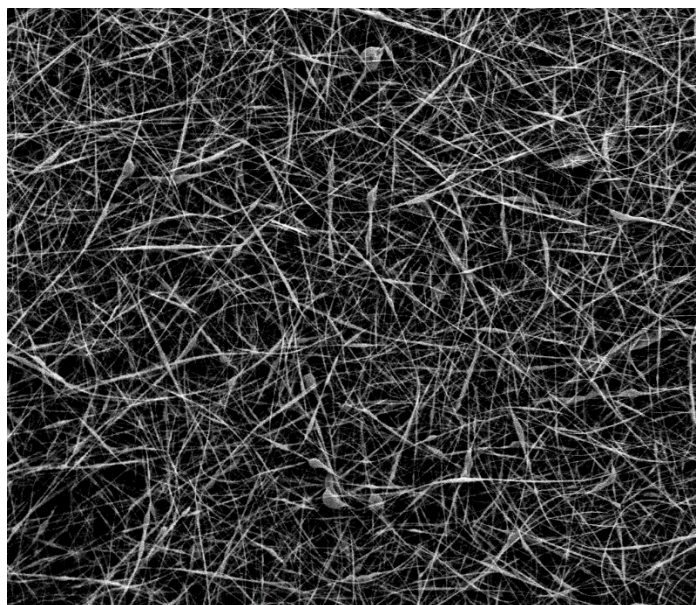




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ II: ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ & ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ & ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

Διπλωματική Εργασία

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΟΣΜΕΤΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ
ΑΠΟΡΡΙΠΤΟΜΕΝΟ ΠΡΟΪΟΝ ΑΛΙΕΙΑΣ LAGOCERHALUS SCCELERATUS**



ΜΕΤΑΪ ΣΙΛΒΙΑ

Υπεύθυνη καθηγήτρια
ΚΡΟΚΙΔΑ Μ.

ΑΘΗΝΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2019

Στους γονείς μου και
στον μικρό Γιαννάκη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στη σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π, στο εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών και στο Οριζόντιο Εργαστήριο Ελέγχου και Ποιότητας, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2018-2019.

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η αξιοποίηση του απορριπτόμενου αλιεύματος *Lagocephalus sceleratus* για την ανάπτυξη καινοτόμων προϊόντων κοσμετολογίας και συγκεκριμένα την παραλαβή των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων, του κολλαγόνου και της τετραδοτοξίνης από τη σάρκα, το δέρμα, τα κόκκαλα και τα εσωτερικά όργανα του εν λόγω ψαριού. Η τετραδοτοξίνη, τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα και το κολλαγόνο παραλήφθηκαν ύστερα από εκχύλιση με κατάλληλους διαλύτες. Κολλαγόνο και ωμέγα-3 λιπαρά οξέα προερχόμενα από ψάρια, εγκλείστηκαν σε πολυμερική μήτρα με τη χρήση της τεχνικής ηλεκτροστατικής ινοποίησης. Οι παράμετροι λειτουργίας της διεργασίας βελτιστοποιήθηκαν σε εργαστηριακή κλίμακα, και τα παραγόμενα προϊόντα αξιολογήθηκαν ως προς τη δομή τους με το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης και με τη Φασματομετρία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier. Ακολούθησε η εφαρμογή των ναοινών σε κρέμες, και η ανάλυση τους προκειμένου να αξιολογηθεί η σταθερότητα των νανοδομών, και οι συνθήκες αποθήκευσης.

Για την αποπεράτωση της εν λόγω διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Καθηγήτρια Μ. Κροκίδα για την καθοδήγησή της, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας, τις χρήσιμες συμβουλές της, καθώς και για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με ένα καινοτόμο θέμα πάνω στην τομέα που με ενδιαφέρει.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω να εκφράσω στον καθηγητή μου και μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής Λέκτορα Φ. Τσόπελα, διότι συνέβαλε ουσιωδώς στην υλοποίηση της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως την Μεταδιδάκτορα Ερευνήτρια κα Παναγιώτα Ελένη (Εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάλυσης Διεργασιών) για το χρόνο που αφιέρωσε, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά καθένα εκ των μελών του Εργαστηρίου, που ήταν πάντα φιλικόι και πρόθυμοι να συνεργαστούν και να με βοηθήσουν σε οτιδήποτε και αν χρειάστηκα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον κύριο Μ. Μανδαλάκη 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.

