, Spain) που χρησιμοποιήθηκε για τους σκοπούς της ενθυλάκωσης είναι εξοπλισμένη με μεταβλητή τροφοδοσία υψηλής τάσης 0–30 kV. Η άνοδος είναι στερεωμένη στον τριχοειδή σωλήνα από ανοξείδωτο χάλυβα που αναφέρθηκε προηγουμένως με εσωτερική διάμετρο 0,9 mm (στόμιο) και συνδέεται μέσω σωλήνων από τεφλόν PTFE με το διάλυμα βιοπολυμερούς. Η σύριγγα είναι προσανατολισμένη οριζόντια σε μια ψηφιακή ελεγχόμενη αντλία σύριγγας, ενώ η βελόνα είναι κατακόρυφα κατευθυνόμενη προς τον

συλλέκτη. Η βελόνα συνδέθηκε με το ηλεκτρόδιο εκπομπής θετικής πολικότητας της τροφοδοσίας υψηλής τάσης. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εγκλεισμού χρειάστηκαν πολλές εργαστηριακές ημέρες. Για την περίπτωση του electrospraying βέλτιστες συνθήκες επιτυγχάνονται όταν ο σχηματιζόμενος κώνος Taylor (Εικόνα 44) είναι σταθερός και ψεκάζει με ομοιόμορφο και συνεχή τρόπο (χωρίς ασυνέχειες). Επίσης στην επιφάνεια συλλογής πρέπει να σχηματίζεται ένας ευδιάκριτος κύκλος από μικροσφαιρίδια χωρίς την παρουσία υδροσταγονιδίων (Εικόνα 45). Για το λόγο αυτό έγιναν πολλά πειράματα συνδυάζοντας τις παραμέτρους της ογκομετρικής ροής, της απόστασης μεταξύ της επιφάνειας του συλλέκτη-τριχοειδούς άκρου και της τάσης.

Επίσης διερεύνηση έγινε τόσο για μικρότερες όσο και για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ζεΐνης. Τα αποτελέσματα ωστόσο δεν ήταν ενθαρρυντικά καθώς σε μικρότερες συγκεντρώσεις ήταν ανέφικτη η δημιουργία «πούδρας» στην επιφάνεια του συλλέκτη ενώ σε μεγαλύτερες το ιξώδες της ζεΐνης αυξανόταν δραματικά με αποτέλεσμα μετά από πολύ σύντομο χρονικό διάστημα να σχηματίζεται μια εμφανής ασυνέχεια στο διάλυμα (διαχωρισμός της ζεΐνης με το εκχύλισμα τετραδοτοξίνης) (Εικόνα 46).



Εικόνα 44. Σχηματιζόμενος κώνος Taylor κατά τη διάρκεια του electrospraying.



Εικόνα 45. Ευδιάκριτος κύκλος από μικροσφαιρίδια χωρίς την παρουσία υδροσταγονιδίων.



Εικόνα 46. Εμφανής ασυνέχεια στο διάλυμα (διαχωρισμός της ζεΐνης με το εκχύλισμα τετραδοτοξίνης).

Κατόπιν δοκιμών τα καλύτερα αποτελέσματα προκύπτουν όταν η επιφάνεια του συλλέκτη τοποθετήθηκε 13 έως 15 cm από το τριχοειδές άκρο, η ογκομετρική παροχή της θέσης 1 κυμαινόταν μεταξύ 200 και 300 $\frac{\mu L}{h}$ και η τάση κυμαινόταν από 25 έως 27 kV. Η ογκομετρική παροχή του οξικού οξέος (θέση 2) ήταν σταθερή στα 100 $\frac{\mu L}{h}$.

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται με συνοπτικό τρόπο η διερεύνηση διαφόρων συνδυασμών σχετικά με τις κυριότερες παραμέτρους που έλαβαν χώρα για την ενθυλάκωση της τετραδοτοξίνης σε διάλυμα ζεΐνης 10 % w/v.

Όπως φαίνεται οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας εμφανίζονται για ΑΣΑ 15 cm, ογκομετρική ροή 200 $\frac{\mu L}{h}$ και εφαρμοζόμενη τάση 26 kV.

Πίνακας 2. Διερεύνηση σχετικά με τις κυριότερες παραμέτρους που έλαβαν χώρα κατά την ενθυλάκωση της TTX σε μήτρα ζεΐνης.

Απόσταση συλλέκτη-ακροφυσίου (ΑΣΑ) (cm)	Ογκομετρική ροή (μL/h)	Εφαρμοζόμενη Τάση (kV)	Σχόλια
3	1000	17.5-20	Εξαιρετικά υψηλός ρυθμός ροής-πολύ μικρή η ΑΣΑ: σχηματισμός πολλών υδροσταγονιδίων στην επιφάνεια του συλλέκτη
5	900	17.5-23	
7	800	21-23	
9	700	23-25	Καλύτερη ΑΣΑ-υψηλός ρυθμός ροής: σχηματισμός λιγότερων υδροσταγονιδίων συγκριτικά με πριν/τείνει να σχηματιστεί κώνος Taylor
11	600	23-25	
13	500	24-26	Καλύτερη ΑΣΑ και ρυθμός ροής/σχηματισμός κώνου Taylor ο οποίος όμως δεν είναι σταθερός/πραγματοποιείται ψεκασμός
13	400	24-26	
14	350	25-27	Πολύ καλή ΑΣΑ και ρυθμός ροής- σταθερός κώνος Taylor-πραγματοποιείται ψεκασμός όμως μετά από σύντομο χρονικό διάστημα ο ψεκασμός δεν είναι συνεχής
15	300	25-27	Ιδανική απόσταση και ρυθμός ροής- σταθερός κώνος Taylor-πραγματοποιείται ψεκασμός χωρίς ασυνέχειες
15	300	26	Βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας
15	200	26	Με μείωση του ρυθμού ροής κάτω από $300 \frac{\mu L}{h}$ η διεργασία είναι εξαιρετικά αργή

3.2.6.1 Χαρακτηρισμός τελικού προϊόντος ενθυλάκωσης

Ο χαρακτηρισμός του τελικού προϊόντος ενθυλάκωσης θα γίνει μέσω μεθόδων Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης όπως Φασματοσκοπία Εξασθετισμένης Ολικής Ανάκλασης Υπερύθρου (*ATR-FTIR*), Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (*DSC*), Μικροσκοπία Ηλεκτρονικής Σάρωσης (*SEM*), Ανάλυσης Μεγέθους Σωματιδίων (*Particle Size Distribution*) και Υγρής Χρωματογραφίας-Φασματομετρία Μάζας (*LC-MS*) για τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλεισμού.

3.2.6.1.1 Φασματοσκοπία Εξασθετισμένης Ολικής Ανάκλασης Υπερύθρου (*ATR-FTIR*)

Τα φασματόμετρα υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (*FTIR*) είναι φασματόμετρα απλής δέσμης τα οποία δε διαθέτουν μονοχρωμάτορα φράγματος καθώς διαθέτουν ένα συμβολόμετρο τύπου Michelson. Το συμβολόμετρο αυτό εντοπίζεται μεταξύ της πηγής και του δείγματος. Σε μία τυπική διαδικασία λήψης φάσματος διαπερατότητας ή απορρόφησης εκτελούνται τα εξής βήματα:

- Λήψη του συμβολογράμματος αναφοράς με σάρωση του υλικού αναφοράς 20-30 φορές ,
- υπολογισμός της μέσης μορφής του συμβολογράμματος με το αποτέλεσμα να αποθηκεύεται στη μνήμη του υπολογιστή του οργάνου αφού προηγουμένως έχει μετασχηματιστεί σε φάσμα,
- τοποθέτηση του δείγματος στην πορεία της δέσμης,
- επανάληψη διαδικασίας,
- υπολογισμός των λόγων των φασματικών δεδομένων του δείγματος μέτρησης και αναφοράς για τη λήψη διαπερατότητας σε διάφορες συχνότητες,
- υπολογισμός της απορρόφησης συναρτήσει του κυματηριθμού.

Η φασματοσκοπία εσωτερικής ανάκλασης αποτελεί μία τεχνική λήψης φασμάτων υπερύθρου δειγμάτων τα οποία είναι δύσκολα στο χειρισμό όπως στερεά μικρής διαλυτότητας, μίμ υμένα, ίνες, πάστες, κολλοειδή και σκόνες [109]. Τα φάσματα *ATR* είναι παρόμοια με τα κανονικά φάσματα απορρόφησης αλλά υπάρχουν ωστόσο σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Σε γενικές γραμμές ενώ παρατηρούνται οι ίδιες κορυφές διαφέρουν οι σχετικές εντάσεις τους. Οι τιμές απορρόφησης ενώ είναι εξαρτώμενες της γωνίας πρόσπτωσης δεν εξαρτώνται από το πάχος του δείγματος καθώς η ακτινοβολία διεισδύει μόνο κατά μερικά μικρόμετρα στο δείγμα [110].

Ένα από τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας *ATR* είναι ότι ένα μεγάλο ποσοστό των φασμάτων απορρόφησης λαμβάνονται άμεσα και με ελάχιστη προετοιμασία. Ίνες νήματα και υφάσματα μπορούν να εξετασθούν με απλή εναπόθεσή τους πάνω στον στερεό κρύσταλλο, ενώ με παρόμοιο τρόπο αντιμετωπίζονται πάστες, σκόνες και εναιωρήματα. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν υδατικά διαλύματα με την προϋπόθεση ο κρύσταλλος να μην είναι διαλυτός στο νερό.

Στην παρούσα εργασία με την εν λόγω μέθοδο αξιολογήθηκαν τα συνθετικά και χημικά χαρακτηριστικά των σωματιδίων που προέκυψαν από τον ηλεκτροστατικό ψεκασμό με χρήση ενός φασματομέτρου υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (Εικόνα 47) (*FT/IR-4200, JASCO International Co., Ltd., Tokyo, Japan*) με προσαρτημένη μονάδα

εξασθετισμένης ολικής ανάκλασης (ATR PRO-410-S, JASCO International Co., Ltd., Tokyo, Japan).



Εικόνα 47. Φασματοόμετρο υπερόθρου μετασχηματισμού Fourier (FT/IR-4200, JASCO International Co., Ltd., Tokyo, Japan) με προσαρτημένη μονάδα εξασθετισμένης ολικής ανάκλασης.

Τα δείγματα που αναλύθηκαν είναι μικροσφαιρίδια ζεΐνης που προέκυψαν από το electrospraying, το εκχύλισμα της τοξίνης (υγρή μορφή) και το τελικό προϊόν ενθυλάκωσης που προέκυψε από το electrospraying.

Η διαδικασία που έλαβε χώρα για τη λήψη των φασμάτων είναι η εξής:

- ✓ Σάρωση χωρίς δείγμα ώστε να μηδενιστεί ο θόρυβος.
- ✓ τοποθέτηση επαρκούς ποσότητας δείγματος στο κέντρο της επιφάνειας μέτρησης του οργάνου (με τη βοήθεια σπαθίδας στην περίπτωση των στερεών δειγμάτων),
- ✓ σφράγισμα του οργάνου,
- ✓ πραγματοποίηση σάρωσης σε λειτουργικά μήκη κύματος στην περιοχή μεταξύ 4000 και 700 cm^{-1} . Κάθε μέτρηση ήταν αποτέλεσμα 32 σαρώσεων σε ανάλυση 4 cm^{-1} .

3.2.6.1.2 Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης αποτελεί μία εκ των πιο γνωστών θερμικών αναλυτικών μεθόδων κυρίως λόγω της ταχύτητας, της απλότητας και της

διαθεσιμότητάς της. Το δείγμα και ένα υλικό αναφοράς τοποθετούνται στους αντίστοιχους υποδοχείς του οργάνου. Επίσης τα θερμοαντικά στοιχεία έχουν τη δυνατότητα να αυξάνουν τη θερμοκρασία με γραμμικό και καθορισμένο τρόπο (π.χ. $5 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$) ή να τη διατηρούν σε μία καθορισμένη τιμή [110].

Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι οργάνων DSC:

- ✓ DSC αντιστάθμισης ισχύος,
- ✓ DSC ροής θερμότητας,
- ✓ DSC διαμόρφωσης

Και στις τρεις περιπτώσεις παρέχεται ένα διάγραμμα ισχύος ως προς τη θερμοκρασία, το οποίο ονομάζεται θερμογράφημα.

Ένα τυπικό πείραμα αρχίζει με τη ζύγιση ενός κενού δίσκου δείγματος. Οι δίσκοι αυτοί συνήθως είναι κατασκευασμένοι από αργίλιο ή ανοξείδωτο χάλυβα. Στο δίσκο μεταφέρεται μια μικρή ποσότητα δείγματος η οποία δημιουργεί μια ομοιόμορφη στιβάδα στον πυθμένα του. Αφού τοποθετηθούν οι δίσκοι στις θέσεις τους εν συνεχεία διαβιβάζεται το αέριο καθαρισμού (συνήθως άζωτο ή ήλιο αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και αέρας ή οξυγόνο όταν εξετάζονται οξειδωτικές διεργασίες). Ο ρόλος του αερίου καθαρισμού είναι η απαλλαγή του δείγματος από την υγρασία και το οξυγόνο και η μεταφορά θερμότητας προς το δίσκο του δείγματος.

Μία εκ των πιο σημαντικών εφαρμογών της DSC είναι ο προσδιορισμός της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης T_g . Κατά την υαλώδη μετάπτωση το πολυμερές υφίστανται αλλαγές στον όγκο και μεταβολές τόσο στη ροή θερμότητας όσο και στη θερμοχωρητικότητα, η οποία μπορεί εύκολα να μετρηθεί με τη DSC.

Στην παρούσα εργασία η θερμική ανάλυση των σωματιδίων που προέκυψαν από τη διεργασία του electrospraying πραγματοποιήθηκε με ένα όργανο διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Pyris DSC-6 Perkin Elmer Ltd., Norwalk, USA) (Εικόνα 48). Ποσότητα 10 mg ζεϊνης και 10 mg ζεϊνης στην οποία έχει εγκλειστεί η TTX τοποθετήθηκε σε αλουμινένια καψίδια. Αυτά εν συνεχεία σφραγίστηκαν ερμητικά με καψίδια DSC χρησιμοποιώντας μια τυπική πρέσα δείγματος για την εν λόγω διεργασία (Perkin Elmer Ltd., Norwalk, USA).

Το δείγμα και το καψίδιο αναφοράς τοποθετήθηκαν στο εσωτερικό του θερμιδόμετρου και χρησιμοποιήθηκε ρυθμός θέρμανσης $5 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$ με σκοπό τη σάρωση των δειγμάτων υπό συνεχή ροή ξηρού αερίου N_2 . Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης T_g προσδιορίστηκε από τον δεύτερο κύκλο θέρμανσης ως το μεσαίο σημείο μετάβασης κατά το οποίο η μεταβολή της θερμικής ικανότητας είναι η μισή από αυτήν που απαιτείται για ολόκληρη τη διεργασία υαλώδους μετάπτωσης, έπειτα από τη θέρμανση των δειγμάτων από $0 - 200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του «half C_p » που παρέχεται από τη ρουτίνα του λογισμικού Pyris (Perkin- Elmer, US).



Εικόνα 48. Όργανο διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (Pyris DSC-6 Perkin Elmer Ltd., Norwalk, USA).

3.2.6.1.3 Μικροσκοπία Ηλεκτρονικής Σάρωσης (SEM)

Το μέγιστο όριο κατά το οποίο μπορεί να μεγθύνει ένα οπτικό μικροσκόπιο είναι περίπου 2000 φορές σε σχέση με το αρχικό αντικείμενο. Σε τέτοιες συνθήκες η χρήση της οπτικής μικροσκοπίας κρίνεται ανέφικτη καθώς δε μπορεί να αναδείξει λεπτομερώς τη μικροδομή. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ηλεκτρονικά μικροσκόπια τα οποία είναι ικανά να προσφέρουν πολύ μεγαλύτερες μεγεθύνσεις. Η μικροσκοπία ηλεκτρονικής σάρωσης είναι ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο και αποτελεί μια εκ των πιο σύγχρονων και ευέλικτων μεθόδων ανάλυσης της μικροσκοπικής δομής.

Η επιφάνεια του δοκιμίου σαρώνεται με μια δέσμη ηλεκτρονίων και η ανακλώμενη δέσμη ηλεκτρονίων συλλέγεται και εμφανίζεται με τον ίδιο ρυθμό σάρωσης σε ένα σωλήνα καθοδικών ακτινών. Η εικόνα που παρουσιάζει η οθόνη αναπαριστά τα επιφανειακά χαρακτηριστικά του δοκιμίου και μπορεί να αξιολογηθεί περαιτέρω καθώς υπάρχει η δυνατότητα φωτογράφησής της. Επίσης είναι ιδιαίτερος σημαντικό να είναι ηλεκτρικά αγωγίμη. Για το λόγο αυτό κατά την εξέταση μη αγωγίμων υλικών επιβάλλεται κατά την προετοιμασία των δειγμάτων η εναπόθεση ενός πολύ λεπτού μεταλλικού επιχρίσματος. Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να επιτευχθούν μεγεθύνσεις που κυμαίνονται από 10-50000. Τέλος με τον κατάλληλο επιπλέον εξοπλισμό δίδεται η δυνατότητα για ποιοτική και ημιποσοτική ανάλυση της στοιχειώδους σύστασης σε συγκεκριμένα εμβαδά επιφανειών.

Στην προκειμένη περίπτωση για την εξέταση της μορφολογίας των μικροσφαιριδίων χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο SEM (*Quanta 200, FEI, Oregon, USA*) (Εικόνα 49). Εν συνεχεία τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή επιχρυσώσης και ουσιαστικά ψεκάστηκαν με μίγμα χρυσού-παλλαδίου υπό κενό στη συσκευή SC7620 Mini Sputter Coater (*Quorum Technologies, West Sussex, UK*) (Εικόνα 50).



Εικόνα 49. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Quanta 200, FEI, Oregon, USA).



Εικόνα 50. Στα αριστερά φαίνεται η συσκευή επιχρύσωσης (SC7620 Mini Sputter Coater), ενώ στα δεξιά φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η συλλογή δείγματος μέσω των δειγματοφορέων πάνω στο αλουμινόχαρτο.

Όλα τα πειράματα SEM πραγματοποιήθηκαν σε τάση 15 kV ενώ το μέσο μέγεθος σωματιδίων υπολογίστηκε με τη βοήθεια της εφαρμογής *ImageJ Software*.

3.2.6.1.4 Κατανομή Μεγέθους Σωματιδίων (Particle Size Distribution)

Η κατανομή μεγέθους των δομών που προέκυψαν έπειτα από τη διεργασία του electrospraying υπολογίστηκε μέσω αναλυτή μεγέθους σωματιδίων περίθλασης laser (*Microtrac S3000/S3500 Series Light Scattering Particle Size Analyzer*) (Εικόνα) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα λογισμικού εφαρμογής *Microtrac FLEX* με δυνατότητα μέτρησης από 0.02 έως 2800 μικρά. Για τη συγκεκριμένη μέτρηση τα δείγματα κατανεμήθηκαν εντός μίας υγρής φάσης χωρίς όμως να διαλυθούν δημιουργώντας αιωρήματα.

3.2.6.1.5 Απόδοση Εγκλεισμού

Για τον προσδιορισμό της απόδοσης εγκλεισμού χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος με σκοπό την έκπλυση των σωματιδίων που προέκυψαν από τη διεργασία του electrospraying. Συγκεκριμένα συλλέχθηκαν 100 mg σωματιδίων και τοποθετήθηκαν μέσα σε μικρό πλαστικό falcon.

Εν συνεχεία μέσα στο falcon τοποθετήθηκαν 2.5 mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1 % v/v και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2500 rpm. Το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε και επαναδιαλύθηκε σε άλλα 2.5 mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1 % v/v (όχι στο προηγούμενο διάλυμα) και ξαναέλαβε χώρα φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Τέλος το τελικό υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε και στάλθηκε στο Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών στο Ηράκλειο Κρήτης με σκοπό τον προσδιορισμό της απόδοσης ενθυλάκωσης με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS) με ένα όργανο παγίδευσης ιόντων.

Η επιλογή του διαλύτη δεν ήταν τυχαία καθώς το υδατικό διάλυμα οξικού οξέος δε διαλύει τη ζεΐνη και ταυτοχρόνως είναι καλός διαλύτης για την ουσία που περιέχεται μέσα στα σωματίδια (TTX).

Για τον υπολογισμό της απόδοσης ενθυλάκωσης χρησιμοποιείται η ακόλουθη σχέση:

$$\text{Απόδοση Εγκλεισμού (AE)} = \left[\frac{C_{b.c.total} - C_{b.c.non-encaps.}}{C_{b.c.total}} \right] \cdot 100 \quad (3.1)$$

$C_{b.c.total}$: συγκέντρωση της συνολικής ποσότητας της ουσίας προς εγκλεισμό (στην προκειμένη περίπτωση TTX)

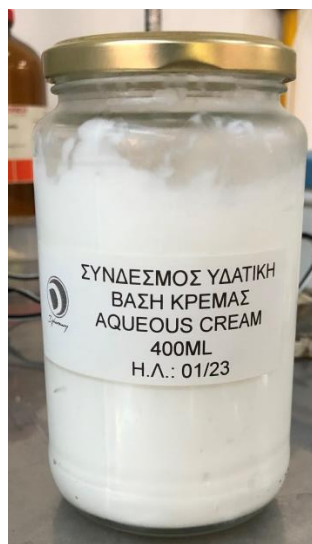
$C_{b.c.non-encaps}$: συγκέντρωση της TTX στο υπερκείμενο υγρό

3.2.7 Ανάπτυξη καλλυντικών κρεμών – Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός και μελέτη διατηρησιμότητας

Η ανάπτυξη και μικροβιολογική ανάλυση καλλυντικών κρεμών έγινε στα πλαίσια διερεύνησης της επίδρασης προσθήκης της εγκλεισμένης TTX ως πρόσθετο συστατικό σε τυπική φόρμουλα καλλυντικών κρεμών με σκοπό την υποκατάσταση του συνθετικού μπότοξ με την τετραδοτοξίνη του λαγοκέφαλου.

Συγκεκριμένα δεδομένου ότι ο *L.scleratus* αποτελεί μια πλούσια πηγή TTX, η οποία είναι 10 φορές δραστικότερη της τοξίνης του Botox, και ότι η τιμή της ένεσης κοστολογείται στα $\frac{430 \$}{ng}$ [111] κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί το κατά πόσο δύναται να αντικατασταθεί η τοξίνη του Botox με την TTX του *L.scleratus*.

Για το σκοπό αυτό έγινε προσπάθεια ενσωμάτωσης των σωματιδίων (με την εγκλεισμένη TTX από τη διεργασία του electrospraying) σε καλλυντική κρέμα βάσης χωρίς πρόσθετα (Εικόνα 51). Ουσιαστικά το τελικό προϊόν θα είναι μία καλλυντική κρέμα η οποία θα μιμείται τη δράση του μπότοξ, το οποίο δρα ακριβώς πάνω στους δερματικούς μύες εμποδίζοντας τις συσπάσεις τους.



Εικόνα 51. Υδατική κρέμα βάσης.

Η μέθοδος ηλεκτροστατικού ψεκασμού παράγει θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια ζεΐνης ενώ το δέρμα μπορεί να χαρακτηριστεί ως μία αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη λόγω της περίσσειας αρνητικά φορτισμένων λιπιδίων [112]. Αυτό το αντίθετο φορτίο διευκολύνει την πρόσφυση και τη διαπερατότητα των νανοσωματιδίων στα στρώματα του δέρματος [113].

Η επιθυμητή ποσότητα δραστικών συστατικών (ΤΤΧ στην προκειμένη περίπτωση) που πρέπει να περιέχονται στην κρέμα ισοδυναμεί με το 1 % του βάρους της. Συνεπώς για τις ανάγκες του πειράματος θα αναλυθούν δύο ειδών κρέμας: η κρέμα βάση και η κρέμα βάση με τα εγκλεισμένα σωματίδια ζεΐνης που περιέχουν ΤΤΧ.

Για τους σκοπούς της μικροβιολογικής ανάλυσης το υλικό διαχωρίστηκε σε 24 (3x8) μέρη (βαζάκια όγκου 20 mL). Από αυτά τα 12 περιείχαν την κρέμα βάση και τα υπόλοιπα 12 την κρέμα με το εγκλεισμένο υλικό. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες 4, 25 και 45 °C και αναλύθηκαν στο χρόνο μηδέν και εν συνεχεία έπειτα από 15, 30 και 45 ημέρες αντίστοιχα. Ουσιαστικά αναλύθηκαν τα δύο είδη κρέμας σε κάθε θερμοκρασία και για όλους τους χρόνους ($t = 0, t = 15, t = 30, t = 45$).