Καθώς, οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, και στον κύριο Μπατζάκα Ιωάννη από το τμήμα Ωκεανογραφίας και Θαλάσσιων Βιοεπισημών του Πανεπιστημίου Αιγαίου για την αποστολή δείγματος λαγοκέφαλου.

Τελειώνοντας τις σπουδές μου, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου που ήταν πάντα δίπλα μου στηρίζοντας με στις αποφάσεις μου και προσπαθώντας κάθε φορά να μου προσφέρουν όσο το δυνατόν καλύτερα εφόδια για τη μόρφωση μου, αλλά και την αδερφή μου που πάντα με εμπυχώνει και με παρακινεί.

Τέλος, δε θα μπορούσα να μην απευθύνω ξεχωριστές ευχαριστίες στον Πρόεδρο, που από μικρό παιδί προσπαθεί να με στηρίξει με κάθε δυνατό μέσο, ενισχύοντας τη δίψα μου για μόρφωση. Η πάσα ενός τέτοιου γνωστικού και έμπειρου πασαδόρου, δε θα μπορούσε να επιφέρει άλλο αποτέλεσμα πέρα της νίκης.

Σεπτέμβριος 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η αξιοποίηση του απορριπτόμενου αλιεύματος *Lagocephalus sceleratus* (Λαγοκέφαλος) για την ανάπτυξη καινοτόμων προϊόντων κοσμετολογίας. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων, του κολλαγόνου και της τετραδοτοξίνης από τη σάρκα, το δέρμα, τα κόκκαλα και τα εσωτερικά όργανα του ψαριού και στη συνέχεια η ενσωμάτωση των βιοδραστικών συστατικών σε καλλυντικές κρέμες.

Ο Λαγοκέφαλος αν και είναι ένα συχνά απαντώμενο είδος ψαριού στον Ινδικό και στον Ειρηνικό ωκεανό, στη Μεσόγειο έκανε την εμφάνιση του τα τελευταία χρόνια, λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας των υδάτων, έχοντας τόσο κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις όσο και επιπτώσεις στο θαλάσσιο οικοσύστημα. Το πρόβλημα έγκειται στο γεγονός ότι το είδος αυτό του ψαριού φέρει μια θανατηφόρα τοξίνη, την τετραδοτοξίνη, η οποία το καθιστά απαγορευμένο είδος κατανάλωσης υψηλού κινδύνου. Η ραγδαία αύξηση του πληθυσμού του ψαριού στα παράκτια ύδατα, σε συνδυασμό με την μη ύπαρξη θηρευτών, έχει οδηγήσει στη μείωση των κεφαλόποδων με τα οποία κυρίως θρέφεται το ψάρι αυτό, αλλά και στην μείωση άλλων εμπορικά αξιοποιήσιμων ψαριών τα οποία θρέφονται με την ίδια τροφή, επηρεάζοντας το αλίευμα και το εισόδημα των ψαράδων. Επιπλέον, ο λαγοκέφαλος διαθέτει δύο ισχυρά δόντια σε κάθε γνάθο, με τα οποία συχνά επιτίθεται στα δίχτυα των ψαράδων. Μέχρι στιγμής η κύρια μέθοδος για την αντιμετώπιση του λαγοκέφαλου είναι η μίσθωση ψαράδων για τη συλλογή του ψαριού και η μετέπειτα απόρριψη του ως απόβλητο, ωστόσο η μέθοδος αυτή δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματική και επιπλέον δεν συνάδει με τις αρχές της κυκλικής βιοοικονομίας. Μια ενδεχόμενη λύση στο πρόβλημα αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει η αξιοποίηση του ψαριού αυτού για την παραγωγή προϊόντων κοσμετολογίας, αξιοποιώντας τόσο τα πολύτιμα βιοδραστικά συστατικά που περιέχει όσο και την τετραδοτοξίνη.

Η τετραδοτοξίνη (TTX) δρα αναστέλλοντας το μηχανισμό μεταφοράς ιόντων νατρίου, στην αντλία νατρίου-καλίου στα νευρικά και μυϊκά κύτταρα. Μέχρι στιγμής η τοξίνη αυτή έχει βρει εφαρμογή σαν φάρμακο σε ασθενείς που πάσχουν από ημικρανίες, σε ασθενείς εθισμένους σε ηρωίνη και σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο. Στο χώρο της κοσμετολογίας μια πιθανή χρήση της TTX θα μπορούσε να είναι η ανάπτυξη ενέσιμων προϊόντων όπως είναι το Botox, για την αντιμετώπιση της χαλάρωσης του δέρματος.