Όλα τα καλλυντικά προϊόντα που πωλούνται στην Ευρωπαϊκή Ένωση πρέπει να παράγονται σύμφωνα με την καλή παρασκευαστική πρακτική (GMP). Το GMP απαιτεί η παρτίδα των καλλυντικών προϊόντων να δοκιμάζεται αναφορικά με τις μικροβιολογικές, φυσικές και χημικές ιδιότητες, προκειμένου να διασφαλίζεται η ασφάλεια και η ποιότητα κάθε παρτίδας.

Τέλος πραγματοποιήθηκαν ρεολογικές δοκιμές ταλάντωσης (δοκιμές σάρωσης συχνότητας) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της Δυναμικής Μηχανικής Ανάλυσης (DMA) προκειμένου να αξιολογηθούν οι μεταβολές του συντελεστή αποθήκευσης (G'), του συντελεστή απώλειας (G'') και του σύνθετου ιξώδους (η^*).

3.2.7.1 Πρωτόκολλο μικροβιολογικής ανάλυσης

Η μικροβιολογική ανάλυση έλαβε χώρα σε απαγωγό μικροβιολογίας (*NÜVE MN 090 Microbiological Safety Cabinet*) (Εικόνα 52). Τα βήματα που ακολουθούν στη συνέχεια αφορούν όλες τις περιόδους δειγματοληψίας ($t = 0, t = 15, t = 30, t = 45$) και έχουν ως εξής:

- Αποστείρωση όλων των σκευών που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια του μικροβιολογικού ελέγχου,
- παρασκευή διαλύματος Ringer με διάλυση μια ταμπλέτας σε 500mL απιονισμένο νερό,
- επάλειψη των συσκευασιών που περιέχουν τα δείγματα με τις κρέμες με αιθανόλη πριν το άνοιγμά τους,
- λήψη 1g από κάθε κρέμα κάτω υπό ασηπτικές συνθήκες και τοποθέτηση αυτού σε 9 mL διαλύματος Ringer,
- ανάδευση του διαλύματος στο Vortex (*VORTEX-GENIE 2*),
- προσδιορισμός της μικροβιακής σταθερότητας με έλεγχο του ολικού μικροβιακού φορτίου, των ζυμών/μούχλων και του παθογόνου βακτηρίου *E.coli*.



Εικόνα 52. Απαγωγός μικροβιολογίας (*NÜVE MN 090 Microbiological Safety Cabinet*).

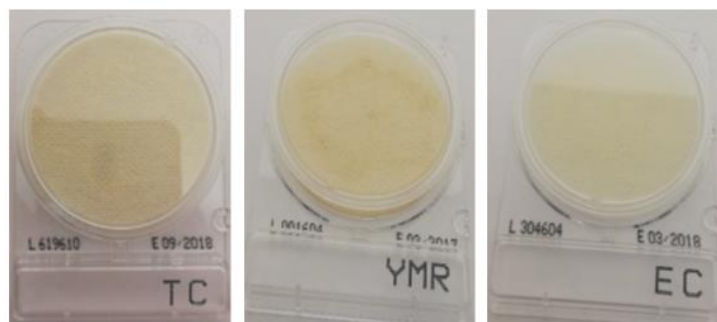
Ο προσδιορισμός του ολικού μικροβιακού φορτίου έγινε με τη βοήθεια ειδικών τρυβλίων (*Compact Dry TC, Hyserve GmbH&Co.KG, Uffing, Germany*) που περιέχουν το κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Για το λόγο αυτό απλώθηκε κατά μήκος της επιφάνειας του τρυβλίου 1 mL από το αραιωμένο διάλυμα και έπειτα επώαστηκε στους 37 °C για 48 ώρες. Κατόπιν μετρήθηκε ο αριθμός των αποικιών.

Ο έλεγχος των κρεμών σχετικά με τη δυνατότητα ανάπτυξης μυκήτων όπως οι ζύμες/μούχλες είναι επιτακτικός καθώς οι μύκητες δύναται να προκαλέσουν σοβαρές

μολύνσεις του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο προσδιορισμός τους έγινε με τη βοήθεια ειδικών τρυβλίων (*Compact Dry YM, Hyserve GmbH&Co.KG, Uffing, Germany*). Συγκεκριμένα απλώθηκε κατά μήκος της επιφάνειας του τρυβλίου 1 mL από το αραιωμένο διάλυμα και έπειτα επώαστηκε στους 30 °C για 72 ώρες.

Η πιθανή ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *E.coli* αποτελεί και αυτή βασικό σημείο διερεύνησης σχετικά με το μικροβιολογικό έλεγχο των κρεμών. Ο προσδιορισμός τους έγινε με τη βοήθεια ειδικών τρυβλίων (*Compact Dry EC, Hyserve GmbH&Co.KG, Uffing, Germany*) και για την απαρίθμηση των αποικιών απλώθηκε κατά μήκος της επιφάνειας του τρυβλίου 1 mL από το αραιωμένο διάλυμα με επώαση στους 37 °C (Εικόνα 54) για 24 ώρες. Η επώαση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του οργάνου (*TK 120 TEST CABINETS of Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş*).

Τα τρία διαφορετικά είδη τρυβλίων που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες του πειράματος παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 53).



Εικόνα 53. Τρυβλία ελέγχου ολικού μικροβιακού φορτίου, ζυμών/μούχλας και *E.coli*.



Εικόνα 54. TK 120 TEST CABINETS, Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş).

3.2.7.2 Μέτρηση οξύτητας (pH)

Το βέλτιστο pH για την ανθρώπινη επιδερμίδα είναι περίπου στο 5.5. Στόχος των περισσότερων εταιριών προϊόντων περιποίησης είναι η δημιουργία σκευασμάτων όπου το pH τους να είναι φιλικό προς την επιδερμίδα έτσι ώστε να μη διαταράσσουν το μηχανισμό άμυνας του δέρματος (έκκριση λιπαρότητας, ιδρώτα και λεμφικών υγρών). Στην περίπτωση λοιπόν όπου διαταραχθεί ο μηχανισμός αυτός (κατά βάση λόγω κακής ποιότητας καλλυντικοτεχνικών προϊόντων) η επιδερμίδα χάνει την ισορροπία της και ταυτόχρονα τη δυνατότητα να απορροφά θρεπτικά συστατικά.

Για το λόγο αυτό γίνεται μελέτη της οξύτητας των κρεμών σε όλους τους χρόνους ($t = 0, t = 15, t = 30, t = 45$) και για όλες τις θερμοκρασίες αποθήκευσης (4, 25 και 45 °C).

Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία όπου ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της οξύτητας των κρεμών.

- ✓ παρασκευή διαλύματος Ringer με διάλυση μια ταμπλέτας σε 500mL απιονισμένο νερό,
- ✓ λήψη 1g από κάθε κρέμα και τοποθέτηση αυτής σε 9 mL διαλύματος Ringer. (τοποθέτηση δείγματος και διαλύματος σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα),
- ✓ μέτρηση pH για κάθε δείγμα με τη βοήθεια ηλεκτρονικού πεχάμετρου (*MARTINI Instruments 180 Bench Meter*) (Εικόνα 55).



Εικόνα 55. Πεχάμετρο (MARTINI Instruments 180 Bench Meter).

3.2.7.3 Μέτρηση Χρώματος

Ο έλεγχος της μεταβολής του χρώματος των κρεμών έλαβε χώρα για κάθε θερμοκρασία και για όλους τους χρόνους αποθήκευσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε χρωματομετρικό φασματοφωτόμετρο (*MiniScan XE Hunter Associates Laboratory Inc, Reston, Virginia*) (Εικόνα 56).



Εικόνα 56. Χρωματόμετρο (MiniScan XE Hunter Associates Laboratory Inc, Reston, Virginia).

Το όργανο αυτό χρησιμοποιεί μια πηγή φωτός για να φωτίσει το υπό μελέτη δείγμα. Το φως που αντανακλάται από το αντικείμενο περνά στη συνέχεια από ένα πλέγμα περίθλασης, το οποίο δημιουργεί και το αντίστοιχο φάσμα. Έπειτα το φάσμα πέφτει πάνω σε μια διάταξη που μετρά την ποσότητα φωτός σε κάθε εύρος κύματος. Τα φασματικά αυτά δεδομένα αποστέλλονται στον επεξεργαστή όπου πολλαπλασιάζονται μαζί με τις τιμές του πίνακα δεδομένων για τον επιλεγμένο φωτισμό CIE για να ληφθούν εν τέλει οι τιμές X, Y και Z.

Λόγου του γεγονότος ότι οι τιμές αυτές δεν είναι εύκολα κατανοητές ως προς το χρώμα του αντικειμένου έχουν αναπτυχθεί άλλες κλίμακες χρωμάτων οι οποίες σχετίζονται καλύτερα με το πώς αντιλαμβάνεται το ανθρώπινο μάτι το χρώμα. Μία από αυτές τις κλίμακες όπου εφαρμόζεται και από το χρωματομετρικό φασματοφωτόμετρο είναι η κλίμακα Hunter (L,a,b).

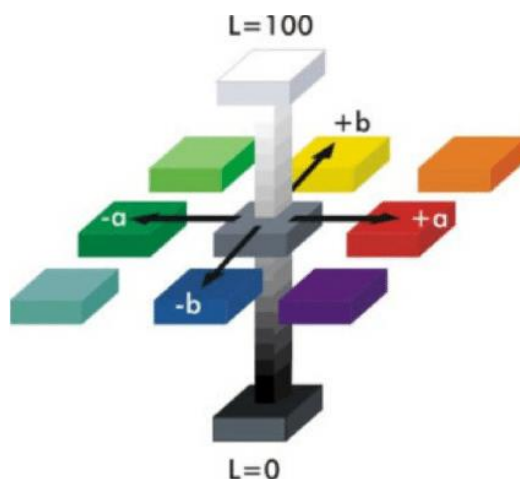
Ο χρωματικός χώρος Hunter L, a, b είναι ένας τρισδιάστατος ορθογώνιος χρωματικός χώρος ο οποίος βασίζεται στη θεωρία των αντιπάλων χρωμάτων (opponent-colors theory). Ο κεντρικός κατακόρυφος άξονας L υποδηλώνει τη φωτεινότητα και λαμβάνει τιμές από 0 (μαύρο χρώμα) μέχρι 100 (άσπρο χρώμα). Οι άξονες χρωμάτων (a-a' και b-b') στηρίζονται στο γεγονός ότι δε γίνεται ταυτοχρόνως ένα δείγμα να έχει κόκκινο και πράσινο χρώμα ή αντίστοιχα μπλε και κίτρινο καθώς αυτά τα ζεύγη χρωμάτων είναι αντίθετα. Συγκεκριμένα στον άξονα a-a' οι θετικές τιμές υποδηλώνουν την ύπαρξη κόκκινου χρώματος ενώ οι αρνητικές την ύπαρξη του πράσινου χρώματος. Κατά αναλογία στον άξονα β-β' οι θετικές τιμές υποδηλώνουν το κίτρινο χρώμα ενώ οι

αρνητικές το μπλε (Εικόνα 57). Οι τιμές ΔL , Δa και Δb που συνδέονται με αυτήν την κλίμακα χρώματος προσδιορίζουν το κατά πόσο διαφέρει το χρώμα ενός δείγματος από ένα πρότυπο δείγμα.

Επίσης η συνολική μεταβολή χρώματος εκφράζεται μέσω της ποσότητας ΔE (Σχέση 3.2).

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (3.2)$$

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μετρήθηκαν οι παράμετροι L , a , b , ΔE για όλους τους χρόνους ($t = 0, t = 15, t = 30, t = 45$) και για όλες τις θερμοκρασίες αποθήκευσης (4, 25 και 45 °C). Επίσης να σημειωθεί ότι ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το χρώμα των δειγμάτων κρέμας κατά το χρόνο 0 και πως πριν την πραγματοποίηση μέτρησης (σε κάθε χρονική περίοδο) το όργανο έπρεπε να βαθμονομείται (μαύρο και άσπρο πλακίδιο της Εικόνας).



Εικόνα 57. Κλίμακα Hunter (L,a,b) [114].

3.2.7.4 Μέτρηση Δυναμικής Μηχανικής Ανάλυσης (DMA – Dynamic Mechanical Analysis)

Η δυναμική μηχανική ανάλυση αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη πρακτική για την ανάλυση δεδομένων που εξάγονται από την εφαρμογή τάσης ή παραμόρφωσης σε ένα ιξωδοελαστικό υλικό. Ο αλγόριθμος λειτουργίας του οργάνου ξεκινά από την ανάλυση της τάσης σ , η οποία προκύπτει από την εφαρμοζόμενη ημιτονοειδή μετατόπιση του δείγματος (ιξωδοελαστικό υλικό) για δεδομένη συχνότητα. Η τάση λαμβάνεται από τον αισθητήρα δύναμης και την επιφάνεια του δείγματος, η μετατόπιση ρυθμίζεται από τον ενεργοποιητή ελέγχου (*actuator controller*), η συχνότητα και το ημιτονοειδές κύμα παράγονται από μία γεννήτρια συναρτήσεων (*function generator*) η οποία συνδέεται με τον ενεργοποιητή ελέγχου, η γωνία φάσης δ υπολογίζεται από τη χρονική υστέρηση μεταξύ των ημιτονοειδών κυμάτων τάσης (σ) – παραμόρφωσης (ϵ) έτσι ώστε να υπολογιστεί εν τέλει η εφαπτομένη απώλειας $\tan(\delta)$, ο σύνθετος συντελεστής διάτμησης G^* , το μέτρο απώλειας G'' [Pa] και το μέτρο αποθήκευσης G' [Pa] [115].

Στη συνέχεια ακολουθούν οι μαθηματικές σχέσεις περιγραφής των G' , G'' και G^* .

$$\varepsilon = \varepsilon_0 \sin(2\pi ft) \quad (3.3)$$

$$\sigma = \sigma_0 \sin(2\pi ft + \delta) \quad (3.4)$$

$$G' = \left(\frac{\sigma_0}{\varepsilon_0}\right) \cos \delta \quad (3.5)$$

$$G'' = \left(\frac{\sigma_0}{\varepsilon_0}\right) \sin \delta \quad (3.6)$$

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (3.7)$$

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2} = G' + iG'' \quad (3.8)$$

Ένα άλλο βασικό μέγεθος υπολογισμού είναι το σύνθετο ιξώδες η^* (Σχέση 3.8) όπου βασικές συνιστώσες του αποτελούν το δυναμικό ιξώδες και η δυναμική ακαμψία.

$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} = \frac{G''}{\omega} - i \frac{G'}{\omega} \quad (3.9)$$

Το μέτρο αποθήκευσης G' εκφράζει εκείνο το ποσό ενέργειας όπου αποθηκεύεται στο υλικό ανά κύκλο παραμόρφωσης και υποδηλώνει την ελαστική συμπεριφορά του ρευστού. Από την άλλη πλευρά το μέτρο απώλειας εκφράζει την ενέργεια που εκλύεται λόγω θερμότητας και είναι υποδηλώνει την ιξώδη συμπεριφορά του υλικού.

Τα καλλυντικοτεχνικά προϊόντα θα πρέπει να πληρούν ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά ποιότητας για να μπορούν να εμπορευματοποιηθούν. Οι αισθητηριακές ιδιότητες των καλλυντικών έχουν εξαιρετική σημασία για τον καταναλωτή και σχεδόν όλες συνδέονται άμεσα με τη ρεολογική συμπεριφορά των συστημάτων. Η όψη του τελικού προϊόντος, η δυνατότητα διασποράς, η αίσθηση που αφήνει στο δέρμα και η υφή είναι μόνο μερικά από τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει το τελικό σκεύασμα ώστε να καλύπτει τις απαιτήσεις του καταναλωτή [116].

Τα ρεολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία ελέγχουν τις περισσότερες από τις αισθητηριακές ιδιότητες, μπορούν να προσδιοριστούν με απλές ή διατμητικές μετρήσεις ταλάντωσης. Οι ρεολογικές δοκιμές ταλάντωσης χρησιμοποιούνται ευρέως για τον χαρακτηρισμό και ποσοτικοποίηση της ακαμψίας και της ακεραιότητας των πολυφασικών ιξωδοελαστικών πολυμερικών συστημάτων. Οι τυπικές παράμετροι προς μέτρηση είναι το μέτρο αποθήκευσης G' , το μέτρο απώλειας G'' , η γωνία φάσης δ και το σύνθετο ιξώδες η^* που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν περιστροφικές ρεολογικές μετρήσεις στο όργανο (*Physica MCR 301 Anton Paar DMA analyzer*) (Εικόνα) χρησιμοποιώντας τη γεωμετρία πλάκας- πλάκας (κενό 2 mm). Οι ταλαντωτικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν εντός της γραμμικής - ιξωδοελαστικής περιοχής, σε σταθερό εύρος πλάτους (γ) 0.1 % και σε γωνιακή συχνότητα εύρους 100 - 0.1 rad/s και σε θερμοκρασία 25 °C.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν πριν από την αποθήκευση (ημέρα 0, δείγματα ελέγχου), σε 30 ημέρες και σε 45 ημέρες μετά την αποθήκευση για όλες τις θερμοκρασίες αποθήκευσης (4,25 και 45 °C). Οι δοκιμές σάρωσης συχνότητας χρησιμοποιούνται ευρέως ως τυπική δοκιμή στη ρεολογία πολυμερών. Στην προκειμένη περίπτωση, εφαρμόστηκε ένα ημιτονοειδές στέλεχος με σταθερό πλάτος εύρους 0.1 %.

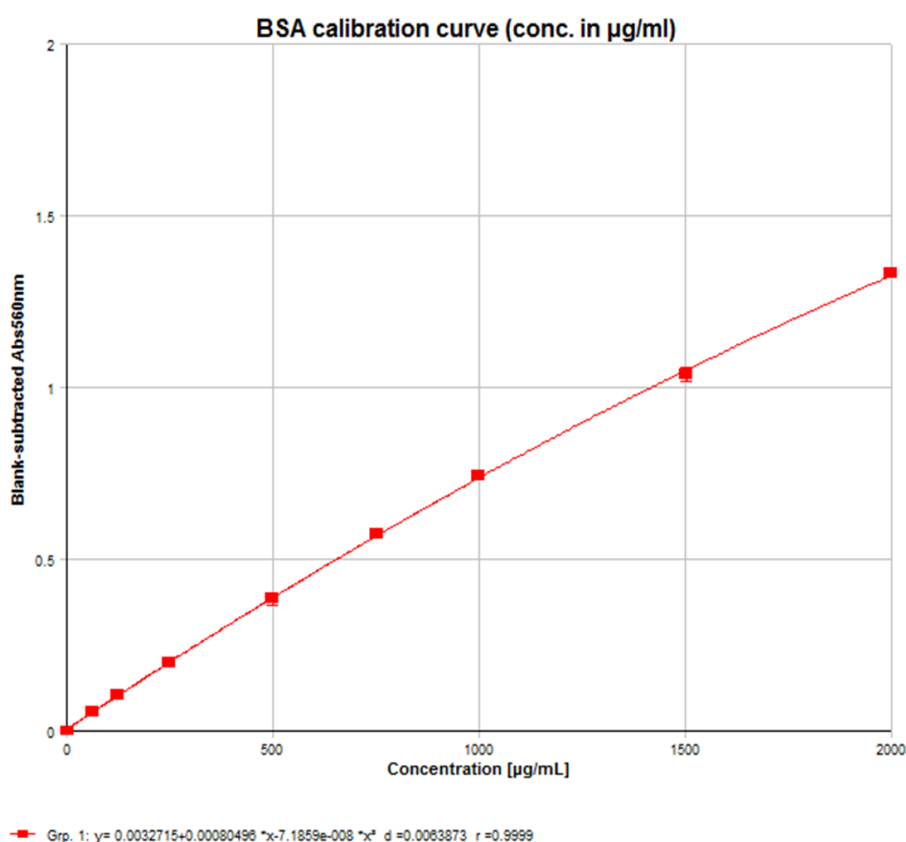


Εικόνα 58. Ροόμετρο (*Physica MCR 301 Anton Paar DMA analyzer*).

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

4.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης από τις ακάνθες του *Pterois miles*

Όπως αναφέρθηκε και στην υποενότητα 3.2.3 σε μια μικροπλάκα 96 θέσεων τοποθετήθηκαν δείγματα στην κανονική τους συγκέντρωση, δείγματα σε δύο αραιωμένες μορφές (1:4 και 1:10), πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) διαφορετικών συγκεντρώσεων και τυφλά δείγματα. Με βάση τις απορροφήσεις που παρουσίασαν τα πρότυπα διαλύματα, κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης (Διάγραμμα 1) που συσχετίζει τη συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων με τις αντίστοιχες απορροφήσεις τους.



Διάγραμμα 1. Καμπύλη βαθμονόμησης η οποία συσχετίζει τη συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων αλβουμίνης βόειου ορού (BSA) με τις αντίστοιχες απορροφήσεις τους.

Με βάση την εξίσωση της καμπύλης και γνωρίζοντας τις απορροφήσεις των διαλυμάτων A, B και C, καθώς και των αραιωμένων τους διαλυμάτων τους, υπολογίστηκαν και οι συγκεντρώσεις στα 3 δείγματα, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις των δειγμάτων A,B,C που προέκυψαν με βάση τις τιμές των απορροφήσεων των διαλυμάτων A,B,C.

	Αραίωση	Συγκέντρωση (μg/mL)	Συγκέντρωση (μg/mL) στο αρχικό δείγμα
Δείγμα A	χωρίς αραίωση	580	580
Δείγμα A	1:4	167	668
Δείγμα A	1:10	69	692
Δείγμα B	χωρίς αραίωση	3334	3334
Δείγμα B	1:4	862	3447
Δείγμα B	1:10	413	4132
Δείγμα C	χωρίς αραίωση	133	133
Δείγμα C	1:4	106	423
Δείγμα C	1:10	86	862

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 3 η μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης βρίσκεται στο δείγμα B, δηλαδή σε αυτό από τους ιστούς της βάσης των ακάνθων. Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς οι ιστοί και τα υπολείμματα επιδερμίδας του ψαριού είναι πολύ πλούσια σε πρωτεΐνες.

Επίσης, από τις συγκεντρώσεις που βρέθηκαν μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης για τα αραιωμένα δείγματα έγινε υπολογισμός της αρχικής συγκέντρωσης πριν την αραίωση. Αυτή εν συνεχεία συγκρίθηκε με τη συγκέντρωση που βρέθηκε στα μη αραιωμένα δείγματα για να εξεταστεί η πιθανότητα παρεμποδίσεων στην ανάλυση των πρωτεϊνών με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία.

Για το δείγμα A οι αρχικές συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν ήταν παραπλήσιες με τη συγκέντρωση του μη αραιωμένου δείγματος, με σχετική τυπική απόκλιση (RSD) 9 %. Το ίδιο συνέβη και για το δείγμα B, όπου οι μετρήσεις στο αρχικό διάλυμα και τις αραιώσεις του παρουσίασαν RSD 12 %. Αντίθετα, στο δείγμα C οι αρχικές συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν από τα αραιωμένα δείγματα δε συμφωνούν με τη συγκέντρωση του μη αραιωμένου δείγματος αλλά ούτε και μεταξύ τους. Το RSD βρέθηκε να είναι ίσο με 154%. Ο λόγος για τον οποίο τα αποτελέσματα δεν είναι τα αναμενόμενα είναι επειδή στο δείγμα C έχει γίνει επεξεργασία με μεγάλη ποσότητα θεικού αμμωνίου, το οποίο γενικά προκαλεί παρεμποδίσεις στον προσδιορισμό των πρωτεϊνών κατά την εφαρμογή της μεθόδου BCA.

Αξίζει να σημειωθεί πως η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης στο δείγμα C, το οποίο προέκυψε μέσω εκχύλισης υπερήχων-μικροκυμάτων, έχει προσδιοριστεί και με τη μέθοδο Bradford. Το συγκεκριμένο εκχύλισμα, το οποίο είχε υποστεί καθαρισμό με θεικό αμμώνιο 80% βρέθηκε να περιέχει 1240 μg/mL. Αυτή η τιμή είναι μια τάξη μεγέθους υψηλότερη συγκριτικά με τη συγκέντρωση που μετρήθηκε στο ίδιο εκχύλισμα από τα εργαστήρια του ΕΛΚΕΘΕ με τη μέθοδο BCA (133 μg/mL). Ωστόσο, επειδή και οι δύο μέθοδοι είναι επιρρεπείς στις παρεμποδίσεις, είναι δύσκολο να διαπιστωθεί ποια από τις δύο μετρήσεις είναι η πιο έγκυρη. Επιπλέον, δεν μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση το δείγμα C να έχει υποστεί μερική αλλοίωση και

καταστροφή μέρους των πρωτεϊνών κατά τη μεταφορά του από τα εργαστήρια του ΕΜΠ στα εργαστήρια του ΕΛΚΕΘΕ.

Τέλος δεδομένου ότι είναι γνωστά η συγκέντρωση κάθε δείγματος, ο όγκος και η μάζα των ιστών που εκχυλίστηκαν σε κάθε ένα από αυτά υπολογίζεται η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης ανά γραμμάριο ιστού.

$$\text{Συνολική Ποσότητα Πρωτεΐνης} = \frac{C \cdot V}{M} \quad (4.1)$$

C : μέσος όρος της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο αρχικό δείγμα

V : όγκος αρχικού δείγματος

M : μάζα ακάνθων

Ο όγκος του δείγματος Α ήταν 1.35 mL, του δείγματος Β 0.6 mL ενώ του δείγματος C 3 mL. Αντίστοιχα η μάζα των ακάνθων στην πρώτη περίπτωση ήταν 1.15 g, στη δεύτερη 0.36 g και στην τρίτη 10 g.

Συνεπώς ισχύει ότι:

$$\text{Συνολική Ποσότητα Πρωτεΐνης}_A = \frac{647 \cdot 1.35}{1.15} = 759.52 \cong 760 \frac{\mu\text{g πρωτεΐνης}}{\text{g ακάνθων}}$$

$$\text{Συνολική Ποσότητα Πρωτεΐνης}_B = \frac{3637 \cdot 0.6}{0.36} = 6061.67 \cong 6062 \frac{\mu\text{g πρωτεΐνης}}{\text{g ακάνθων}}$$

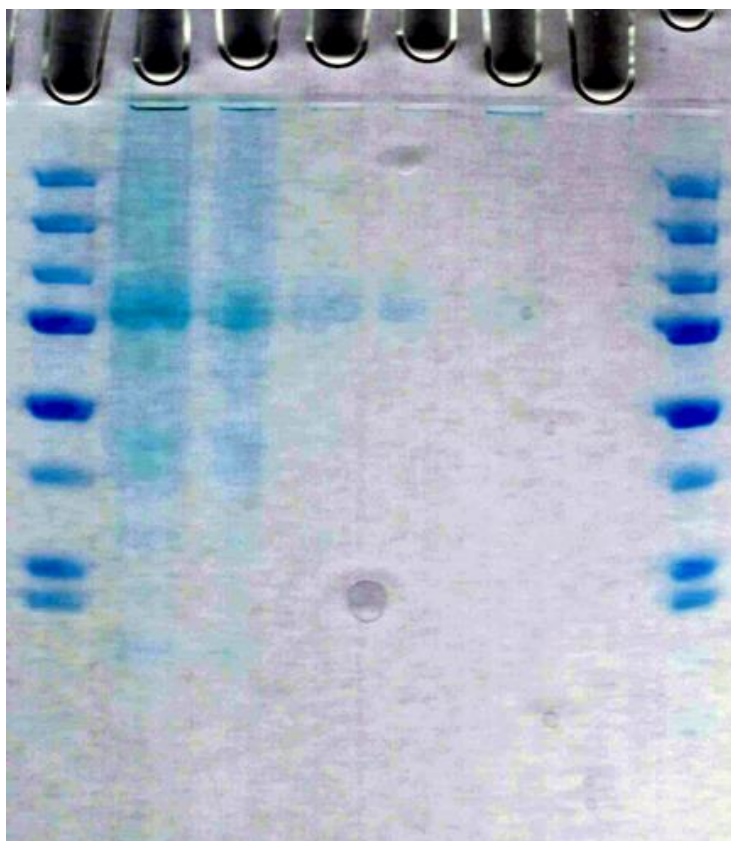
Σχετικά με το δείγμα C λαμβάνεται υπόψη μόνο η συγκέντρωση που προέκυψε από τη μέθοδο Bradford, η οποία θεωρήθηκε ότι είναι πιο κοντά στην πραγματική τιμή

$$\text{Συνολική Ποσότητα Πρωτεΐνης}_C = \frac{1240 \cdot 3}{10} = 372 \frac{\mu\text{g πρωτεΐνης}}{\text{g ακάνθων}}$$

Η ποσότητα πρωτεΐνης στο δείγμα C είναι μικρότερη σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα, τα οποία δεν υποβλήθηκαν σε κατεργασία με θειικό αμμώνιο. Το συγκεκριμένο γεγονός ενδεχομένως να οφείλεται στο ότι το δείγμα αυτό υπέστη τις περισσότερες διαδικασίες καθαρισμού που περιλάμβαναν την απομάκρυνση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών.

4.2 Διαχωρισμός πρωτεϊνών από τις ακάνθες του *Pterois miles*

Στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου τοποθετήθηκαν στα δύο άκρα τα πρότυπα διαλύματα BSA ενώ ενδιάμεσα οι δυο διαφορετικές ποσότητες από τα δείγματα A, B και C (6,5 και 13μL). Μετά από την ηλεκτροφόρηση και το χρωματισμό του gel με Coomassie Blue, προέκυψαν μπάντες που παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 59).

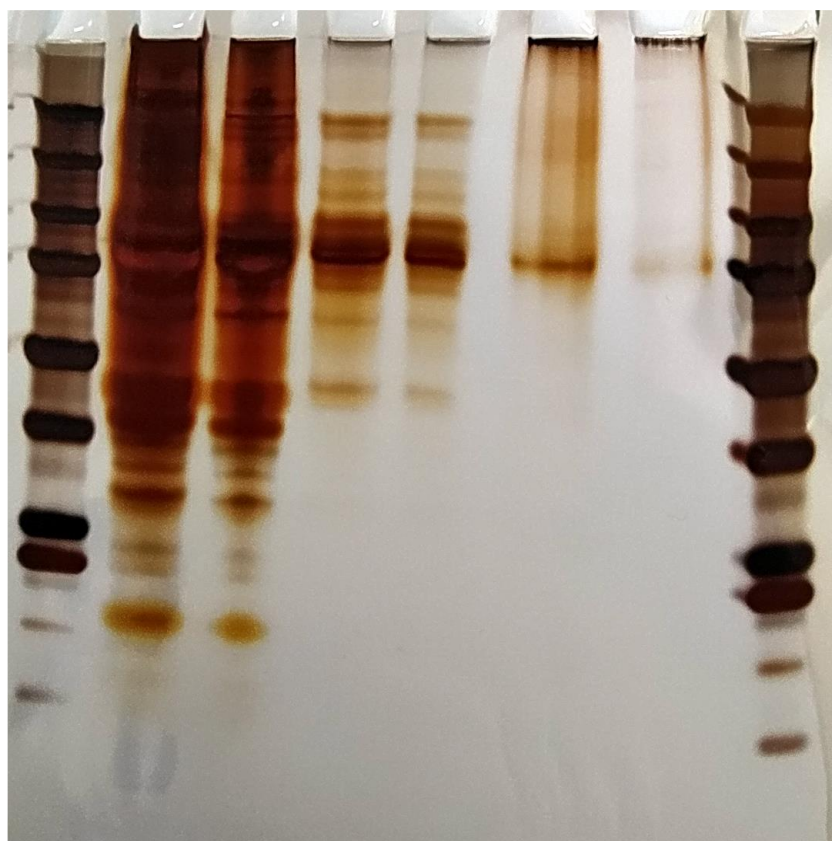


Εικόνα 59. Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου έπειτα από χρωματισμό με Coomassie Blue.

Συγκεκριμένα η συσχέτιση των γραμμών 1-8 με τα αντίστοιχα δείγματα είναι η εξής:

- ✓ Γραμμή 1&8: 10μL Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards,
- ✓ γραμμή 2: 13μL εκχυλίσματος ιστών από το κάτω μέρος των ακάνθων του λεοντόψαρου (Δείγμα B),
- ✓ γραμμή 3: 6.5μL εκχυλίσματος ιστών από το κάτω μέρος των ακάνθων του λεοντόψαρου (Δείγμα B),
- ✓ γραμμή 4: 13μL ακατέργαστου εκχυλίσματος από τις ακάνθες του λεοντόψαρου (Δείγμα A),
- ✓ γραμμή 5: 6.5μL ακατέργαστου εκχυλίσματος από τις ακάνθες του λεοντόψαρου (Δείγμα A),
- ✓ γραμμή 6: 13μL καθαρισμένου με $(NH_4)_2SO_4$ εκχυλίσματος από τις ακάνθες του λεοντόψαρου (Δείγμα C),
- ✓ γραμμή 7: 6.5μL καθαρισμένου με $(NH_4)_2SO_4$ εκχυλίσματος από τις ακάνθες του λεοντόψαρου (Δείγμα C).

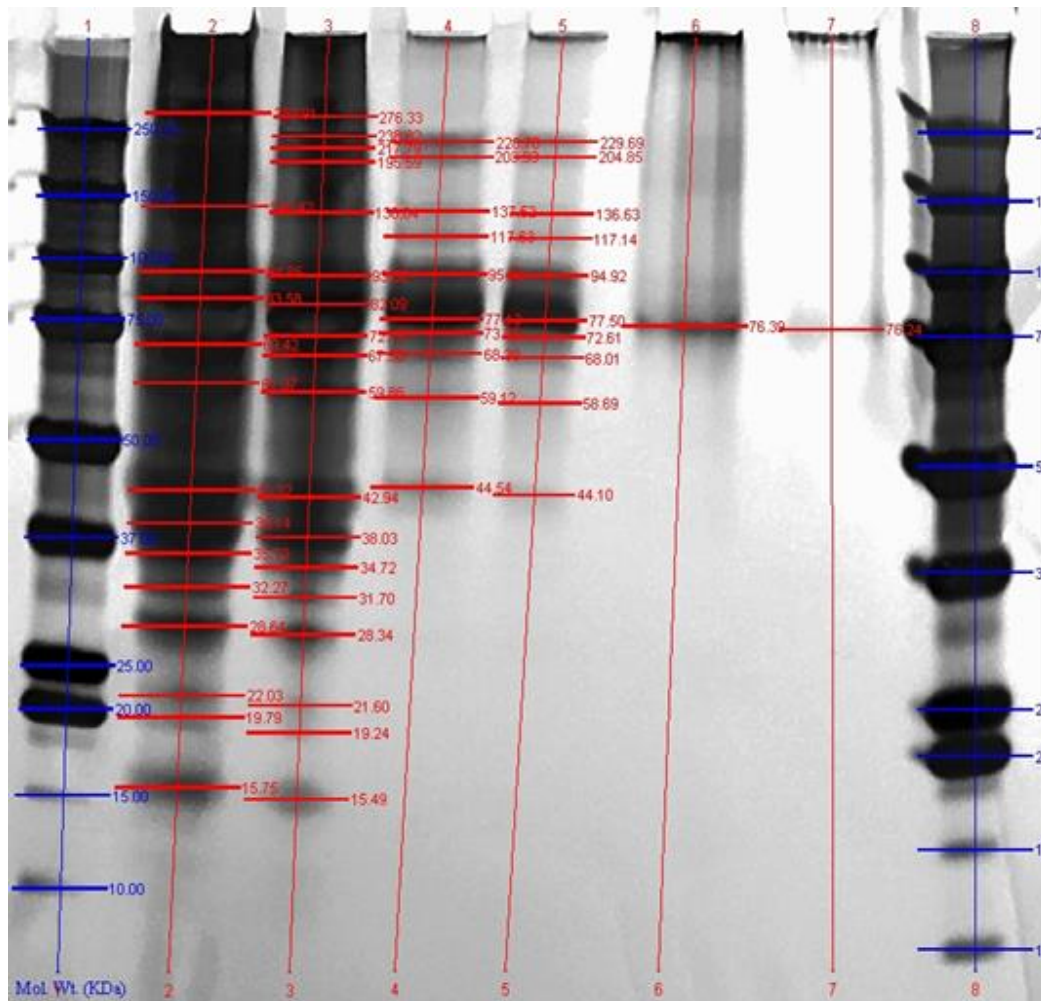
Όπως είναι εμφανές, οι μπάντες των πρωτεϊνών που διακρίνονται είναι πολύ λίγες και είναι δύσκολο να αναγνωριστούν, ιδιαίτερα στα δείγματα A και C. Για το λόγο αυτό ακολούθησε χρωματισμός του gel με ιόντα αργύρου (silver staining). Με αυτή την τεχνική ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε πιο εμφανής (Εικόνα 60).



Εικόνα 60. Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου έπειτα από χρωματισμό με ιόντα αργύρου.

Η συσχέτιση των γραμμών 1-8 με τα αντίστοιχα δείγματα είναι ίδια με πριν. Έπειτα από επεξεργασία της εν λόγω εικόνας με κατάλληλο λογισμικό (*Quantity One, v4.6.3 Biorad*), προσδιορίστηκαν τα μοριακά βάρη για τις μπάντες των πρωτεϊνών που εντοπίστηκαν (Εικόνα 61).

Ο καθαρισμός με $(NH_4)_2SO_4$ ήταν επιτυχημένος, μιας και παρατηρείται μία μόνο μπάντα γύρω στα 76 kDa για το δείγμα C (γραμμές 6,7). Επίσης οι γραμμές 2 και 3 που αντιστοιχούν στα εκχυλίσματα των ιστών από τη βάση των αγκαθιών (Δείγμα B) εμφανίζουν πολλαπλές μπάντες με πολλά διαφορετικά μοριακά βάρη, γεγονός που υποδηλώνει το πλήθος των πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών που υπάρχουν σε αυτό το δείγμα. Τέλος, στις γραμμές 3 και 4 που αντιστοιχούν στα εκχυλίσματα από τις ακάνθες του λεοντόψαρου (Δείγμα A) εμφανίζονται περίπου 9 διαφορετικές μπάντες, με πολύ πιο έντονη αυτή στα 77.5 kDa.



Εικόνα 61. Επεξεργασία του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης με το λογισμικό (*Quantity One*, v4.6.3 *Biorad*) με σκοπό τον προσδιορισμό των μοριακών βαρών για τις προσδιοριζόμενες μπάντες πρωτεΐνης.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και όπως έχει αναφερθεί και στην υποενότητα 2.2.2, το δηλητήριο του λεοντόψαρου είναι ένα ετεροδιμερές με συνολικό μοριακό βάρος 150 kDa με καθεμιά από τις υπομονάδες του να έχει μοριακό βάρος περίπου 75 kDa. Επομένως, η χαρακτηριστική μπάντα που εμφανίζουν και τα δύο εκχυλίσματα από τα αγκάθια *P. miles* (γραμμές 4,5) μεταξύ 77.5 και 76.4 kDa είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στο γεγονός αυτό.

Όσον αφορά τα εκχυλίσματα από τους ιστούς στη βάση των ακάνθων (γραμμές 2,3), υπάρχουν πολλαπλές μπάντες πρωτεϊνών στην περιοχή των 75 kDa και είναι δύσκολο να εξακριβωθεί αν τα συγκεκριμένα δείγματα περιέχουν όντως το δηλητήριο ή αν πρόκειται για κάποιο άλλο είδος πρωτεϊνών με παρόμοιο μοριακό βάρος. Σε κάθε περίπτωση ακόμα και αν το δηλητήριο είναι παρών στους ιστούς από την βάση των ακάνθων, αυτό είναι πολύ χαμηλής καθαρότητας και περιλαμβάνει μεγάλη ποσότητα άλλων πρωτεϊνών.

4.3 Προσδιορισμός τετραδοτοξίνης από το μυϊκό ιστό και τα εσωτερικά όργανα του *Lagocephalus sceleratus*

Η συγκέντρωση της τετραδοτοξίνης από το λαγοκέφαλο (μυϊκός ιστός και όργανα) προσδιορίστηκε με τη χρήση υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1 % v/v και μεθανολικού διαλύματος οξικού οξέος 1 % v/v. Στον Πίνακα 4 φαίνονται οι δύο ηλικίες λαγοκέφαλου που μελετήθηκαν μαζί με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά τους.

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά των δύο δειγμάτων από λαγοκέφαλο που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες του πειράματος.

Ημερομηνία Αλίευσης	Άτομο	Είδος	Συνολικό Μήκος (cm)	Πρότυπο Μήκος (cm)	Μάζα δείγματος (g)	Φύλο
28/03/21	1	Lago	23	21	168.8	M
28/03/21	2	Lago	44	41	1191	F

Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν οκτώ (8) και περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

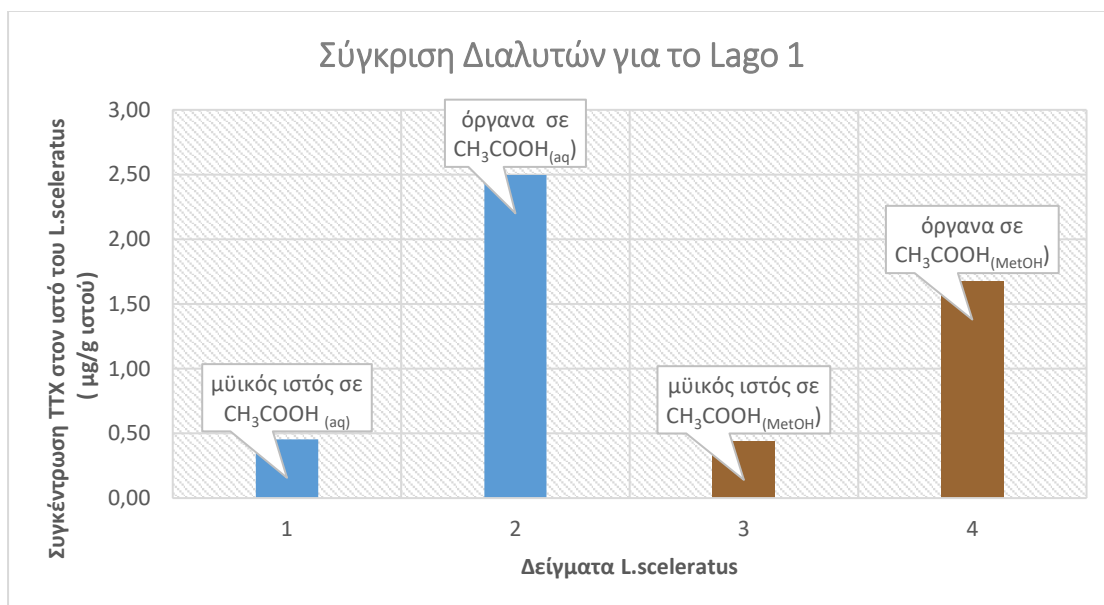
- ✓ **Δείγμα 1** (Lago 1- Υδατικό διάλυμα CH₃COOH 0.1% v/v- Μυϊκός ιστός),
- ✓ **Δείγμα 2** (Lago 1- Υδατικό διάλυμα CH₃COOH 0.1% v/v- Όργανα),
- ✓ **Δείγμα 3** (Lago 1- Μεθανολικό διάλυμα CH₃COOH 1% v/v- Μυϊκός ιστός),
- ✓ **Δείγμα 4** (Lago 1- Μεθανολικό διάλυμα CH₃COOH 1% v/v- Όργανα),
- ✓ **Δείγμα 5** (Lago 2- Υδατικό διάλυμα CH₃COOH 0.1% v/v- Μυϊκός ιστός),
- ✓ **Δείγμα 6** (Lago 2- Υδατικό διάλυμα CH₃COOH 0.1% v/v- Όργανα),
- ✓ **Δείγμα 7** (Lago 2- Μεθανολικό διάλυμα CH₃COOH 1% v/v- Μυϊκός ιστός),
- ✓ **Δείγμα 8** (Lago 2- Μεθανολικό διάλυμα CH₃COOH 1% v/v- Όργανα).

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με την τετραδοτοξίνη (TTX) που προέκυψαν έπειτα από την ανάλυση των δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία με δίδυμη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS).

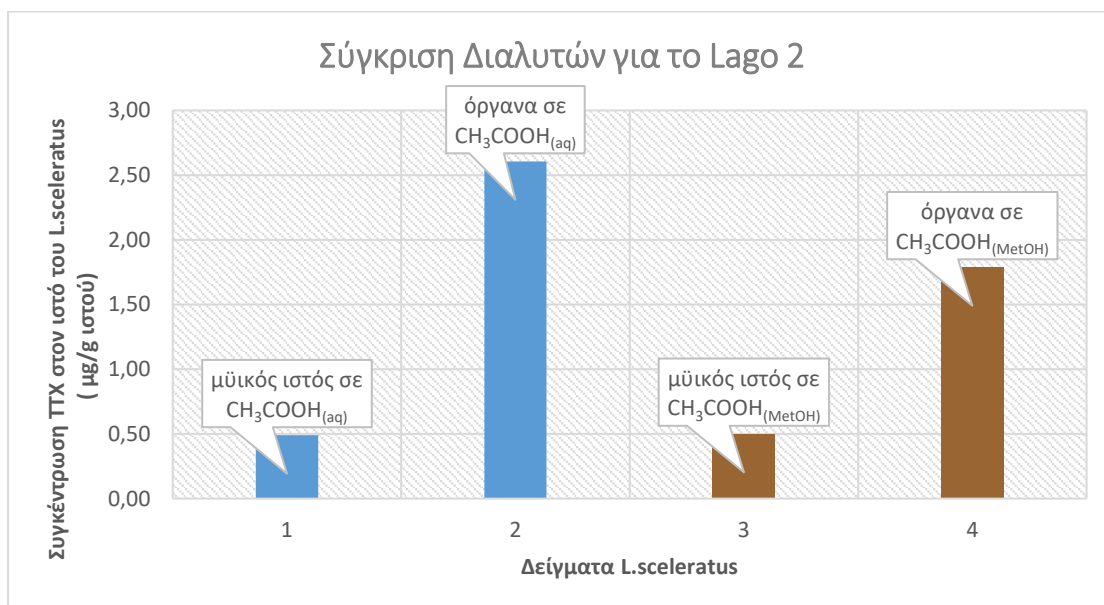
Πίνακας 5. Συγκέντρωση TTX των δειγμάτων (1-8) του *L.sceleratus*.

Δείγμα	Τετραδοτοξίνη (TTX)		
	Ποσότητα TTX στον ιστό του <i>L.sceleratus</i> [μg]	Συγκέντρωση TTX στο εκχύλισμα [$\frac{\mu\text{g TTX}}{\text{mL δ/τος}}$]	Συγκέντρωση TTX στον ιστό του <i>L.sceleratus</i> [$\frac{\mu\text{g TTX}}{\text{g ιστού}}$]
1	13.6	0.136	0.45
2	74.9	0.749	2.50
3	13.1	0.131	0.44
4	50.3	0.503	1.68
5	14.7	0.147	0.49
6	78.2	0.782	2.61
7	15.0	0.150	0.50
8	53.6	0.536	1.79

Είναι προφανές ότι καταλληλότερος διαλύτης για την εν λόγω εκχύλιση και για τις δύο ηλικίες λαγοκέφαλου (Lago 1, Lago 2) ήταν το υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.1% v/v (Διάγραμμα 2, Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 2. Σύγκριση διαλυτών για τη μικρότερη ηλικία δείγματος λαγοκέφαλου.



Διάγραμμα 3. Σύγκριση διαλυτών για τη μεγαλύτερη ηλικία δείγματος λαγοκέφαλου.

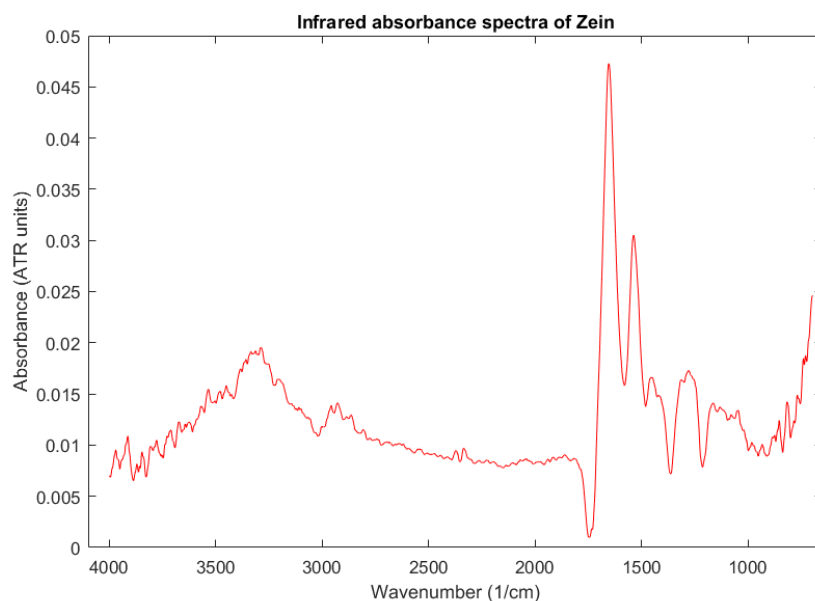
Αναφορικά με τα αποτελέσματα του Πίνακα 5 αξίζει να αναφερθούν οι ακόλουθες παρατηρήσεις οι οποίες μάλιστα είναι και σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών που έχουν ασχοληθεί με το συγκεκριμένο ζήτημα [117] :

- Μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε τετραδοτοξίνη (και για τις δύο ηλικίες) περιέχεται στα όργανα του ψαριού (νεφρά, χολή, έντερο, ωοθήκες) συγκριτικά με το μυϊκό ιστό,
- ο θηλυκός λαγοκέφαλος (και για τις δύο ηλικίες) περιέχει τόσο στη σάρκα όσο και στα όργανά του μεγαλύτερη ποσότητα ΤΤΧ συγκριτικά με τον αρσενικό,
- ο μικρότερος σε ηλικία λαγοκέφαλος περιέχει λιγότερη ποσότητα ΤΤΧ αν και στην προκειμένη περίπτωση εμπλέκεται μέσα και το ζήτημα του φύλου καθώς ο μικρότερος σε ηλικία είναι γένους αρσενικού όπου έτσι και αλλιώς αναμένεται να έχει μικρότερη συγκέντρωση ΤΤΧ συγκριτικά με το θηλυκό.

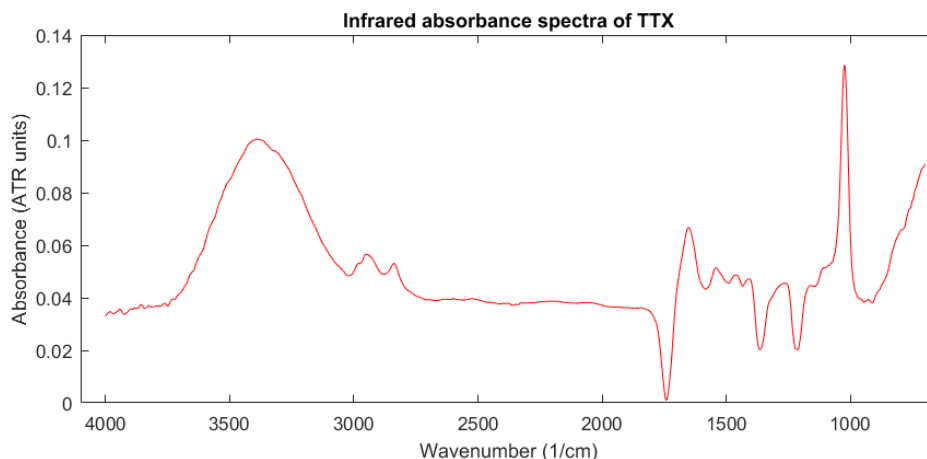
4.4 Χαρακτηρισμός τελικών προϊόντων ενθυλάκωσης

4.4.1 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ΤΤΧ (υλικό προς εγκλεισμό) και ζείνης (υλικό μήτρας) των τελικών σωματιδίων μέσω ATR-FTIR.

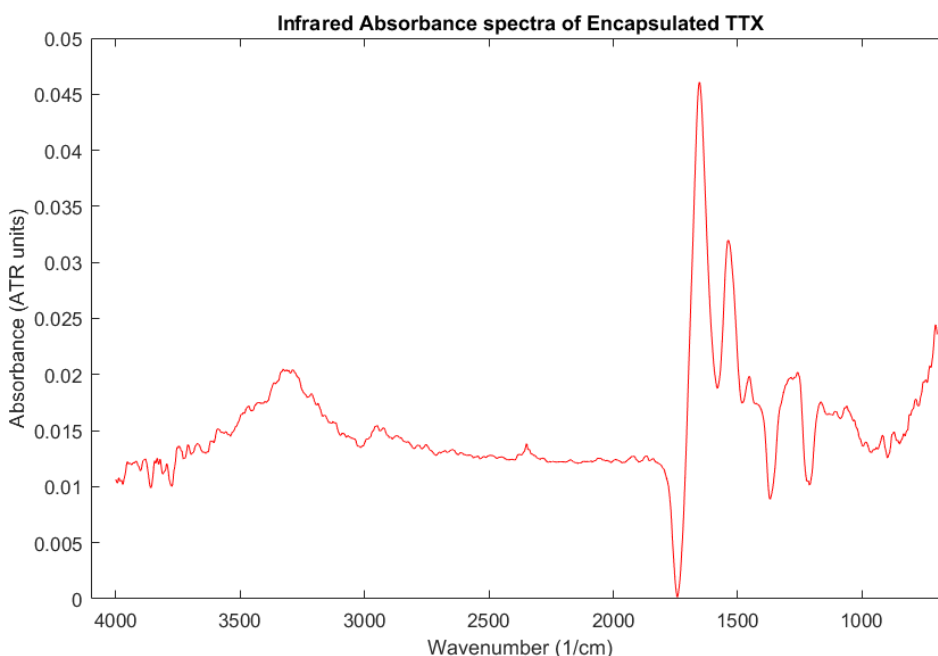
Η φασματοσκοπία *ATR-FTIR* χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό λειτουργικών ομάδων κάθε υλικού και την εξέταση των αλληλεπιδράσεών τους στα τελικά σωματίδια που προέκυψαν μέσω της διεργασίας του *electrospraying*. Τα φάσματα *ATR-FTIR* των διαφορετικών δειγμάτων (ζείνης, τετραδοτοξίνης, εγκλεισμένης τετραδοτοξίνης σε μήτρα ζείνης) παρουσιάζονται στη συνέχεια (Διάγραμμα 4, Διάγραμμα 5, Διάγραμμα 6). Για τη ζείνη οι δύο χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης στα $1652\text{-}1705$ και 1531 cm^{-1} υποδεικνύουν την παρουσία Αμιδίου I και II, αντίστοιχα. Η ζώνη του αμιδίου I είναι η πιο έντονη και σημαντική για τον χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης. Συνδέεται κυρίως με τις δονήσεις τάσεως ή εκτατικές (*stretching vibrations*) του καρβονυλίου (C=O) και σχετίζεται άμεσα με τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης (α-έλικα, β-πτυχωτό φύλλο) [118]. Μάλιστα το γεγονός ότι η φασματική κορυφή στα $1652\text{-}1705\text{ cm}^{-1}$ είναι συμμετρική, υποδηλώνει το υψηλότερο ποσοστό σε α-έλικες [119].



Διάγραμμα 4. Φάσμα ATR-FTIR ζείνης (δείγμα σε μορφή σωματιδίων).



Διάγραμμα 5. Φάσμα ATR-FTIR τετραδοτοξίνης (δείγμα σε υγρή μορφή).



Διάγραμμα 6. Φάσμα ATR-FTIR εγκλεισμένης τετραδοτοξίνης σε μήτρα ζεΐνης (δείγμα σε μορφή σωματιδίων).

Η ζώνη του αμιδίου II σχετίζεται κυρίως με την κάμψη μεταξύ του δεσμού N-H και τις δονήσεις τάσεως C-N και όχι τόσο με τη διαμόρφωση της ραχοκοκαλιάς της πρωτεΐνης.

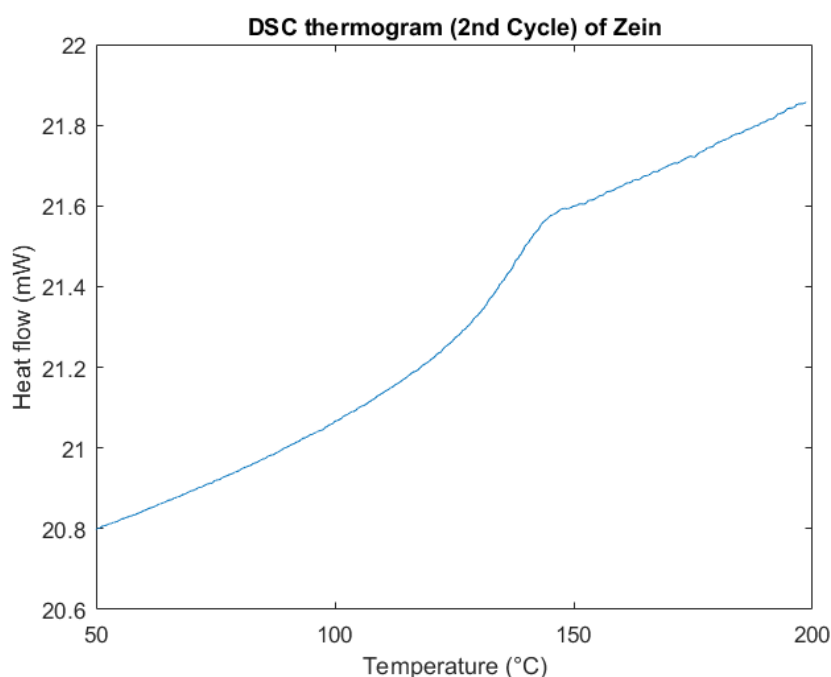
Οι λειτουργικές ομάδες της τετραδοτοξίνης (Διάγραμμα 5) παρατηρήθηκαν για 3400 cm^{-1} (NH₂), 3319 cm^{-1} (NH), 2951 cm^{-1} (CH), 1655 cm^{-1} (C=N) και 1105 cm^{-1} (C-O-C). Οι πιο πολλές χαρακτηριστικές κορυφές της TTX παρατηρούνται και στο φάσμα της ενθυλακωμένης TTX (Διάγραμμα 6). Επίσης από τη στιγμή όπου δεν εντοπίστηκαν όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές και καμία κυρίαρχη μετατόπιση των υφιστάμενων κορυφών ή δημιουργία νέων κορυφών, οι μοναδικές αλληλεπιδράσεις που έλαβαν χώρα είναι φυσικής προέλευσης.

4.4.2 Θερμική συμπεριφορά των σωματιδίων με χρήση DSC

Η ζεΐνη είναι ένα εντελώς άμορφο πολυμερές με αποτέλεσμα η κύρια μετάβαση που πρέπει να ανιχνευθεί είναι η υαλώδης μετάπτωση, η οποία αντιπροσωπεύει τη σταδιακή μετάβαση του υλικού από μια υαλώδη κατάσταση σε μια παχύρρευστη ή ελαστική κατάσταση μέσω αύξησης της θερμοκρασίας.

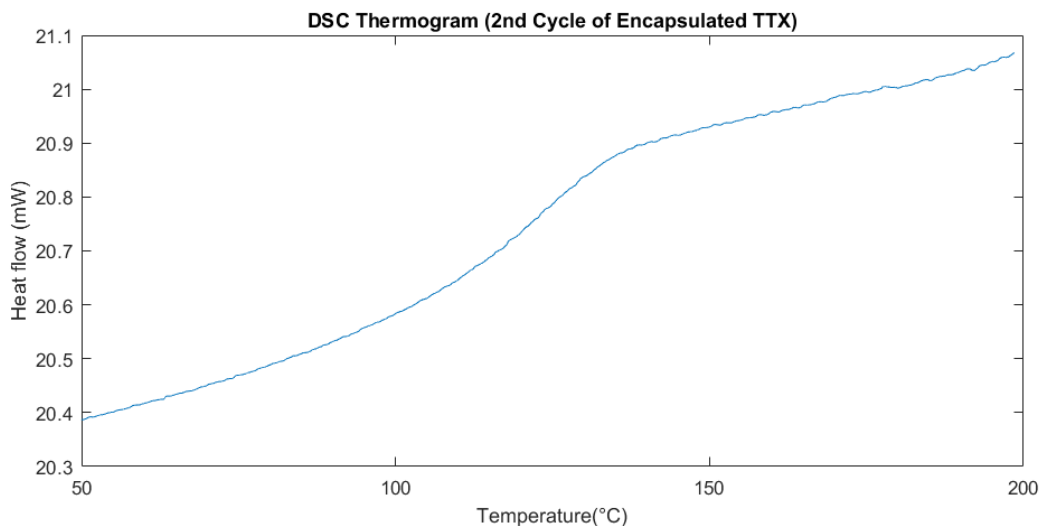
Στην προκειμένη περίπτωση η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης προήλθε από τον δεύτερο κύκλο θέρμανσης έτσι ώστε να εξαλειφθεί οποιαδήποτε «θερμική ιστορία» που ενδεχομένως να είχε περάσει το πολυμερές κατά την προηγούμενη επεξεργασία αλλά και να για αφαιρεθούν τυχόν υπολειμματικοί διαλύτες [120].

Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης T_g της ζεΐνης σύμφωνα με την μέτρηση στο DSC (Διάγραμμα 7) βρέθηκε ίση με 144 °C, τιμή η οποία είναι πολύ κοντά με την αντίστοιχη τιμή της T_g στη βιβλιογραφία (142 °C) [121].



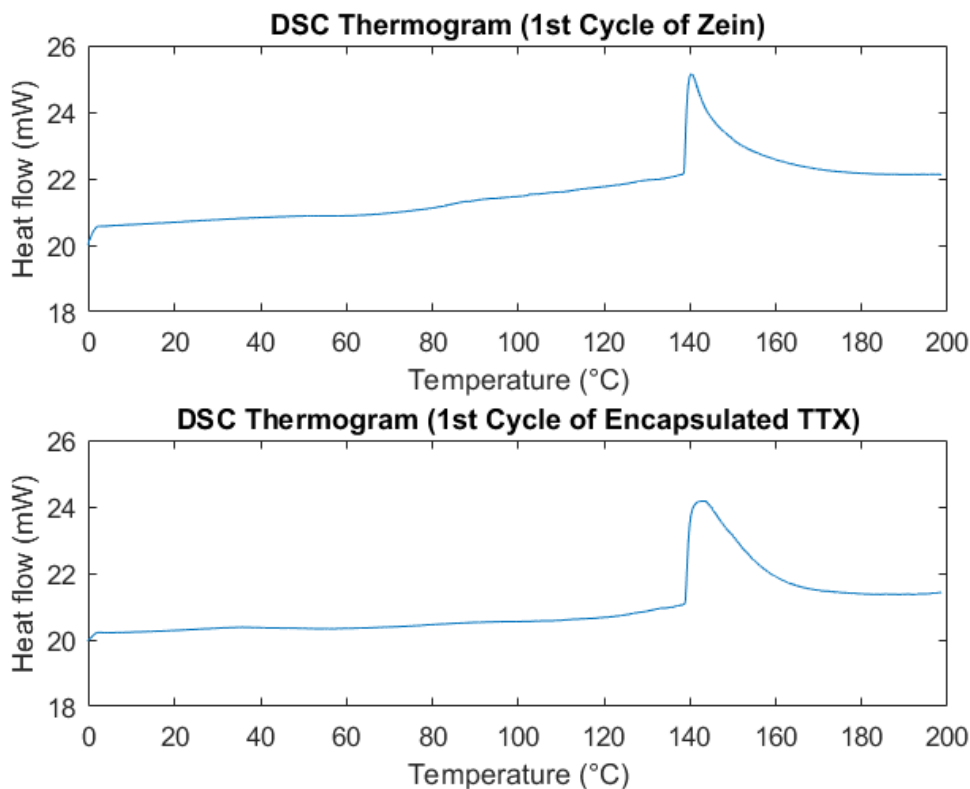
Διάγραμμα 7. Θερμογράφημα DSC (2^{ος} κύκλος θέρμανσης) ζεΐνης.

Από την άλλη πλευρά στο ενθυλακωμένο προϊόν παρατηρήθηκε μείωση της τιμής T_g (138 °C) γεγονός το οποίο οφείλεται στην ενσωμάτωση συστατικού χαμηλού μοριακού βάρους (TTX) εντός του πολυμερικού υλικού (Διάγραμμα 8). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι οι υψηλές τιμές T_g εγγυώνται τη σταθερότητα του προϊόντος κατά την αποθήκευση ή σε περίπτωση περαιτέρω επεξεργασίας.



Διάγραμμα 8. Θερμογράφημα DSC (2^{ος} κύκλος θέρμανσης) ενθυλακωμένης TTX με μήτρα ζεΐνης.

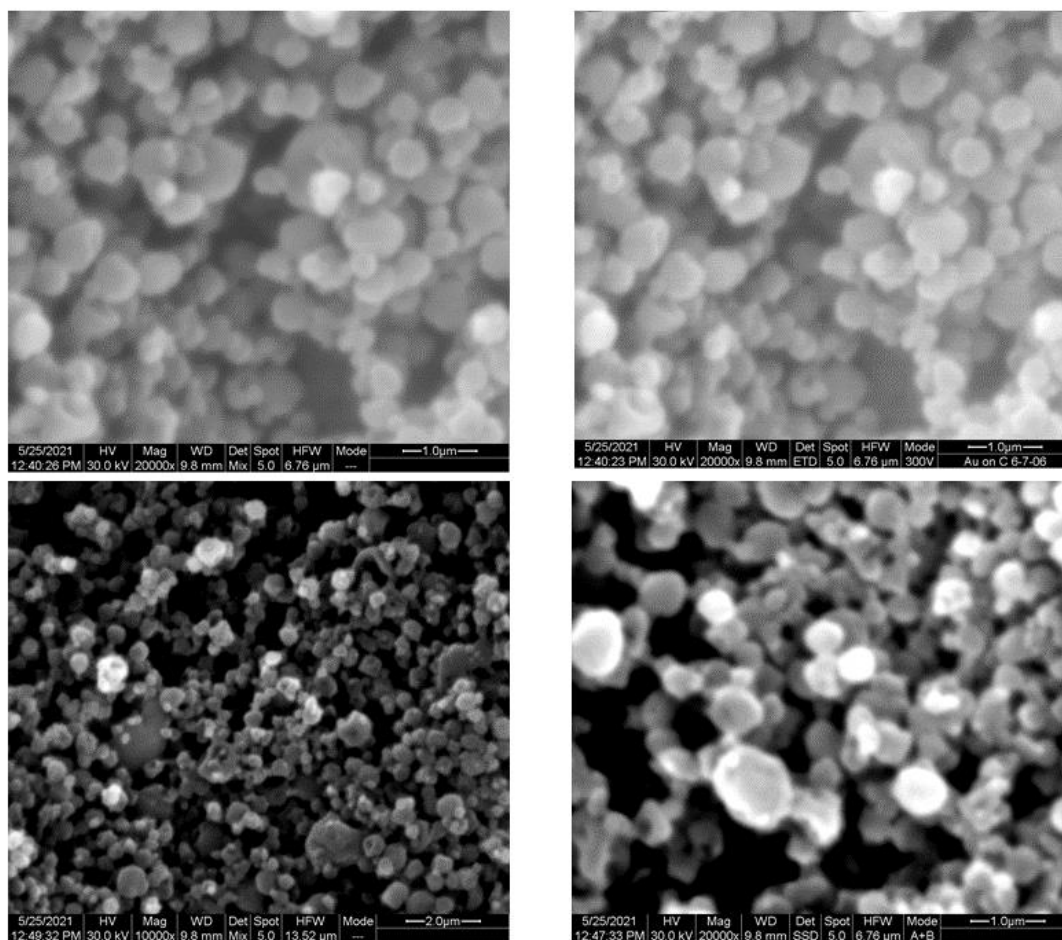
Όσον αφορά τον 1^ο κύκλο θέρμανσης (Διάγραμμα 9), παρατηρείται ότι το προϊόν ενθυλάκωσης εμφανίζει μία μόνο ισχυρή κορυφή η οποία υποδεικνύει το υλικό της μήτρας. Συνεπώς μπορεί να υποθεθεί ότι η διαδικασία της ενθυλάκωσης δεν επηρέασε τη δομή και τις ιδιότητες του πολυμερούς.



Διάγραμμα 9. Θερμογραφήματα DSC (1ος κύκλος θέρμανσης) ζεΐνης και ενθυλακωμένης TTX με μήτρα ζεΐνης.

4.4.3 Εξέταση της μορφολογίας των προϊόντων ηλεκτροστατικού ψεκασμού με χρήση SEM

Όπως αναφέρθηκε και στην υποενότητα 3.2.6 η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ενθυλάκωση ήταν ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός (electrospraying) και για τη συλλογή των νανοσωματιδίων δοκιμάστηκαν πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί των κύριων παραμέτρων της διεργασίας. Στη συνέχεια παρουσιάζεται η τελική μορφολογία των σωματιδίων κατόπιν επεξεργασίας αυτών από Μικροσκοπία Ηλεκτρονικής Σάρωσης (SEM) (Εικόνα 62).



Εικόνα 62. Απεικόνιση των σωματιδίων που προέκυψαν μέσω της διεργασίας του electrospraying (συνθήκες λειτουργίας: ΑΣΑ 15 cm, ογκομετρική παροχή 300 $\mu\text{L/h}$, τάση 26 kV) με χρήση Μικροσκοπίας Ηλεκτρονικής Σάρωσης.

Κατόπιν επεξεργασίας των εικόνων με το λογισμικό *ImageJ Software* υπολογίστηκε ότι η μέση διάμετρος των σωματιδίων είναι 540 ± 53 nm. Το μέγεθος και το σχήμα του προϊόντος ενθυλάκωσης είναι οι δύο κυριότεροι παράγοντες για την αλληλεπίδρασή αυτού με τους διαφορετικούς φραγμούς του δέρματος. Αναφορικά με το σχήμα θεωρείται ότι τα σφαιρικά νανοσωματίδια έχουν καλύτερη ικανότητα διείσδυσης στο δέρμα συγκριτικά με άλλες μορφές (π.χ. ελλειψοειδή) λόγω της συμμετρίας τους σε όλες τις διαστάσεις και της μικρότερης επιφάνειάς τους [122].

Όσον αφορά το μέγεθός τους η απορρόφησή τους από το δέρμα μπορεί να γίνει είτε μέσω των προσαρτημάτων του δέρματος (*skin appendages*) είτε μέσω της κεράτινης στιβάδας [123].

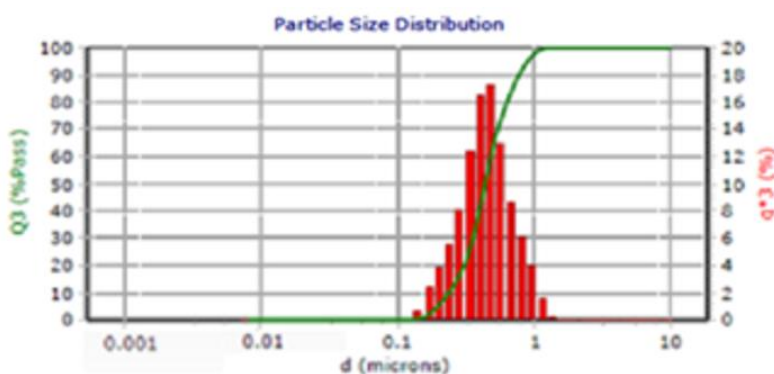
Σωματίδια των 500-1000 nm μπορούν να διαπεράσουν τα επιφανειακά στρώματα του δέρματος, ενώ τα μικρότερα μπορούν να προχωρήσουν ακόμα βαθύτερα απελευθερώνοντας την επιθυμητή ένωση. Από την άλλη πλευρά, η δερματική έκθεση σε νανοσωματίδια πολύ μικρού μεγέθους (<100 nm) και ειδικά σε αυτά με μέγεθος μικρότερο των 30 nm μπορεί να είναι εξαιρετικά επικίνδυνη καθώς μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένο ερύθημα (ερυθρότητα του δέρματος), οίδημα και νέκρωση ακόμα και τμήματος του δέρματος (*eschar*) [124].

Συνεπώς τα σωματίδια από άποψη μεγέθους είναι κατάλληλα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καλλυντικά σκευάσματα.

4.4.4 Κατανομή μεγέθους σωματιδίων (Particle Size Distribution)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το μέγεθος είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την αξιολόγηση της ασφάλειας του ενθυλακωμένου προϊόντος. Η κατανομή μεγέθους δίνει μια γρήγορη και ακριβή μέτρηση του μεγέθους και της ομοιομορφίας των σωματιδίων η οποία είναι πολύ σημαντική στην προσπάθεια βελτίωσης της τεχνολογίας ενθυλάκωσης. Η εν λόγω παράμετρος επηρεάζεται άμεσα από την ογκομετρική παροχή, την εφαρμοζόμενη τάση, την απόσταση από το άκρο έως τον συλλέκτη, τη σταθερότητα του κώνου Taylor και τη συγκέντρωση των διαλυμάτων που λαμβάνουν μέρος στον ηλεκτροστατικό ψεκασμό [125]. Όσο πιο κανονική είναι η κατανομή, τόσο πιο αριστοποιημένη είναι η τεχνική εγκλεισμού.

Στην προκειμένη περίπτωση η κατανομή μεγέθους σωματιδίων υπέδειξε μια γενικά ομοιόμορφη κατανομή (πολύ κοντά στην κανονική) (Διάγραμμα 10) και μάλιστα επιβεβαιώνει τις παρατηρήσεις που έγιναν στο SEM καθώς παρατηρείται μεγάλη συνάφεια σχετικά με τη διάμετρο των σωματιδίων (Πίνακας 6).



Διάγραμμα 10. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων για τα σωματίδια με την εγκλεισμένη TTX σε μήτρα ζεϊνης (non-solvent: αιθανόλη).

Πίνακας 6. Μέση διάμετρος και κατανομή dx^* των σωματιδίων με την ενθυλακωμένη ουσία.

Δείγμα	Μέση Διάμετρος Σωματιδίων (μm)	d10 (μm)	d50 (μm)	d90 (μm)
ZN-TTX	0.473	0.298	0.617	0.889

4.4.5 Απόδοση Εγκλεισμού

Η απόδοση εγκλεισμού υπολογίστηκε σύμφωνα με τη Σχέση 3.1. Η αρχική ποσότητα τετραδοτοξίνης στο αρχικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες του ηλεκτροστατικού ψεκασμού ήταν $0.782 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ (προέρχεται από το Δείγμα 6), ενώ η συγκέντρωση τετραδοτοξίνης στο υπερκείμενο υγρό (υποενότητα 3.2.6.1.5) βρέθηκε ίση με $0.076 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$.

$$\begin{aligned} \text{Απόδοση Εγκλεισμού (AE)} &= \left[\frac{C_{b.c.total} - C_{b.c.non-encaps.}}{C_{b.c.total}} \right] \cdot 100 \\ &= \left[\frac{0.782 - 0.076}{0.782} \right] \cdot 100 = 90.28 \cong 90 \% \end{aligned}$$

Η τιμή αυτή της απόδοσης υποδεικνύει ότι ο εγκλεισμός της TTX στη πολυμερική μήτρα ζεϊνης στέφθηκε με επιτυχία. Η απόδοση κρίνεται αρκετά ικανοποιητική και μέσα στα όρια των αποδόσεων όπου μπορούν να επιτευχθούν μέσω της τεχνικής του electrospraying (78–92%) [126].

4.5 Χαρακτηρισμός καλλυντικών κρεμών

4.5.1 Μικροβιολογική ανάλυση

Όλα τα καλλυντικά προϊόντα που πωλούνται στην Ευρωπαϊκή Ένωση πρέπει να παράγονται σύμφωνα με την καλή παρασκευαστική πρακτική (GMP). Το GMP απαιτεί η παρτίδα των καλλυντικών προϊόντων να δοκιμάζεται αναφορικά με τις μικροβιολογικές, φυσικές και χημικές ιδιότητες, προκειμένου να διασφαλίζεται η ασφάλεια και η ποιότητα κάθε παρτίδας.

Οι μικροβιολογικές προδιαγραφές του τελικού καλλυντικού προϊόντος πρέπει να περιλαμβάνουν τον συνολικό αριθμό αερόβιων μεσοφιλικών μικροοργανισμών, ο οποίος καλύπτει βακτήρια και ζύμες/μούχλες.

Στα πλαίσια μελέτης της μικροβιολογικής ποιότητας και ασφάλειας των κρεμών της εν λόγω εργασίας μετρήθηκε με χρήση ειδικών τρυβλίων το ολικό μικροβιακό φορτίο, οι ζύμες/μούχλες και η ύπαρξη του κολοβακτηριδίου *E.coli*.

Η μικροβιολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τα δύο είδη κρέμας (κρέμα βάση και κρέμα με την εγκλεισμένη TTX) σε όλες τις θερμοκρασίες (4°C, 25°C, 45°C) και ανά 15 ημέρες (0,15,30,45).

Να σημειωθεί ότι στο χρόνο μηδέν κανένα από τα δείγματα δεν έχει προλάβει να αναπτύξει μικροβιακό φορτίο συνεπώς ο μικροβιολογικός έλεγχος έγινε για 15, 30 και 45 ημέρες αντίστοιχα. Με το γράμμα C συμβολίζεται η κρέμα βάσης ενώ με το γράμμα E η κρέμα με την εγκλεισμένη τοξίνη.

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης για όλες τις θερμοκρασίες αποθήκευσης και για διάστημα 15 ημερών μετά το χρόνο μηδέν. Ομοίως στον Πίνακα 8 και Πίνακα 9 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα για διάστημα 30 και 45 ημερών.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης για τα δύο είδη κρέμας στους 4°C, 25°C και 45°C για διάστημα 15 ημερών μετά το χρόνο μηδέν.

Θερμοκρασία T (°C)	Δείγμα κρέμας	Ολικό Μικροβιακό Φορτίο	Ζύμες/Μούχλες	E.coli
4°C	C	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
	E	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
25°C	C	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
	E	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
45°C	C	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
	E	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g

Πίνακας 8. Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης για τα δύο είδη κρέμας στους 4°C, 25°C και 45°C για διάστημα 30 ημερών μετά το χρόνο μηδέν.

Θερμοκρασία T (°C)	Δείγμα κρέμας	Ολικό Μικροβιακό Φορτίο	Ζύμες/Μούχλες	E.coli
4°C	C	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
	E	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
25°C	C	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
	E	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
45°C	C	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
	E	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g

Πίνακας 9. Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης για τα δύο είδη κρέμας στους 4°C, 25°C και 45°C για διάστημα 45 ημερών μετά το χρόνο μηδέν.

Θερμοκρασία T (°C)	Δείγμα κρέμας	Ολικό Μικροβιακό Φορτίο	Ζύμες/Μούχλες	E.coli
4°C	C	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
	E	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
25°C	C	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
	E	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
45°C	C	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
	E	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g

Για προϊόντα που προορίζονται για παιδιά κάτω των τριών ετών και για την περιοχή των ματιών ή των βλεννογόνων το όριο για το Ολικό Μικροβιακό Φορτίο είναι 100 cfu/g ή 2 log cfu/g, ενώ για τις Ζύμες/Μούχλες 10 cfu/g ή 1 log cfu/g. Για παθογόνα μικρόβια όπως το E.coli δεν είναι επιτρεπτή η παρουσία τους ούτε κατά ένα ελάχιστο ποσοστό.

Όπως φαίνεται από τους παραπάνω Πίνακες (Πίνακας 7, Πίνακας 8, Πίνακας 9) τόσο το ολικό μικροβιακό φορτίο όσο και οι ζύμες/μούχλες για όλες τις θερμοκρασίες και τους χρόνους αποθήκευσης ήταν κάτω από 100 cfu/g και 10 cfu/g αντίστοιχα. Επίσης δεν αναπτύχθηκε σε κανένα τρυβλίο το παθογόνο μικρόβιο *E.coli*.

Συνεπώς από μικροβιολογικής άποψης τα δείγματα κρέμας πληρούν όλα τα πρότυπα ασφαλείας και υγιεινής.

4.5.2 Μέτρηση pH

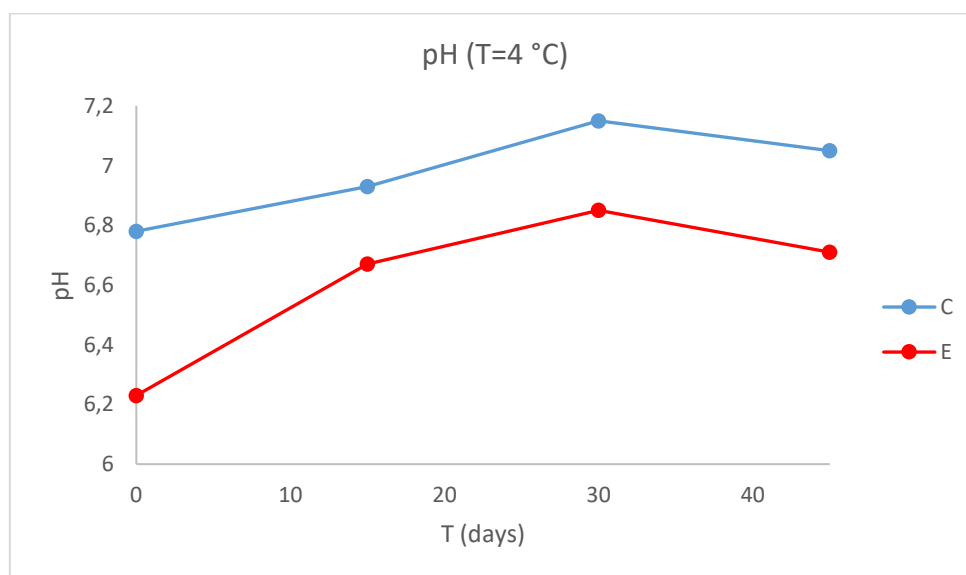
Το pH των καλλυντικών σκευασμάτων αποτελεί σημαντικό παράγοντα ποιότητας. Η τιμή pH του ανθρώπινου δέρματος κυμαίνεται από 5.4-5.9 (ουδέτερο pH δέρματος), αλλά παρουσιάζει μεταβολές αναλόγως της ηλικίας, του φύλου, της φυλής και του μεταβολικού ρυθμού (αναλόγως την ώρα της ημέρας και της εποχής). Τα καλλυντικά σκευάσματα πρέπει να έχουν ουδέτερο pH, σε σχέση πάντα με αυτό του δέρματος [127].

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται οι μετρήσεις οξύτητας που πραγματοποιήθηκαν για τα δύο είδη κρέμας για όλες τις θερμοκρασίες (4°C, 25°C, 45°C) και χρόνους αποθήκευσης (0,15,30,45 days).

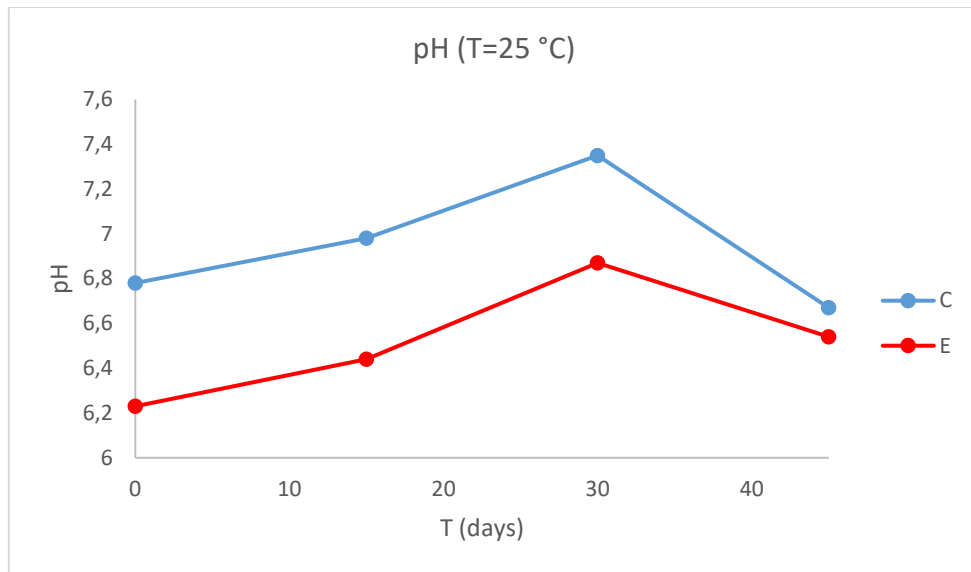
Πίνακας 10. Μετρήσεις pH που πραγματοποιήθηκαν για τα δύο είδη κρέμας για όλες τις θερμοκρασίες (4°C, 25°C, 45°C) και χρόνους αποθήκευσης (0,15,30,45 days)

Θερμοκρασία T (°C)	Δείγμα κρέμας	pH (t=0)	pH (t=15)	pH (t=30)	pH (t=45)
4°C	C	6.78	6.93	7.15	7.05
	E	6.23	6.67	6.85	6.71
25°C	C	6.78	6.98	7.35	6.67
	E	6.23	6.44	6.87	6.54
45°C	C	6.78	6.75	6.74	6.45
	E	6.23	6.35	6.48	6.14

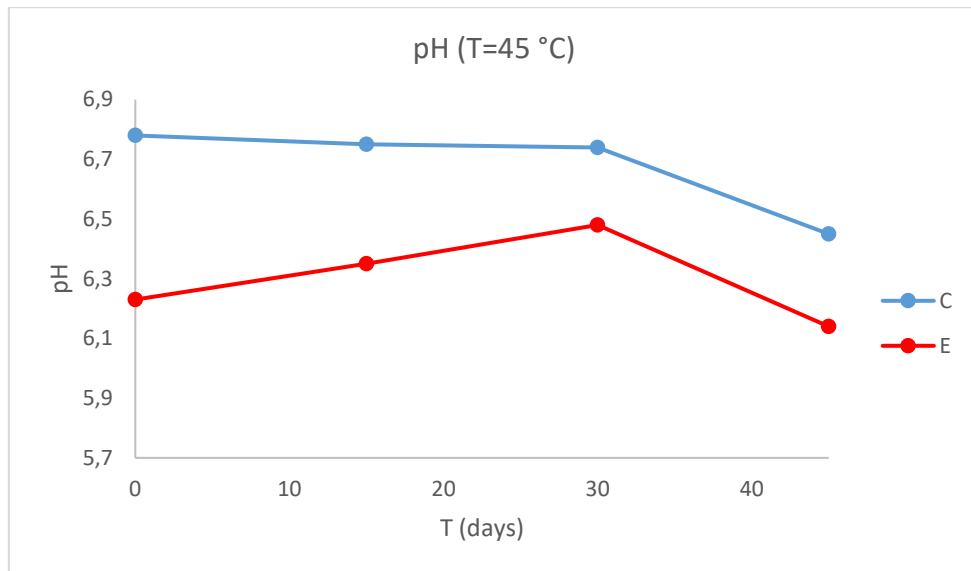
Με βάση τον Πίνακα 10 κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα οξύτητας συναρτήσει του χρόνου (Διάγραμμα 11, Διάγραμμα 12, Διάγραμμα 13).



Διάγραμμα 11. Διάγραμμα pH συναρτήσει του χρόνου για θερμοκρασία αποθήκευσης 4°C.



Διάγραμμα 12. Διάγραμμα pH συναρτήσει του χρόνου για θερμοκρασία αποθήκευσης 25°C.



Διάγραμμα 13. Διάγραμμα pH συναρτήσει του χρόνου για θερμοκρασία αποθήκευσης 45°C.

Αρχικά παρατηρείται ότι και για τα δύο δείγματα κρέμας τόσο στους 4°C όσο και στους 25°C αρχικά παρατηρείται μία σταδιακή αύξηση του pH μέχρι τις πρώτες 30 ημέρες ενώ στη συνέχεια αυτό μειώνεται. Αναφορικά με τους 45°C παρατηρείται μια μικρή μείωση του pH για το δείγμα κρέμας C, ενώ για το δείγμα E ακολουθείται το ίδιο μοτίβο με τις προηγούμενες θερμοκρασίες. Σε γενικές γραμμές οι τιμές οξύτητας όλων των δειγμάτων κυμαίνονται στο φυσιολογικό εύρος pH του ανθρώπινου δέρματος.

4.5.3 Μέτρηση Χρώματος

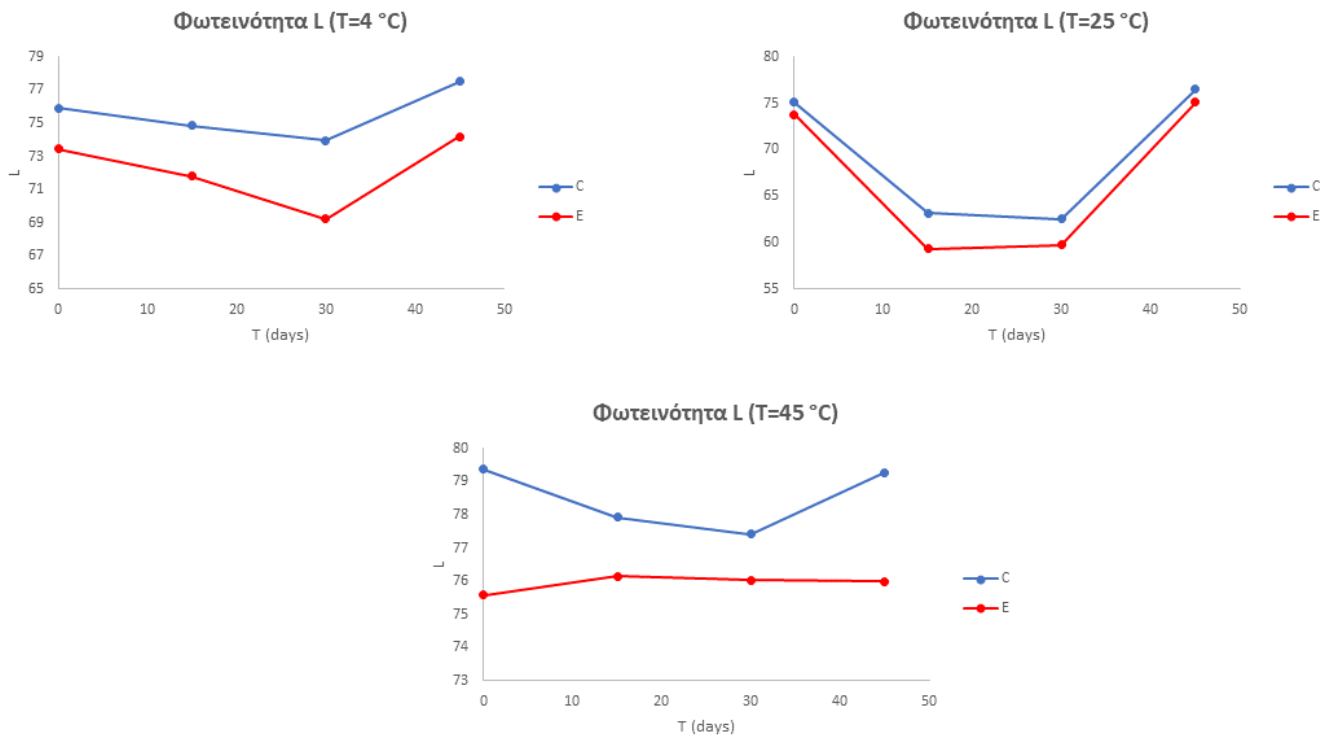
Οι μετρήσεις χρώματος περιελάμβαναν τη μέτρηση της φωτεινότητας L , τη μέτρηση της μεταβολής του κόκκινου-πράσινου χρώματος a , τη μέτρηση της μεταβολής του μπλε-κίτρινου χρώματος b και τη μέτρηση της συνολικής μεταβολής χρώματος ΔE σε όλες τις θερμοκρασίες και για όλους τους χρόνους αποθήκευσης.

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται όλες οι μετρήσεις (L, a, b) που πραγματοποιήθηκαν για τα δύο είδη κρέμας για όλες τις θερμοκρασίες ($4^{\circ}\text{C}, 25^{\circ}\text{C}, 45^{\circ}\text{C}$) και χρόνους αποθήκευσης (0,15,30,45 days). Στο Διάγραμμα 14 παρουσιάζεται η μεταβολή της φωτεινότητας συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης, στο Διάγραμμα 15 η μεταβολή του κόκκινου-πράσινου χρώματος συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης

Πίνακας 11. Μετρήσεις (L, a, b) για όλες τις θερμοκρασίες ($4^{\circ}\text{C}, 25^{\circ}\text{C}, 45^{\circ}\text{C}$) και χρόνους αποθήκευσης (0,15,30,45 days).

Δείγμα C (4°C)					
Ημέρες	L	Ημέρες	a	Ημέρες	b
0	75.92	0	-0.61	0	-0.55
15	74.84	15	-0.81	15	1.05
30	73.95	30	-0.82	30	0.96
45	77.49	45	-0.59	45	0.97
Δείγμα E (4°C)					
Ημέρες	L	Ημέρες	a	Ημέρες	b
0	73.46	0	-2.04	0	6.23
15	71.82	15	-1.66	15	6.01
30	69.23	30	-1.64	30	5.96
45	74.17	45	-2.44	45	5.93
Δείγμα C (25°C)					
Ημέρες	L	Ημέρες	a	Ημέρες	b
0	75.13	0	-0.54	0	-0.57
15	63.15	15	-0.81	15	1.05
30	62.55	30	-0.82	30	0.96
45	76.47	45	-0.57	45	1.03
Δείγμα E (25°C)					
Ημέρες	L	Ημέρες	a	Ημέρες	b
0	73.76	0	-2.55	0	9.68
15	59.32	15	-1.66	15	6.01
30	59.79	30	-1.64	30	5.96
45	75.12	45	-1.98	45	5.98
Δείγμα C (45°C)					
Ημέρες	L	Ημέρες	a	Ημέρες	b
0	79.36	0	-0.51	0	-0.52
15	77.93	15	-0.73	15	1.33
30	77.42	30	-0.75	30	1.15
45	79.28	45	-0.66	45	1.23

Δείγμα E (45 °C)					
Ημέρες	L	Ημέρες	a	Ημέρες	b
0	75.59	0	-2.1	0	7.65
15	76.14	15	-1.37	15	5.25
30	76.03	30	-1.38	30	5.75
45	75.99	45	-1.45	45	5.84

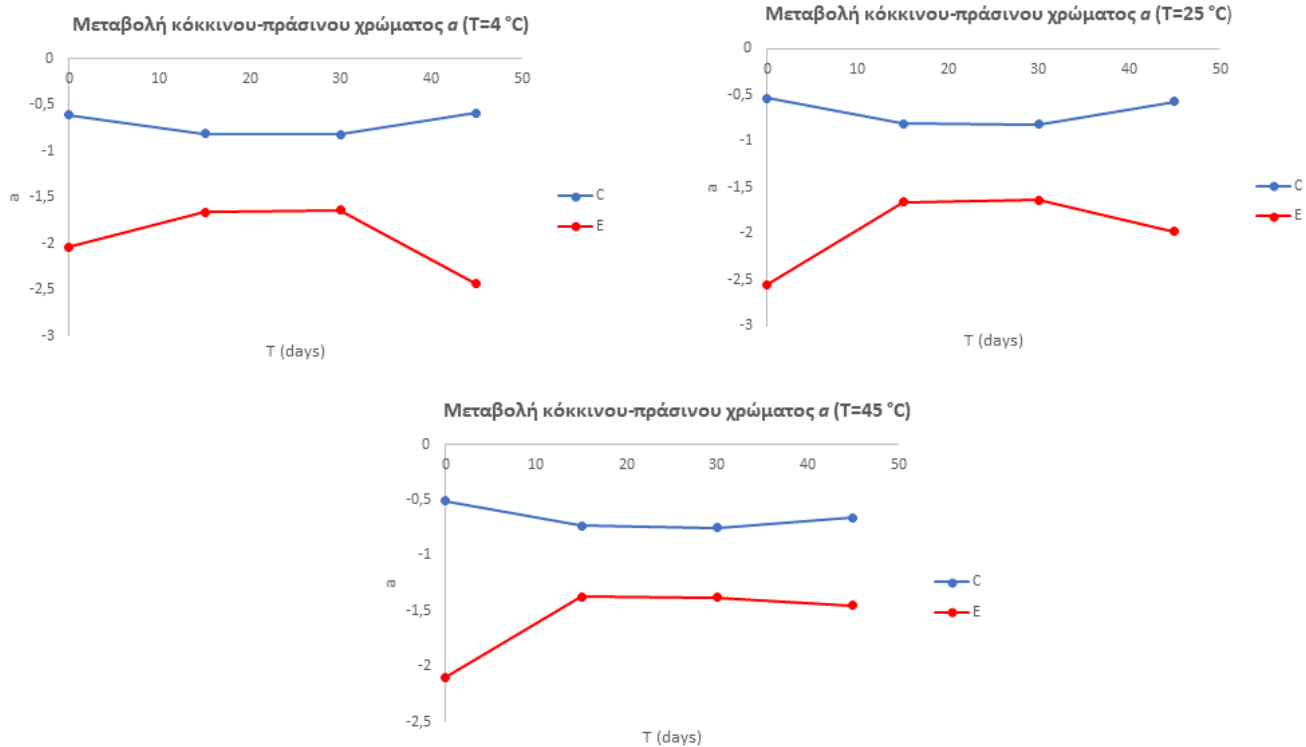


Διάγραμμα 14. Μεταβολή της φωτεινότητας συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για κάθε θερμοκρασία.

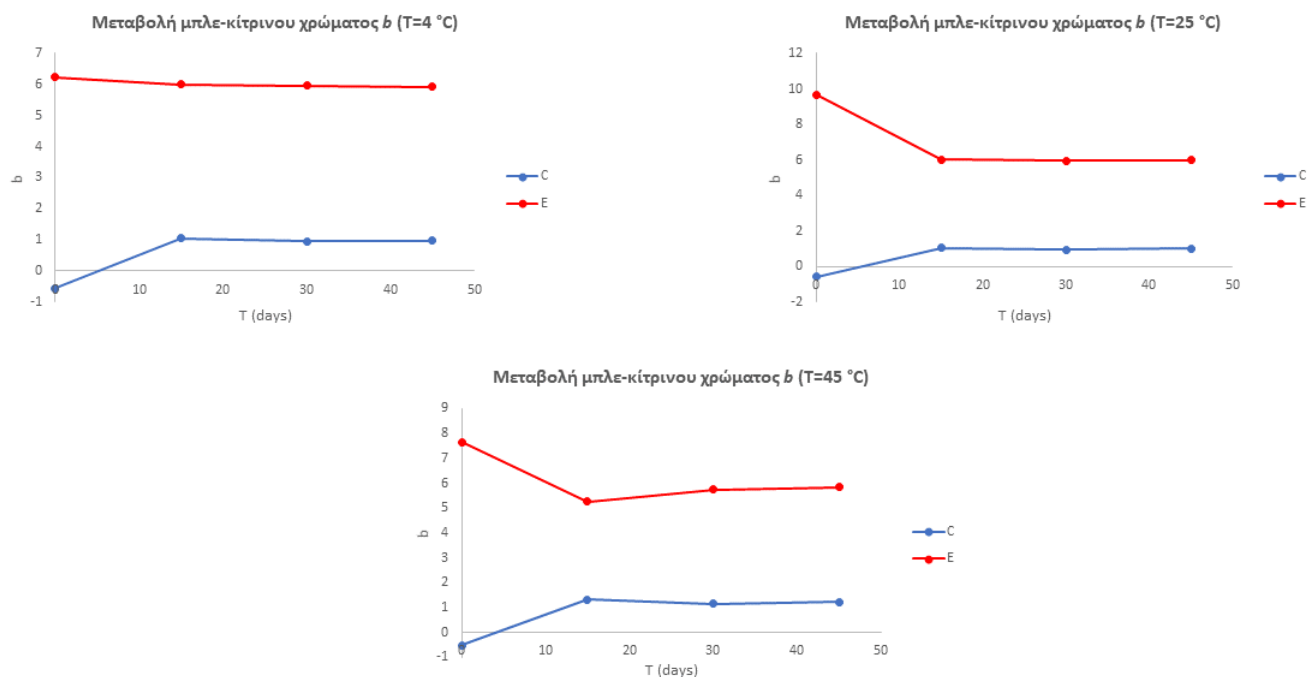
Αναφορικά με τη φωτεινότητα L (Διάγραμμα 14) παρατηρείται ότι σε γενικές γραμμές σε όλες τις περιπτώσεις (με εξαίρεση του δείγματος E στους 45°C) αρχικά μειώνεται μέχρι τις 30 ημέρες ενώ εν συνεχεία αυξάνεται. Εξαιρέση αποτελεί η περίπτωση της κρέμας με την εγκλεισμένη ουσία όπου στους 45°C παραμένει σχετικά αμετάβλητη.

Όσον αφορά τη μεταβολή του πράσινου-κόκκινου χρώματος παρατηρείται ότι η κρέμα βάσης (δείγμα C) είναι κοντά στη ζώνη του μηδέν σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ η κρέμα με την ενθυλακωμένη TTX (δείγμα E) παίρνει αρνητικές τιμές (κάτω του -1.5) γεγονός που αντιπροσωπεύει αποχρώσεις του πράσινου.

Τέλος στην περίπτωση του παράγοντα b που δηλώνει τη μεταβολή του μπλε-κίτρινου χρώματος είναι εμφανής η κυριαρχία του κίτρινου χρώματος στην κρέμα με την εγκλεισμένη ουσία (θετικές τιμές με τιμές πάνω από 5). Το γεγονός αυτό είναι απολύτως φυσιολογικό καθώς η μήτρα όπου χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση του εγκλεισμού είναι κίτρινου χρώματος.

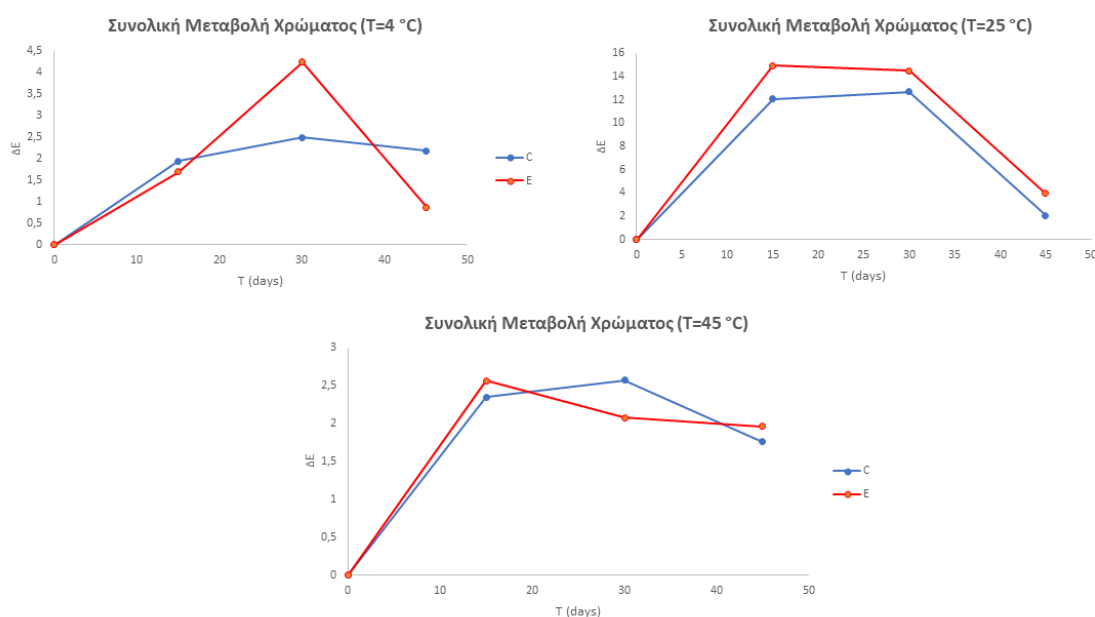


Διάγραμμα 15. Μεταβολή κόκκινου-πράσινου χρώματος συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για κάθε θερμοκρασία.



Διάγραμμα 16. Μεταβολή μπλε-κίτρινου χρώματος συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για κάθε θερμοκρασία.

Στο Διάγραμμα 17 παρουσιάζεται η συνολική μεταβολή χρώματος που παρουσίασαν τα δύο δείγματα κρέμας σε όλες τις θερμοκρασίες και για χρόνο αποθήκευσης 15,30 και 45 ημερών. Ως πρότυπο δείγμα χρησιμοποιήθηκαν οι μετρήσεις στο χρόνο μηδέν.



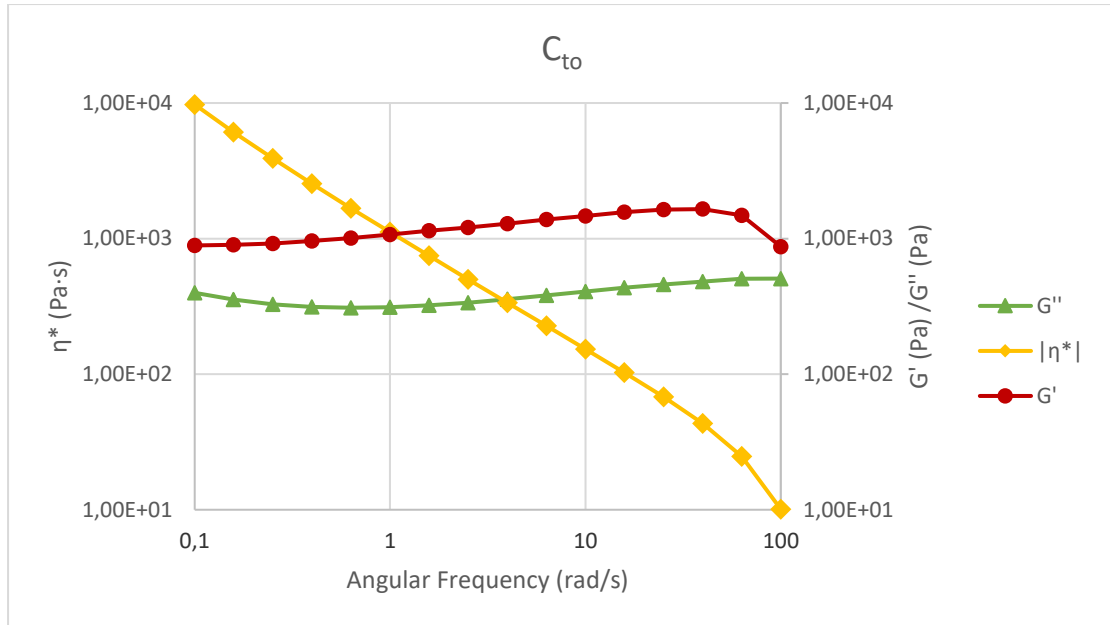
Διάγραμμα 17. Μεταβολή χρώματος συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης για κάθε θερμοκρασία.

Παρατηρείται ότι η συνολική μεταβολή χρώματος του δείγματος E είναι μεγαλύτερη της κρέμας βάσης σε όλες τις θερμοκρασίες.

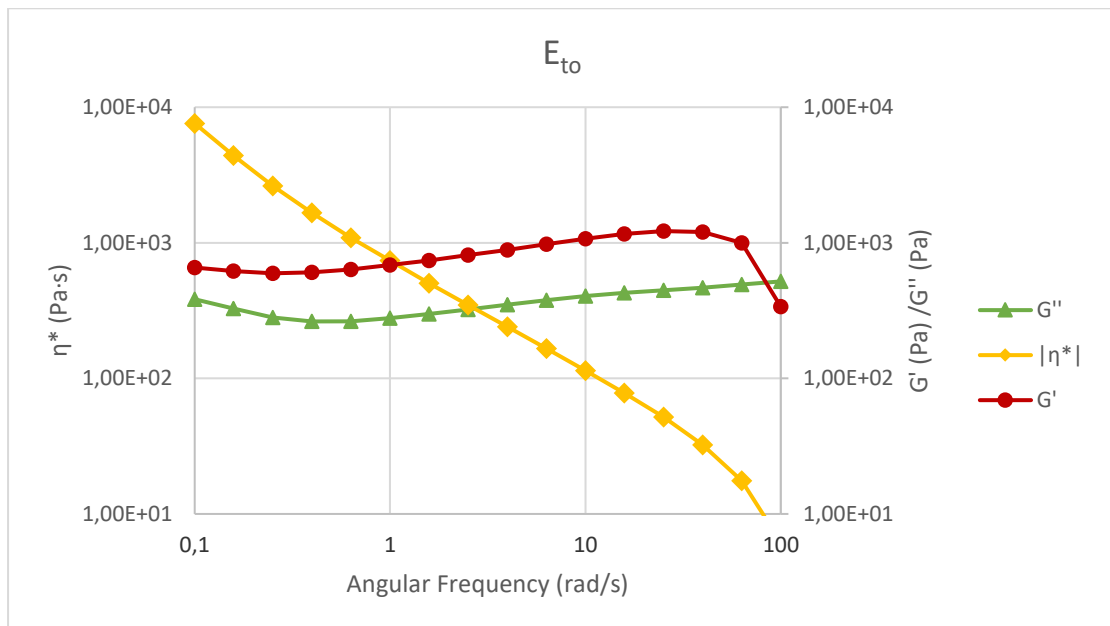
4.6. Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA)

Η ρεολογία αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο στην προσπάθεια εκτίμησης της συμπεριφοράς μιας κρέμας κατά την εφαρμογή της στο δέρμα. Υπό αυτό το πρίσμα, οι ρεολογικές δοκιμές μπορούν να προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τη σταθερότητα των κρεμών [116]. Για τη μελέτη των ρεολογικών και ιξωδοελαστικών παραμέτρων ελήφθησαν μετρήσεις του συντελεστή αποθήκευσης G' , του συντελεστή απώλειας G'' και του σύνθετου ιξώδους η^* . Η σταθερότητα των καλλυντικών σκευασμάτων υφίστανται ως συνέπεια των ενδομοριακών δυνάμεων αλληλεπίδρασης που σχηματίζουν ένα τρισδιάστατη δίκτυο δυνάμεων. Όσον αφορά τις δυναμικές παραμέτρους αυτών των προϊόντων, το μέτρο αποθήκευσης G' σε όλο το εύρος συχνοτήτων πρέπει να είναι μεγαλύτερο του μέτρου απωλειών.

Στη συνέχεια (Διάγραμμα 18, Διάγραμμα 19) παρουσιάζεται η μεταβολή των δυναμικών παραμέτρων (G' , G'' , και η^*) συναρτήσει της γωνιακής συχνότητας για τα δείγματα ελέγχου (δείγματα C και E στο χρόνο μηδέν).



Διάγραμμα 18. Αναπαράσταση G' , G'' , και η^* συναρτήσει της γωνιακής συχνότητας κάτω υπό σταθερή συχνότητα $\gamma = 0.1\%$ για το δείγμα C στο χρόνο μηδέν.



Διάγραμμα 19. Αναπαράσταση G' , G'' , και η^* συναρτήσει της γωνιακής συχνότητας κάτω υπό σταθερή συχνότητα $\gamma = 0.1\%$ για το δείγμα E στο χρόνο μηδέν.

Και στις δύο περιπτώσεις οι καμπύλες G' , G'' είναι σχεδόν παράλληλες σε όλο το εύρος συχνοτήτων με το G' να είναι σταθερά μεγαλύτερο του G'' . Η τιμή G' σε διαφορετικές γωνιακές συχνότητες παρέχει πολύτιμες πληροφορίες. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή G' σε χαμηλή γωνιακή συχνότητα ($\omega \leq 0.1 \text{ rad/s}$) δίνει πληροφορίες σχετικά με τη συμπεριφορά του δείγματος σε συνθήκες ηρεμίας. Σύμφωνα με έναν εμπειρικό κανόνα που εφαρμόζεται στο σχηματισμό καλλυντικών σκευασμάτων εάν $G' \geq 10 \text{ Pa}$ τότε μπορεί να θεωρηθεί μια ορισμένη σταθερότητα διασποράς, ενώ εάν $G' \leq 1 \text{ Pa}$ δεν υπάρχει καμία σταθερότητα [128].

Στην προκειμένη περίπτωση η τιμή G' είναι μεγαλύτερη των 10 Pa και στις δύο περιπτώσεις (891 και 655 Pa αντίστοιχα), οπότε τα σκευάσματα παρουσιάζουν ικανοποιητική σταθερότητα.

Οι χαμηλές τιμές παραμόρφωσης όταν συνδυάζονται με χαμηλές τιμές G' και G'' αποτελούν ένδειξη ομαλής αίσθησης και παρουσιάζονται σε «μαλακές» κρέμες. Από την άλλη πλευρά, οι «σκληρές» κρέμες απαιτούν εξίσου χαμηλές τιμές παραμόρφωσης για να εξαπλωθούν στην επιφάνεια του δέρματος, αλλά οι υψηλότερες τιμές G' και G'' υποδηλώνουν μία αίσθηση σκληρότητας. Συνεπώς, υπάρχει μια ανάγκη στη γνώση των ιξωδοελαστικών παραμέτρων των καλλυντικών σκευασμάτων καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη των επιδόσεων διαφορετικών κρεμών.

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται οι τιμές G'_0 και G''_0 για όλα τα εξεταζόμενα δείγματα για γωνιακή συχνότητα 0.1 rad/s.

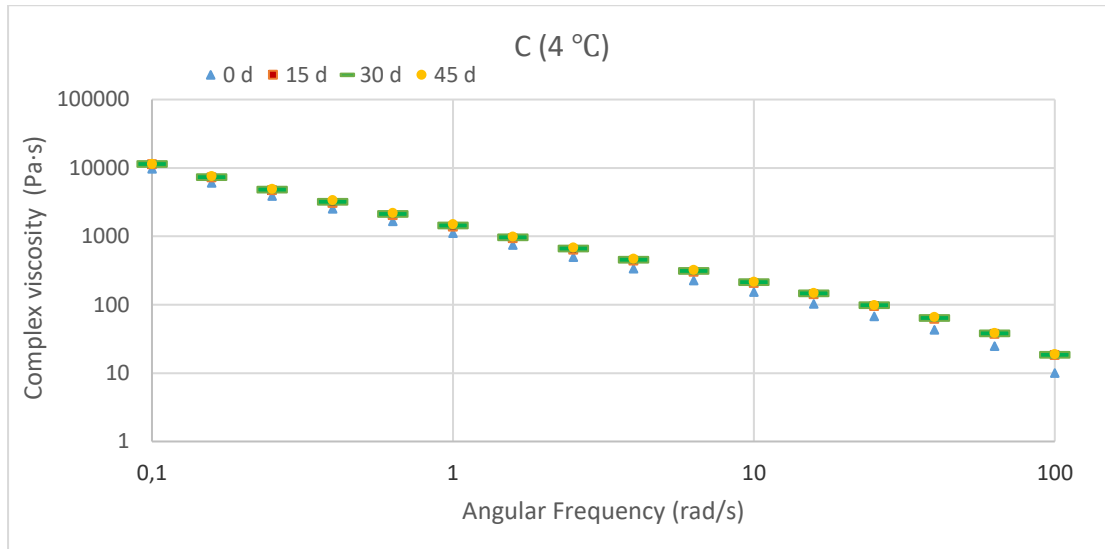
Πίνακας 12. Τιμές G'_0 και G''_0 για όλα τα εξεταζόμενα δείγματα και για γωνιακή συχνότητα 0.1 rad/s.

Δείγμα Κρέμας	Θερμοκρασία Αποθήκευσης (°C)	Περίοδος Αποθήκευσης (days)	G'_0 (Pa)	G''_0 (Pa)
C	-	0	891	397
	4	15	975	571
	4	30	978	588
	4	45	910	537
	25	15	944	343
	25	30	854	355
	25	45	758	297
	45	15	884	288
	45	30	1220	602
	45	45	1018	451
E	-	0	655	384
	4	15	800	506
	4	30	668	438
	4	45	710	454
	25	15	799	490
	25	30	750	460
	25	45	694	411
	45	15	1340	914
	45	30	1140	737
	45	45	1127	724

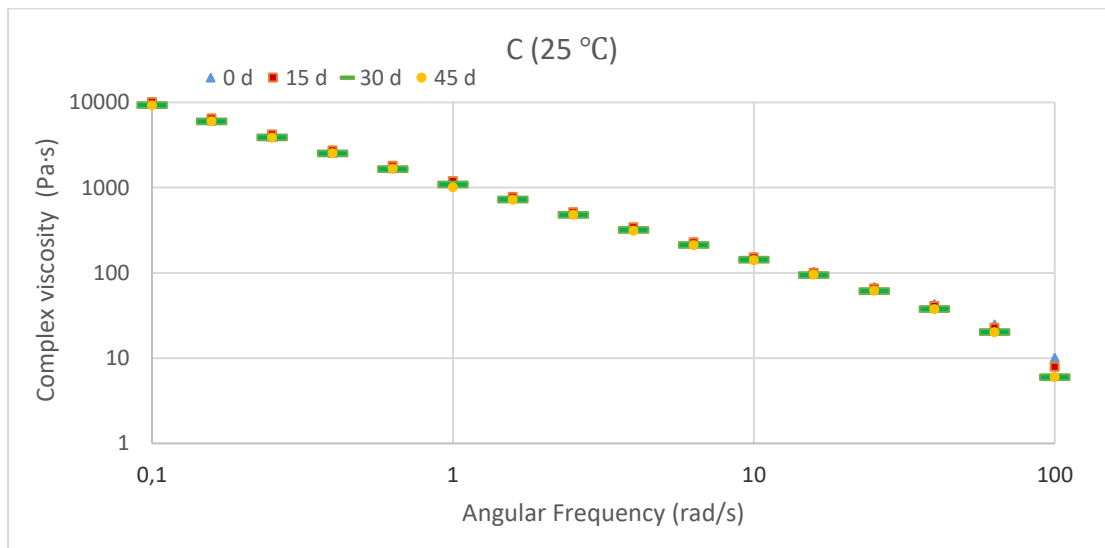
Αναφορικά με τις τιμές του Πίνακα 12 παρατηρείται ότι το δείγμα C παρουσιάζει υψηλότερες τιμές G'_0 και G''_0 . Με βάση αυτή την παρατήρηση η κρέμα βάσης C μπορεί να χαρακτηριστεί ως «σκληρή» κρέμα ενώ η E ως «μαλακή». Επίσης παρατηρείται ότι η κρέμα με τις λιγότερες μεταβολές στις τιμές G'_0 και G''_0 ήταν αυτή με το εγκλεισμένο προϊόν στους 45 °C. Παρόλα αυτά το σημαντικό είναι ότι όλες οι κρέμες (ανεξαρτήτως συνθηκών) διατηρούν όλες εκείνες τις τιμές που χαρακτηρίζουν μια καλλυντική κρέμα ως αποδεκτή για χρήση. Παρόμοια συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν από τις

μετρήσεις ιξώδους. Το ιξώδες μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό των καλλυντικών ως ένα «ευαίσθητο» μέτρο σχετικά με τις αλλαγές που μπορεί να υποστούν τα υλικά. Σε κάποιες περιπτώσεις η μικρή αύξηση της τιμής του ιξώδους παρατηρείται λόγω της ανάπτυξης και περαιτέρω εξισορρόπησης των γαλακτωματοποιημένων δομών, ενώ άλλες φορές σε μεγάλους χρόνους αποθήκευσης το ιξώδες μπορεί να μειωθεί σημαντικά λόγω της υποβάθμισης του προϊόντος [128].

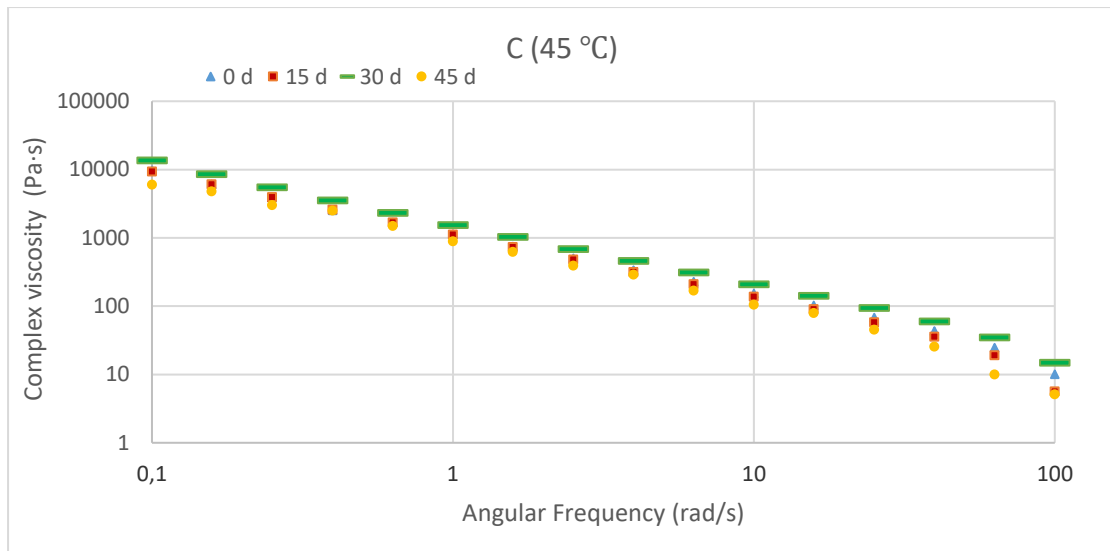
Στα επόμενα διαγράμματα παρουσιάζονται οι τιμές ιξώδους συναρτήσει της γωνιακής συχνότητας για τα δύο είδη κρέμας και για όλες τις θερμοκρασίες αποθήκευσης.



Διάγραμμα 20. Μεταβολή του σύνθετου ιξώδους σε όλο το εύρος συχνοτήτων (ω) υπό σταθερό $\gamma=0.1\%$ για τη κρέμα βάση (C) για τη θερμοκρασία των 4 °C.

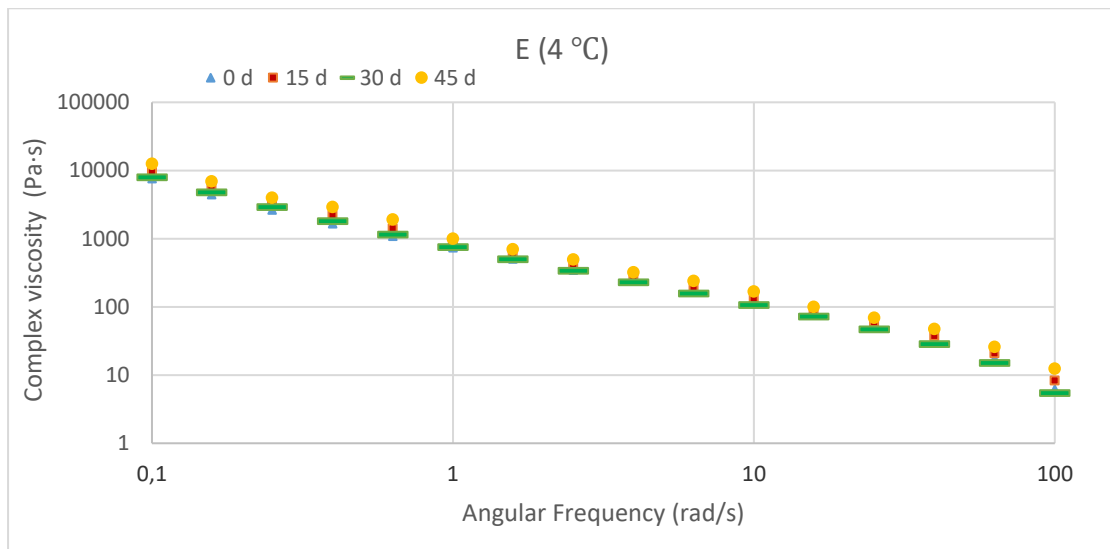


Διάγραμμα 21. Μεταβολή του σύνθετου ιξώδους σε όλο το εύρος συχνοτήτων (ω) υπό σταθερό $\gamma=0.1\%$ για τη κρέμα βάση (C) για τη θερμοκρασία των 25 °C.

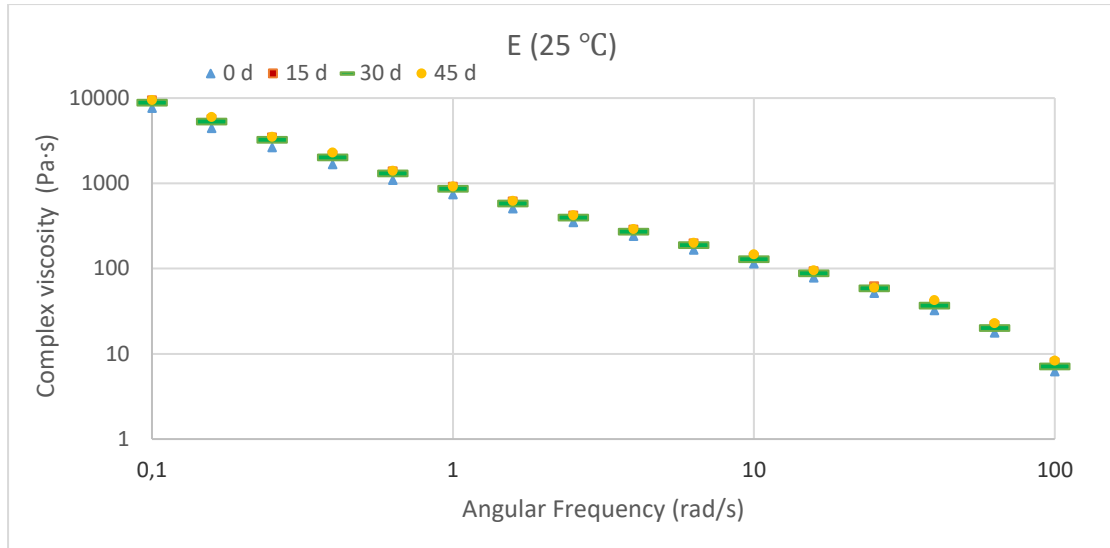


Διάγραμμα 22. Μεταβολή του σύνθετου ιξώδους σε όλο το εύρος συχνοτήτων (ω) υπό σταθερό $\gamma=0.1\%$ για τη κρέμα βάση (C) για τη θερμοκρασία των $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

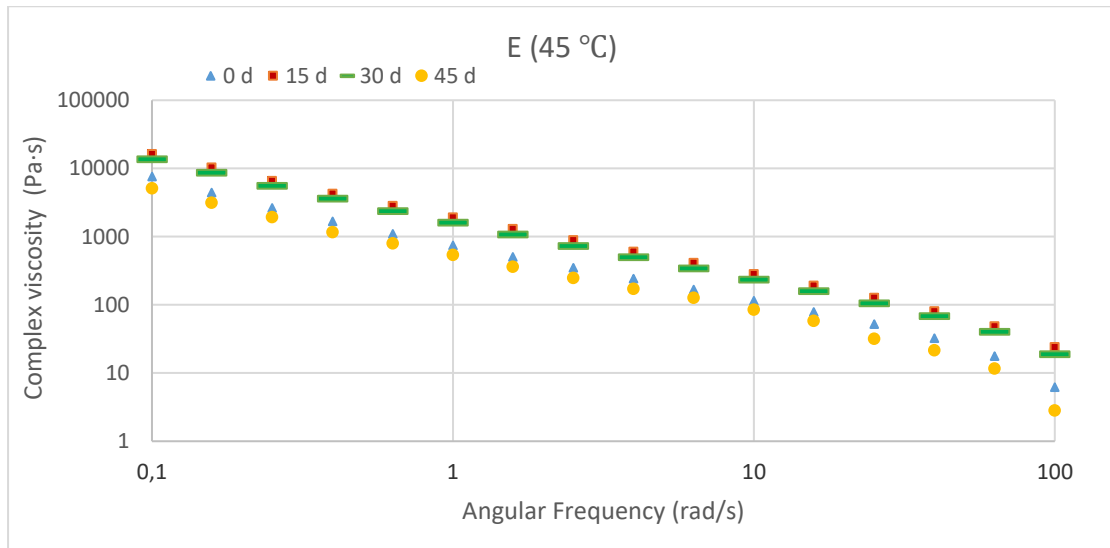
Στα Διαγράμματα που αφορούν την κρέμα βάση (Διάγραμμα 20, Διάγραμμα 21, Διάγραμμα 22) παρατηρείται ότι το σύνθετο ιξώδες δεν επηρεάζεται σημαντικά εκτός από τη θερμοκρασία αποθήκευσης των $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ όπου παρατηρείται μια δομική τροποποίηση της κρέμας. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και για την κρέμα με το εγκλεισμένο προϊόν, καθώς οι μεγαλύτερες μεταβολές παρατηρούνται στη θερμοκρασία αποθήκευσης των $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Επίσης για τη θερμοκρασία αυτή είναι εμφανής η μείωση του ιξώδους έπειτα από 45 ημέρες γεγονός που πιθανώς υποδεικνύει την υποβάθμιση του προϊόντος.



Διάγραμμα 23. Μεταβολή του σύνθετου ιξώδους σε όλο το εύρος συχνοτήτων (ω) υπό σταθερό $\gamma=0.1\%$ για τη κρέμα βάση με την ενθυλακωμένη τοξίνη (E) για τη θερμοκρασία των $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Διάγραμμα 24. Μεταβολή του σύνθετου ιξώδους σε όλο το εύρος συχνοτήτων (ω) υπό σταθερό $\gamma=0.1\%$ για τη κρέμα βάση με την ενθυλακωμένη τοξίνη (E) για τη θερμοκρασία των 25 °C.



Διάγραμμα 25. Μεταβολή του σύνθετου ιξώδους σε όλο το εύρος συχνοτήτων (ω) υπό σταθερό $\gamma=0.1\%$ για τη κρέμα βάση με την ενθυλακωμένη τοξίνη (E) για τη θερμοκρασία των 45 °C.

Κεφάλαιο 5: Σύνοψη – Συμπεράσματα – Μελλοντική Έρευνα

Τα χωροκατακτητικά Λεσεψιανά είδη, δηλαδή εκείνα που εισήλθαν στην Μεσόγειο Θάλασσα και στα Ελληνικά ύδατα μέσω της διώρυγας του Σουέζ, έχουν αναπτύξει γρήγορα μεγάλους πληθυσμούς στην Ανατολική Μεσογειακή λεκάνη, ενώ παρουσιάζουν ολοένα αυξανόμενα σημάδια εξάπλωσης στην κεντρική και δυτική πλευρά αυτής. Τα είδη *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) και *Pterois miles* (Bennett, 1828) αποτελούν δύο εκ των σημαντικότερων χωροκατακτητικών ξενικών ειδών (ΧΞΕ) των Ελληνικών θαλασσών. Ο λαγοκέφαλος *L.sceleratus* αποτελεί ένα από τα πιο τοξικά είδη στον πλανήτη, καθώς οι ιστοί του περιέχουν Τετραδοτοξίνη (ΤΤΧ), μια νευροπαραλυτική τοξίνη που μπορεί να προκαλέσει τον θάνατο σε περίπτωση κατανάλωσης. Το λεοντόψαρο *P.miles* παρότι δεν αποτελεί άμεσο κίνδυνο για την ανθρώπινη ζωή, είναι επίσης δηλητηριώδες και προκαλεί ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων συμπεριλαμβανομένου του δυνατού πόνου όταν το δηλητηριώ του εγχυθεί μέσω των σκληρών ακανθών των πτερυγίων του.

Η άνοδος της θερμοκρασίας της Μεσογείου λόγω της κλιματικής αλλαγής ευνοεί την εξάπλωση των λεσεψιανών εισβολέων. Με την εμπορική αξία και τις δυνατότητες εκμετάλλευσης τους να παραμένουν μηδενικές, χωροκατακτητικά είδη όπως ο λαγοκέφαλος και εν συνεχεία το λεοντόψαρο αποτελούν επιβαρυντικούς παράγοντες για την Ελληνική αλιεία. Η εξεύρεση καινοτόμων μεθόδων για την οικονομική αξιοποίησή τους αποτελεί βασική προϋπόθεση αφενός ώστε να δημιουργηθούν κίνητρα ως προς την στοχευμένη αλίευσή τους και αφετέρου ώστε να επιτευχθεί ο περιορισμός των πληθυσμών τους στις Ελληνικές θάλασσες.

Η προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησης του δηλητηρίου που περιέχεται στις ακάνθες του *P.miles* έδειξε ότι η δηλητηριώδης δράση του υπονομεύεται από την παρουσία τοξικών πρωτεϊνών. Από τα τρία δείγματα που αναλύθηκαν προέκυψε ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης εντοπίζεται στο Δείγμα Β ($6062 \frac{\mu\text{g πρωτεΐνης}}{\text{g ακάνθων}}$), δηλαδή σε αυτό από τους ιστούς της βάσης των ακάνθων, γεγονός όπου κρίνεται αναμενόμενο καθώς οι ιστοί και τα υπολείμματα επιδερμίδας του ψαριού είναι πλούσια σε πρωτεϊνικά μόρια. Στα άλλα δύο δείγματα η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν εμφανώς μικρότερη καθώς αφορούσε αποκλειστικά τις ακάνθες του λεοντόψαρου (Δείγμα Α $760 \frac{\mu\text{g πρωτεΐνης}}{\text{g ακάνθων}}$, Δείγμα C $372 \frac{\mu\text{g πρωτεΐνης}}{\text{g ακάνθων}}$). Μετά την απομόνωση του δηλητηρίου πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των πρωτεϊνών μέσω ηλεκτροφόρησης σε gel πολυακρυλαμιδίου. Στο δείγμα C παρατηρήθηκε μία μόνο μπάντα γύρω στα 76 kDa (γραμμές 6,7), ενώ οι γραμμές 2 και 3 που αντιστοιχούν στα εκχυλίσματα των ιστών από τη βάση των αγκαθιών (Δείγμα Β) εμφανίστηκαν πολλαπλές μπάντες με πολλά διαφορετικά μοριακά βάρη, γεγονός που υποδηλώνει το πλήθος των πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών που υπήρχαν σε αυτό το δείγμα. Τέλος, στις γραμμές 3 και 4 που αντιστοιχούν στα εκχυλίσματα από τις ακάνθες του λεοντόψαρου (Δείγμα Α) εμφανίστηκαν περίπου 9 διαφορετικές μπάντες, με πολύ πιο έντονη αυτή στα 77.5 kDa.

Σχετικά με το λαγοκέφαλο *L.sceleratus*, αρχικά προσδιορίστηκε η ΤΤΧ από το μυϊκό ιστό και τα όργανα του ψαριού (νεφρά, χολή, έντερα, ωθήκες) με χρήση υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1 % v/v και μεθανολικού διαλύματος οξικού οξέος

1 % *v/v*. Η συγκέντρωση TTX προέκυψε έπειτα από την ανάλυση των δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία με δίδυμη φασματομετρία μαζών (*LC-MS/MS*). Καταλληλότερος διαλύτης για τη διεργασία της εκχύλισης αποδείχτηκε το υδατικό διάλυμα οξικού οξέος, ενώ τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στο εκχύλισμα την εμφάνισε το δείγμα 6 ($0.782 \frac{\mu\text{g TTX}}{\text{mL } \delta/\text{τος}}$) όπου προερχόταν από τα όργανα του θηλυκού λαγοκέφαλου.

Μετά την απομόνωση της TTX από το *L.scleratus*, επόμενος στόχος της εν λόγω διπλωματικής αποτέλεσε η προσπάθεια ενθυλάκωσης της τοξίνης αυτής με σκοπό την αξιοποίησή της σε καλλυντικοτεχνικά προϊόντα (καλλυντικές κρέμες). Η μελέτη εγκλεισμού έγινε με χρήση της ηλεκτροϋδροδυναμικής διεργασίας του ηλεκτροστατικού ψεκασμού (*electrospraying*) και η πολυμερική μήτρα που χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό ήταν η ζεΐνη. Όσον αφορά τη διεργασία του ηλεκτροστατικού ψεκασμού τα βέλτιστα αποτελέσματα προέκυψαν όταν η επιφάνεια του συλλέκτη τοποθετήθηκε 13 έως 15 cm από το τριχοειδές άκρο, η ογκομετρική παροχή της θέσης 1 κυμαινόταν μεταξύ 200 και 300 $\frac{\mu\text{L}}{\text{h}}$ και η τάση κυμαινόταν από 25 έως 27 kV. Η ογκομετρική παροχή του οξικού οξέος (θέση 2) ήταν σταθερή στα 100 $\frac{\mu\text{L}}{\text{h}}$. Ο χαρακτηρισμός του τελικού προϊόντος ενθυλάκωσης πραγματοποιήθηκε με χρήση της Φασματοσκοπίας Εξασθετισμένης Ολικής Ανάκλασης Υπερύθρου (*ATR-FTIR*), της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (*DSC*), της Μικροσκοπίας Ηλεκτρονικής Σάρωσης (*SEM*), της Ανάλυσης Μεγέθους Σωματιδίων (*Particle Size Distribution*).

Η ανάπτυξη και μικροβιολογική ανάλυση καλλυντικών κρεμών έγινε στα πλαίσια διερεύνησης της επίδρασης προσθήκης της εγκλεισμένης TTX ως πρόσθετο συστατικό σε τυπική φόρμουλα καλλυντικών κρεμών με σκοπό την υποκατάσταση του συνθετικού μπότοξ με την TTX του λαγοκέφαλου. Για το σκοπό αυτό έγινε προσπάθεια ενσωμάτωσης των σωματιδίων (με την εγκλεισμένη TTX από τη διεργασία του *electrospraying*) σε καλλυντική κρέμα βάσης χωρίς πρόσθετα. Για τις ανάγκες του πειράματος αναλύθηκαν δύο ειδών κρέμας: η κρέμα βάση και η κρέμα βάση με τα εγκλεισμένα σωματίδια ζεΐνης που περιέχουν TTX. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες 4, 25 και 45 °C και αναλύθηκαν έπειτα από 15, 30 και 45 ημέρες αντίστοιχα.

Τα δείγματα σε όλες τις θερμοκρασίες και χρόνους αποθήκευσης, αναλύθηκαν μικροβιολογικά (ολικό μικροβιακό φορτίο, ζύμες/μούχλες και *E.coli*) και διαπιστώθηκε ότι πληρούν όλα τα πρότυπα υγιεινής και ασφάλειας. Επίσης, σε κάθε εξεταζόμενο δείγμα μετρήθηκε το pH, το χρώμα και η ρεολογία των κρεμών. Η μελέτη της ρεολογίας πραγματοποιήθηκε μέσω πειραμάτων ρεολογικών δοκιμών ταλάντωσης (δοκιμές σάρωσης συχνότητας) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της Δυναμικής Μηχανικής Ανάλυσης (*DMA*). Μέσω του *DMA* αξιολογήθηκαν οι μεταβολές του συντελεστή αποθήκευσης (G'), του συντελεστή απώλειας (G'') και του σύνθετου ιξώδους (η^*) και διαπιστώθηκε ότι όλες οι κρέμες (ανεξαρτήτως συνθηκών) διατηρούν όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά που καθιστούν μια καλλυντική κρέμα αποδεκτή για χρήση.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα διπλωματική εργασία είναι τα εξής:

- Η δηλητηριώδης δράση των ακάνθων του *P.miles* υπονομεύεται από την παρουσία τοξικών πρωτεϊνών. Ο καθαρισμός με θειικό αμμώνιο στο πρωτόκολλο απομόνωσης του δηλητηρίου του λεοντόψαρου ήταν επιτυχημένος καθώς παρατηρείται μία μόνο μπάντα γύρω στα 76 kDa (γραμμές 6,7),
- το δηλητήριο του λεοντόψαρου είναι ένα ετεροδιμερές με συνολικό μοριακό βάρος 150 kDa με καθεμιά από τις υπομονάδες του να έχει μοριακό βάρος περίπου 75 kDa. Επομένως, η χαρακτηριστική μπάντα που εμφανίζουν και τα δύο εκχυλίσματα από τα αγκάθια *P. miles* (γραμμές 4,5) μεταξύ 77.5 και 76.4 kDa είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στο γεγονός αυτό,
- στα εκχυλίσματα από τους ιστούς της βάση των ακάνθων (γραμμές 2,3), υπάρχουν πολλαπλές μπάντες πρωτεϊνών στην περιοχή των 75 kDa και είναι δύσκολο να εξακριβωθεί αν τα συγκεκριμένα δείγματα περιέχουν όντως το δηλητήριο ή αν πρόκειται για κάποιο άλλο είδος πρωτεϊνών με παρόμοιο μοριακό βάρος,
- καταλληλότερος διαλύτης για την εκχύλιση της Τετραδοτοξίνης (TTX) του *L.scleratus* και για τις δύο ηλικίες λαγοκέφαλου ήταν το υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.1 % v/v,
- μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε TTX (και για τις δύο ηλικίες) περιέχεται στα όργανα του ψαριού (νεφρά, χολή, έντερο, ωοθήκες) συγκριτικά με το μυϊκό ιστό,
- ο θηλυκός λαγοκέφαλος (και για τις δύο ηλικίες) περιέχει τόσο στη σάρκα όσο και στα όργανά του μεγαλύτερη ποσότητα TTX συγκριτικά με τον αρσενικό,
- ο μικρότερος σε ηλικία λαγοκέφαλος περιέχει λιγότερη ποσότητα TTX αν και στην προκειμένη περίπτωση εμπλέκεται μέσα και το ζήτημα του φύλου καθώς ο μικρότερος σε ηλικία είναι γένους αρσενικού όπου έτσι και αλλιώς αναμένεται να έχει μικρότερη συγκέντρωση TTX συγκριτικά με το θηλυκό,
- η ζείνη αποδείχτηκε ιδανική μήτρα για την ενθυλάκωση της TTX (απόδοση εγκλεισμού 90 %),
- τα δείγματα κρεμών που αναπτύχθηκαν πληρούν όλα τα πρότυπα υγιεινής και ασφάλειας (μικροβιολογικός έλεγχος, έλεγχος pH, έλεγχος χρώματος και ρεολογίας).

Στις προτάσεις μελλοντικής έρευνας θα μπορούσαν να μελετηθούν τα εξής:

- Μελέτη αξιοποίησης του δηλητηρίου από τις ακάνθες του *P.miles*,
- μελέτες ενθυλάκωσης της ΤΤΧ και με άλλες πολυμερικές μήτρες,
- τεχνοοικονομική μελέτη όλων των διεργασιών και για τα δύο είδη ιχθύων.

Βιβλιογραφία

- [1] D. Golani, E. Azzurro, M. Corsini-Foka, M. Falautano, F. Andaloro, and G. Bernardi, “Genetic bottlenecks and successful biological invasions: The case of a recent Lessepsian migrant,” *Biol. Lett.*, vol. 3, no. 5, pp. 541–545, Oct. 2007, doi: 10.1098/rsbl.2007.0308.
- [2] M. Oral, “Alien fish species in the Mediterranean-Black Sea Basin Akdeniz Havzası’nda Görülen Yabancı Balık Türleri,” 2010.
- [3] L. Capdevila-Argüelles and B. Zilletti, “A PERSPECTIVE ON CLIMATE CHANGE AND INVASIVE ALIEN SPECIES.” 2008.
- [4] S. W. Burgiel, A. A. Muir, S. Burgiel, and S. Simons, *Invasive Species, Climate Change and Ecosystem-Based Adaptation: Addressing Multiple Drivers of Global Change Global Invasive Species Programme GISP’s mission is to conserve biodiversity and sustain human livelihoods by minimising the spread and impact of invasive species GISP Global Invasive Species Programme.* 2010.
- [5] M. Nader, S. Indary, and L. Boustany, “The Puffer Fish *Lagocephalus Sceleratus* (Gmelin, 1789) in the Eastern Mediterranean,” 2012. Accessed: Jul. 01, 2021. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/265612901_THE_PUFFER_FISH_LAGOCEPHALUS_SCELERATUS_GMELIN_1789_IN_THE_EASTERN_MEDITERRANEAN.
- [6] B. S. Galil and A. Zenetos, “A sea change exotics in the Eastern Mediterranean Sea,” in *Invasive aquatic species of Europe. Distribution, impacts and management*, Springer, 2002, pp. 325–336.
- [7] D. Golani and B. Appelbaum-Golani, “Fish invasions of the Mediterranean Sea: change and renewal,” 2010.
- [8] B. Ozturk, “Draft document on the alien species in the Mediterranean and the Black Sea,” *Gen. Fish. Comm. Mediterr. Sci. Advis. Committee. GFCMSAC. 12th Sess. Budva Montenegro*, 2010.
- [9] P. Peristeraki, G. Lazarakis, C. Skarvelis, M. Georgiadis, and G. Tserpes, “Additional records on the occurrence of alien fish species in the eastern Mediterranean Sea,” *Mediterr. Mar. Sci.*, vol. 7, no. 2, pp. 61–66, 2006.
- [10] M. Corsini, P. Margies, G. Kondilatos, P. S. Economidis, and others, “Lessepsian migration of fishes to the Aegean Sea: First record of *Tylerius spinosissimus* (Tetraodontidae) from the Mediterranean, and six more fish records from Rhodes,” *Cybium*, vol. 29, no. 4, pp. 347–354, 2005.
- [11] P. Kasapidis, P. Peristeraki, G. Tserpes, and A. Magoulas, “First record of the lessepsian migrant *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin 1789)(Osteichthyes: Tetraodontidae) in the Cretan sea (Aegean, Greece),” *Aquat. invasions*, vol. 2, no. 1, pp. 71–73, 2007.
- [12] S. Kalogirou, “Ecological characteristics of the invasive pufferfish *Lagocephalus*

- sceleratus (Gmelin, 1789) in the eastern Mediterranean Sea--a case study from Rhodes,” *Mediterr. Mar. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 251–260, 2013.
- [13] G. Coro, L. G. Vilas, C. Magliozzi, A. Ellenbroek, P. Scarponi, and P. Pagano, “Forecasting the ongoing invasion of *Lagocephalus sceleratus* in the Mediterranean Sea,” *Ecol. Modell.*, vol. 371, pp. 37–49, 2018.
- [14] M. K. C. Chan and P. David, “Nine fatal cases of puffer fish poisoning in Sabah, Malaysia,” 1987.
- [15] J. Kheifets, B. Rozhavsky, Z. Girsh Solomonovich, R. Marianna, and A. Soroksky, “Severe tetrodotoxin poisoning after consumption of *Lagocephalus sceleratus* (pufferfish, fugu) fished in Mediterranean Sea, treated with cholinesterase inhibitor,” *Case reports Crit. care*, vol. 2012, 2012.
- [16] N. Homaira *et al.*, “Multiple outbreaks of puffer fish intoxication in Bangladesh, 2008,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 83, no. 2, p. 440, 2010.
- [17] M. Aydin, “Growth, reproduction and diet of pufferfish (*Lagocephalus sceleratus* Gmelin, 1789) from Turkey’s Mediterranean sea coast,” *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 11, no. 4, 2011.
- [18] T. Noguch and O. Arakawa, “Tetrodotoxin--distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication,” *Mar. Drugs*, vol. 6, no. 2, pp. 220–242, 2008.
- [19] A. A. El-Ganainy, M. M. Sabrah, and M. A. Zaky, “Biology and toxicity of the pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from the Gulf of Suez,” 2006.
- [20] M. Bilecenoglu, M. Kaya, and S. Akalin, “Range expansion of silverstripe blaasop, *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789), to the northern Aegean Sea,” *Aquat. Invasions*, vol. 1, no. 4, pp. 289–291, 2006.
- [21] M. Makarova, L. Rycek, J. Hajicek, D. Baidilov, and T. Hudlicky, “Tetrodotoxin: History, biology, and synthesis,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 58, no. 51, pp. 18338–18387, 2019.
- [22] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley, “Movement of sodium and potassium ions during nervous activity,” in *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 1952, vol. 17, pp. 43–52.
- [23] W. S. Agnew, S. R. Levinson, J. S. Brabson, and M. A. Raftery, “Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus* electroplax membranes,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 75, no. 6, pp. 2606–2610, 1978.
- [24] W. A. Catterall, A. L. Goldin, and S. G. Waxman, “International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 57, no. 4, pp. 397–409, 2005.
- [25] M. de Lera Ruiz and R. L. Kraus, “Voltage-gated sodium channels: structure, function, pharmacology, and clinical indications,” *J. Med. Chem.*, vol. 58, no.

- 18, pp. 7093–7118, 2015.
- [26] T. Narahashi, T. Deguchi, N. Urakawa, and Y. Ohkubo, “Stabilization and rectification of muscle fiber membrane by tetrodotoxin,” *Am. J. Physiol. Content*, vol. 198, no. 5, pp. 934–938, 1960.
- [27] E. E. J. Kasteel and R. H. S. Westerink, “Comparison of the acute inhibitory effects of Tetrodotoxin (TTX) in rat and human neuronal networks for risk assessment purposes,” *Toxicol. Lett.*, vol. 270, pp. 12–16, 2017.
- [28] C. H. Lee and P. C. Ruben, “Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin,” *Channels*, vol. 2, no. 6, pp. 407–412, 2008.
- [29] T. Tsukamoto *et al.*, “Differential binding of tetrodotoxin and its derivatives to voltage-sensitive sodium channel subtypes (Nav1. 1 to Nav1. 7),” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 174, no. 21, pp. 3881–3892, 2017.
- [30] K. Matsumura, “A monoclonal antibody against tetrodotoxin that reacts to the active group for the toxicity,” *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 293, no. 1, pp. 41–45, 1995.
- [31] Y. Ogura and Y. Mori, “Mechanism of local anesthetic action of crystalline tetrodotoxin and its derivatives,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 3, no. 1, pp. 58–67, 1968.
- [32] C. Stoetzer, S. Reuter, T. Doll, N. Foadi, F. Wegner, and A. Leffler, “Inhibition of the cardiac Na⁺ channel α -subunit Nav1. 5 by propofol and dexmedetomidine,” *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, vol. 389, no. 3, pp. 315–325, 2016.
- [33] C. B. Berde, U. Athiraman, B. Yahalom, D. Zurakowski, G. Corfas, and C. Bognet, “Tetrodotoxin-bupivacaine-epinephrine combinations for prolonged local anesthesia,” *Mar. Drugs*, vol. 9, no. 12, pp. 2717–2728, 2011.
- [34] J. Shi *et al.*, “Tetrodotoxin reduces cue-induced drug craving and anxiety in abstinent heroin addicts,” *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 92, no. 4, pp. 603–607, 2009.
- [35] D.-F. Hwang, T. Noguchi, Y. Nagashima, I.-C. Liao, and K. Hashimoto, “Occurrence of Paralytic Shellfish Poison in the Purple Clam *Soletellina diphos* (Bivalve),” *Nippon SUISAN GAKKAISHI*, vol. 53, no. 4, pp. 623–626, 1987, doi: 10.2331/suisan.53.623.
- [36] T. R. Ferreira, I. R. dos S. Corrêa, S. do S. N. Hoshino, C. L. Q. da Silva, and P. P. de O. Pardal, “Envenomation caused by the consumption of pufferfish liver,” *Rev. para. med*, 2010.
- [37] E. T. Schultz, “*Pterois volitans* and *Pterois miles*: two valid species,” *Copeia*, pp. 686–690, 1986.
- [38] D. Kletou, J. M. Hall-Spencer, and P. Kleitou, “A lionfish (*Pterois miles*) invasion has begun in the Mediterranean Sea,” *Mar. Biodivers. Rec.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–7, 2016.

- [39] I. Giovos, P. Kleitou, V. Paravas, D. Marmara, G. Romanidis-Kyriakidis, and D. Poursanidis, “Citizen scientists monitoring the establishment and expansion of Pterois miles (Bennett, 1828) in the Aegean Sea, Greece,” 2018.
- [40] W. M. G. M. Loon *et al.*, “A European Threshold Value and Assessment Method for Macro Litter on Coastlines.” 2020, doi: 10.2760/54369.
- [41] R. Assessment, “Risk Assessment for the lionfish Pterois miles (Bennett, 1828),” 1828, [Online]. Available: https://circabc.europa.eu/sd/a/42710eac-43b8-4d7b-b645-f91795d60097/Pterois_miles_final_20201117.pdf.
- [42] “ΑΣΦΑΛΗΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ – ReLionMed.” <https://relionmed.eu/el/public-engagement/safe-handling/> (accessed Jul. 11, 2021).
- [43] J. A. Morris Jr *et al.*, “Biology and ecology of the invasive lionfishes, Pterois miles and Pterois volitans,” 2009.
- [44] C. Eddy, J. Pitt, K. Oliveira, J. A. Morris, J. Potts, and D. Bernal, “The life history characteristics of invasive lionfish (Pterois volitans and P. miles) in Bermuda,” *Environ. Biol. Fishes*, vol. 102, no. 6, pp. 887–900, 2019.
- [45] S. J. Vetrano, J. B. Lebowitz, and S. Marcus, “Lionfish envenomation,” *J. Emerg. Med.*, vol. 23, no. 4, pp. 379–382, 2002.
- [46] J. E. Church and W. C. Hodgson, “The pharmacological activity of fish venoms,” *Toxicon*, vol. 40, no. 8, pp. 1083–1093, 2002.
- [47] M. Y. Khalil, “Insights into the venomology of the Red Sea lionfish (Pterois miles, Scorpaenidae): venom protein identification and anti-cancer efficacy,” 2013.
- [48] A. Sáenz, N. Ortiz, B. Lomonte, A. Rucavado, and C. Díaz, “Comparison of biochemical and cytotoxic activities of extracts obtained from dorsal spines and caudal fin of adult and juvenile non-native Caribbean lionfish (Pterois volitans/miles),” *Toxicon*, vol. 137, pp. 158–167, 2017.
- [49] A. Kiriake and K. Shiomi, “Some properties and cDNA cloning of proteinaceous toxins from two species of lionfish (Pterois antennata and Pterois volitans),” *Toxicon*, vol. 58, no. 6–7, pp. 494–501, 2011.
- [50] A. Furkan, A. Deniz, and N. S. BÖREKÇİ, “Inflammatory and Erectile Dysfunction (Impotence) Treating Potential of Lionfish Venom,” *Mediterr. Fish. Aquac. Res.*, vol. 3, no. 3, pp. 103–111.
- [51] A. N. Sommeng *et al.*, “Extraction of PLA2 and antibacterial activity test of lionfish (Pterois volitans) spine venom,” in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2020, vol. 462, no. 1, p. 12040.
- [52] J.-P. Nicolas, Y. Lin, G. Lambeau, F. Ghomashchi, M. Lazdunski, and M. H. Gelb, “Localization of structural elements of bee venom phospholipase A2 involved in N-type receptor binding and neurotoxicity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 11, pp. 7173–7181, 1997.
- [53] A. Argiolas and J. J. Pisano, “Facilitation of phospholipase A2 activity by

- mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom.," *J. Biol. Chem.*, vol. 258, no. 22, pp. 13697–13702, 1983.
- [54] C. Wandrey, A. Bartkowiak, and S. E. Harding, "Materials for encapsulation," in *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*, Springer, 2010, pp. 31–100.
- [55] A. Trojanowska, A. Nogalska, R. G. Valls, M. Giamberini, and B. Tylkowski, "6. Technological solutions for encapsulation," *Polym. Eng.*, pp. 171–202, 2017.
- [56] G. S. Banker, J. Siepmann, and C. Rhodes, *Modern pharmaceuticals*. CRC Press, 2002.
- [57] V. Nedovic, A. Kalusevic, V. Manojlovic, S. Levic, and B. Bugarski, "An overview of encapsulation technologies for food applications," *Procedia Food Sci.*, vol. 1, pp. 1806–1815, 2011.
- [58] K. G. H. Desai and H. Jin Park, "Recent developments in microencapsulation of food ingredients," *Dry. Technol.*, vol. 23, no. 7, pp. 1361–1394, 2005.
- [59] U. Lesmes and D. J. McClements, "Structure--function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems," *Trends Food Sci. & Technol.*, vol. 20, no. 10, pp. 448–457, 2009.
- [60] A. Nitika, M. Ravinesh, G. Chirag, and A. Manu, "Microencapsulation, A novel Approach in Drug Delivery. A review, Indo Glob," *J. Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–20, 2012.
- [61] M. D. Blanco and M. J. Alonso, "Development and characterization of protein-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanospheres," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 43, no. 3, pp. 287–294, 1997.
- [62] F. Casanova and L. Santos, "Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application--a review," *J. Microencapsul.*, vol. 33, no. 1, pp. 1–17, 2016.
- [63] I. M. Martins, M. F. Barreiro, M. Coelho, and A. E. Rodrigues, "Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications," *Chem. Eng. J.*, vol. 245, pp. 191–200, 2014.
- [64] K. R. Pawar and R. J. Babu, "Polymeric and lipid-based materials for topical nanoparticle delivery systems," *Crit. Rev. Ther. drug Carr. Syst.*, vol. 27, no. 5, 2010.
- [65] A. Ammala, "Biodegradable polymers as encapsulation materials for cosmetics and personal care markets," *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 35, no. 2, pp. 113–124, 2013.
- [66] E. Piskin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 6, no. 9, pp. 775–795, 1995.
- [67] "Skin structure and function." <https://www.abpishools.org.uk/topic/skin-structure-and-function/2> (accessed Jul. 21, 2021).
- [68] P. M. Elias, "Epidermal lipids, barrier function, and desquamation.," *J. Invest.*

- Dermatol.*, vol. 80, 1983.
- [69] C. R. Harding, “The stratum corneum: structure and function in health and disease,” *Dermatol. Ther.*, vol. 17, pp. 6–15, 2004.
- [70] M. Förster, M.-A. Bolzinger, H. Fessi, and S. Briançon, “Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery,” *Eur. J. Dermatology*, vol. 19, no. 4, pp. 309–323, 2009.
- [71] H. R. Moghimi, “Stratum corneum and barrier performance,” *Percutaneous Absorpt.*, 1999.
- [72] I. J. Joye and D. J. McClements, “Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application,” *Curr. Opin. Colloid & Interface Sci.*, vol. 19, no. 5, pp. 417–427, 2014.
- [73] Z. Jia, M.-J. Dumont, and V. Orsat, “Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices,” *Food Biosci.*, vol. 15, pp. 87–104, 2016.
- [74] A. M. Abdul-Fattah, D. S. Kalonia, and M. J. Pikal, “The challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: product quality implications,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 96, no. 8, pp. 1886–1916, 2007.
- [75] S. Shukla, “Freeze drying process: A review,” *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 2, no. 12, p. 3061, 2011.
- [76] L.-T. Lim, A. C. Mendes, and I. S. Chronakis, “Electrospinning and electrospraying technologies for food applications,” *Adv. Food Nutr. Res.*, vol. 88, pp. 167–234, 2019.
- [77] H. Brandenberger, D. Nüssli, V. Piech, and F. Widmer, “Monodisperse particle production: A method to prevent drop coalescence using electrostatic forces,” *J. Electrostat.*, vol. 45, no. 3, pp. 227–238, 1999.
- [78] G. I. Taylor, “The force exerted by an electric field on a long cylindrical conductor,” *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.*, vol. 291, no. 1425, pp. 145–158, 1966.
- [79] A. L. Yarin, S. Koombhongse, and D. H. Reneker, “Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers,” *J. Appl. Phys.*, vol. 90, no. 9, pp. 4836–4846, 2001.
- [80] G. C. Rutledge and S. V. Fridrikh, “Formation of fibers by electrospinning,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 14, pp. 1384–1391, 2007.
- [81] A. Jaworek, “Electrostatic micro- and nanoencapsulation and electroemulsification: a brief review,” *J. Microencapsul.*, vol. 25, no. 7, pp. 443–468, 2008.
- [82] R. P. A. Hartman, D. J. Brunner, D. M. A. Camelot, J. C. M. Marijnissen, and B. Scarlett, “Jet break-up in electrohydrodynamic atomization in the cone-jet mode,” *J. Aerosol Sci.*, vol. 31, no. 1, pp. 65–95, 2000.

- [83] Lord Rayleigh, "XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity," *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.*, vol. 14, no. 87, pp. 184–186, 1882.
- [84] N. Kasoju, H. Ye, Z. Cui, and S. Ramakrishna, "Chapter Thirteen - Electrospinning and electrospraying in biomedical engineering: retrospect and prospects," in *Biomedical Applications of Electrospinning and Electrospraying*, N. Kasoju and H. Ye, Eds. Woodhead Publishing, 2021, pp. 375–393.
- [85] M. Saifullah, M. R. I. Shishir, R. Ferdowsi, M. R. T. Rahman, and Q. Van Vuong, "Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review," *Trends Food Sci. & Technol.*, vol. 86, pp. 230–251, 2019.
- [86] S. L. Shenoy, W. D. Bates, H. L. Frisch, and G. E. Wnek, "Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer-polymer interaction limit," *Polymer (Guildf)*, vol. 46, no. 10, pp. 3372–3384, 2005.
- [87] N. Bock, T. R. Dargaville, and M. A. Woodruff, "Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: state of the art," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 11, pp. 1510–1551, 2012.
- [88] P. Gupta, C. Elkins, T. E. Long, and G. L. Wilkes, "Electrospinning of linear homopolymers of poly (methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent," *Polymer (Guildf)*, vol. 46, no. 13, pp. 4799–4810, 2005.
- [89] C. H. Park and J. Lee, "Electrosprayed polymer particles: effect of the solvent properties," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 114, no. 1, pp. 430–437, 2009.
- [90] N. Bock, M. A. Woodruff, D. W. Hutmacher, and T. R. Dargaville, "Electrospraying, a reproducible method for production of polymeric microspheres for biomedical applications," *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 1, pp. 131–149, 2011.
- [91] M. Enayati, Z. Ahmad, E. Stride, and M. Edirisinghe, "Size mapping of electric field-assisted production of polycaprolactone particles," *J. R. Soc. Interface*, vol. 7, no. suppl_4, pp. S393--S402, 2010.
- [92] A. M. Ganan-Calvo, J. Davila, and A. Barrero, "Current and droplet size in the electrospraying of liquids. Scaling laws," *J. Aerosol Sci.*, vol. 28, no. 2, pp. 249–275, 1997.
- [93] S. Zhang and K. Kawakami, "One-step preparation of chitosan solid nanoparticles by electrospray deposition," *Int. J. Pharm.*, vol. 397, no. 1–2, pp. 211–217, 2010.
- [94] K. V. Iserson, "The origins of the gauge system for medical equipment," *J. Emerg. Med.*, vol. 5, no. 1, pp. 45–48, 1987.
- [95] K. azuo Shiomi, A. Kazama, K. Shimakura, and Y. Nagashima, "Purification and properties of phospholipases A2 from the crown-of-thorns starfish

- (*Acanthaster planci*) venom,” *Toxicon*, vol. 36, no. 4, pp. 589–599, 1998.
- [96] A. N. Sommeng, M. A. B. Tafsi, M. J. Ginting, M. Sahlan, H. Hermansyah, and A. Wijanarko, “Utilization of lionfish (*Pterois volitans*) venomous spines with effective purification as an alternative antiretroviral HIV/AIDS,” in *AIP Conference Proceedings*, 2019, vol. 2193, no. 1, p. 30016.
- [97] Im. K. E. Savitri, R. F. Ibrahim, A. Wijanarko, and others, “Isolation and characterization of phospholipase A2 From the spines venom of the crown-of-thorns starfish isolated from Papua island,” *Int. J. Pharma Bio Sci.*, vol. 3, no. 4, pp. 603–608, 2012.
- [98] I. Karasudani, T. Koyama, S. Nakandakari, and Y. Aniya, “Purification of anticoagulant factor from the spine venom of the crown-of-thorns starfish, *Acanthaster planci*,” *Toxicon*, vol. 34, no. 8, pp. 871–879, 1996.
- [99] T. J. Mason, “Power ultrasound in food processing-the way forward,” *Ultrasound food Process.*, pp. 105–126, 1998.
- [100] P. Piyasena, E. Mohareb, and R. C. McKellar, “Inactivation of microbes using ultrasound: a review,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 87, no. 3, pp. 207–216, 2003.
- [101] S. R. Shirsath, S. H. Sonawane, and P. R. Gogate, “Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status,” *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 53, pp. 10–23, 2012.
- [102] B. K. Tiwari, “Ultrasound: A clean, green extraction technology,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 100–109, 2015.
- [103] C. Domini, L. Vidal, G. Cravotto, and A. Canals, “A simultaneous, direct microwave/ultrasound-assisted digestion procedure for the determination of total Kjeldahl nitrogen,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 16, no. 4, pp. 564–569, 2009.
- [104] “sodium-dodecyl-sulfate-sds-sodium-lauryl-sulfate-sls-molecule-anionic-surfactant-used-cleaning-hygiene-products-image150591303 www.dreamstime.com.” [Online]. Available: <https://www.dreamstime.com/sodium-dodecyl-sulfate-sds-sodium-lauryl-sulfate-sls-molecule-anionic-surfactant-used-cleaning-hygiene-products-image150591303>.
- [105] “Sds-Page @ Ruo.Mbl.Co.Jp.” [Online]. Available: <http://ruo.mbl.co.jp/bio/g/support/method/sds-page.html>.
- [106] M. Chevallet, S. Luche, and T. Rabilloud, “Silver staining of proteins in polyacrylamide gels,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 4, pp. 1852–1858, 2006.
- [107] S. Torres-Giner, A. Martinez-Abad, M. J. Ocio, and J. M. Lagaron, “Stabilization of a nutraceutical omega-3 fatty acid by encapsulation in ultrathin electrosprayed zein prolamine,” *J. Food Sci.*, vol. 75, no. 6, pp. N69--N79, 2010.
- [108] N. Sharif, M. J. Fabra, and A. López-Rubio, “Nanostructures of zein for encapsulation of food ingredients,” *Biopolym. nanostructures food encapsulation Purp.*, pp. 217–245, 2019.

- [109] F. M. Mirabella, *Modern techniques in applied molecular spectroscopy*, vol. 14. John Wiley & Sons, 1998.
- [110] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*. Cengage learning, 2017.
- [111] R. K. Dhaked, M. K. Singh, P. Singh, and P. Gupta, "Botulinum toxin: bioweapon & magic drug," *Indian J. Med. Res.*, vol. 132, no. 5, p. 489, 2010.
- [112] H. Lin *et al.*, "Increased skin permeation efficiency of imperatorin via charged ultradeformable lipid vesicles for transdermal delivery," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, p. 831, 2018.
- [113] P. Morganti *et al.*, "Chitin nanofibrils for biomimetic products: nanoparticles and nanocomposite chitosan films in health care," *Mar. Biomater. Isol. Charact. Appl.*, pp. 681–715, 2013.
- [114] R. Guiné, S. Andrade, and F. Gonçalves, "Physical-chemical properties of *Corema album* (white crowberry or camarinha)," 2015.
- [115] R. Esmaeeli, H. Aliniagerdroudbari, S. R. Hashemi, C. JBR, and S. Farhad, "Designing a new dynamic mechanical analysis (DMA) system for testing viscoelastic materials at high frequencies," *Model. Simul. Eng.*, vol. 2019, 2019.
- [116] C. Ibanescu, M. Danu, A. Nanu, M. Lungu, and B. C. Simionescu, "Stability of disperse systems estimated using rheological oscillatory shear tests," *Rev. Roum. Chim.*, vol. 55, no. 11–12, pp. 933–940, 2010.
- [117] A. E. Ali, M. Gomaa, and H. Othman, "Toxicological studies on pufferfishes, *Lagocephalus sceleratus* and *Amblyrhynchotes hypeslogenion* in Suez Gulf, Red Sea, Egypt," *Egypt. J. Aquat. Res.*, vol. 37, no. 2, pp. 123–130, 2011.
- [118] J. Kong and S. Yu, "Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 39, no. 8, pp. 549–559, 2007.
- [119] S. Ali, Z. Khatri, K. W. Oh, I.-S. Kim, and S. H. Kim, "Zein/cellulose acetate hybrid nanofibers: Electrospinning and characterization," *Macromol. Res.*, vol. 22, no. 9, pp. 971–977, 2014.
- [120] K. Mohomed and D. A. Bohnsack, "Differential Scanning Calorimetry (DSC) as an Analytical Tool in Plastics Failure Analysis," *Am. Lab.*, vol. 45, no. 3, pp. 20–23, 2013.
- [121] H. Madeka and J. L. Kokini, "Effect of glass transition and cross-linking on rheological properties of zein: development of a preliminary state diagram," *Cereal Chem.*, vol. 73, no. 4, pp. 433–438, 1996.
- [122] J. P. Ryman-Rasmussen, J. E. Riviere, and N. A. Monteiro-Riviere, "Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties," *Toxicol. Sci.*, vol. 91, no. 1, pp. 159–165, 2006.
- [123] M. Nasrollahzadeh, S. M. Sajadi, and M. Iqbal, "Basic Chemistry and Biomedical Significance of Nanomaterials," in *Nanomaterials and Plant*

- Potential*, Springer, 2019, pp. 31–70.
- [124] S. Kaul, N. Gulati, D. Verma, S. Mukherjee, and U. Nagaich, “Role of nanotechnology in cosmeceuticals: a review of recent advances,” *J. Pharm.*, vol. 2018, 2018.
- [125] M. Abyadeh, A. A. K. Zarchi, M. A. Faramarzi, and A. Amani, “Evaluation of factors affecting size and size distribution of chitosan-electrosprayed nanoparticles,” *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, vol. 9, no. 3, p. 126, 2017.
- [126] M. A. Busolo, S. Torres-Giner, C. Prieto, and J. M. Lagaron, “Electrospraying assisted by pressurized gas as an innovative high-throughput process for the microencapsulation and stabilization of docosahexaenoic acid-enriched fish oil in zein prolamine,” *Innov. Food Sci. & Emerg. Technol.*, vol. 51, pp. 12–19, 2019.
- [127] H. Lambers, S. Piessens, A. Bloem, H. Pronk, and P. Finkel, “Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora,” *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 28, no. 5, pp. 359–370, 2006.
- [128] K. Kalouta, P. Eleni, C. Boukouvalas, K. Vassilatou, and M. Krokida, “Dynamic mechanical analysis of novel cosmeceutical facial creams containing nano-encapsulated natural plant and fruit extracts,” *J. Cosmet. Dermatol.*, vol. 19, no. 5, pp. 1146–1154, 2020.