Τα ψάρια αποτελούν πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), δηλαδή, λιπαρών οξέων που έχουν δύο οι περισσότερους διπλούς δεσμούς, που καλούνται ως ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα. Τα ιχθυέλαια που είναι πλούσια σε PUFAs φαίνεται να έχουν σημαντικά οφέλη για την υγεία, με κυρίαρχα τα DHA και EPA. Ιδιαίτερα τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν ευεργετικές ιδιότητες για την επιδερμίδα, προστατεύοντας την από τη φωτογήρανση, τη δερματική καρκινογένεση, τη δερματίτιδα και επίσης δρουν θετικά στην επούλωση πληγών του δέρματος.

Το κολλαγόνο είναι η κύρια πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού στα ζώα και η πλέον άφθονη πρωτεΐνη στα θηλαστικά. Αν και κύρια πηγή κολλαγόνου αποτελούσαν συνήθως δέρματα βοοειδών και χοίρων, τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον στρέφεται στα θαλάσσια είδη, λόγω της εμφάνισης ορισμένων μεταδοτικών ασθενειών και θρησκευτικών ζητημάτων. Το κολλαγόνο έχει την ικανότητα να επιβραδύνει τη δημιουργία των ελεύθερων ριζών προστατεύοντας από τη γήρανση του δέρματος, καθώς και να ενισχύει την επιδιόρθωση και την αναγέννηση του δέρματος.

Προκειμένου, να καλυφθεί η δυσάρεστη οσμή των χρησιμοποιούμενων από ψάρια λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου, καθώς και για να προστατευθούν από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, κρίνεται σκόπιμος ο εγκλεισμός των ουσιών αυτών σε πολυμερικές μήτρες. Αυτό επιτυγχάνεται με τη τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην επίδραση ηλεκτρικού πεδίου υψηλής τάσης, η οποία δημιουργεί ένα ηλεκτρικά φορτισμένο πίδακα (jet) από πολυμερές διάλυμα, σχηματίζοντας τον κώνο Taylor στον πίδακα, με αποτέλεσμα την ξήρανση του διαλύτη και την παραγωγή ινών.

Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε αρχικά, παραλαβή της TTX τόσο από τη σάρκα του *L.sceleratus* όσο και από τα εσωτερικά του όργανα με σκοπό αρχικά την διερεύνηση της περιεκτικότητας του εν λόγω ψαριού σε αυτήν καθώς και την αποτοξίνωσή του για την μετέπειτα αξιοποίησή του και την παραλαβή των βιοδραστικών συστατικών (BS) του. Η παραλαβή της τοξίνης

πραγματοποιήθηκε με χρήση δύο διαλυτών, (α) υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1% και (β) διαλύματος οξικού οξέος 1% σε μεθανόλη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αποτελεσματικότερος διαλύτης για την απομόνωση της *TTX* είναι το διάλυμα οξικού οξέος 1% σε μεθανόλη, ενώ μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε *TTX* βρέθηκε, και με τους δύο διαλύτες, στα εσωτερικά όργανα του λαγοκέφαλου, 14.1 μg *TTX*/g ιστού (εκχύλιση με τον αποτελεσματικότερο διαλύτη) έναντι της σάρκας 1.77μg *TTX*/g ιστού (εκχύλιση με τον αποτελεσματικότερο διαλύτη).

Έπειτα πραγματοποιήθηκε παραλαβή των ω-3 λιπαρών οξέων από τον *L. Sceleratus*, τόσο από τη σάρκα όσο και από το δέρμα με χρήση διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης μέσω της μεθόδου *Bligh and dyer* αλλά και μέσω των εναλλακτικών διαλυτών εξανίου-ισοπροπανόλης. Οι εναλλακτικοί διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν και για την εκχύλιση λιπαρών οξέων από το σολομό προκειμένου να είναι εφικτή η σύγκριση της παραγόμενης ποσότητας ω-3 λιπαρών οξέων του λαγοκέφαλου με ένα γνωστό λιπαρό ψάρι. Τα αποτελέσματα της εκχύλισης έδειξαν ότι αποτελεσματικότερος διαλύτης εκχύλισης για τον *L. Sceleratus* είναι το μίγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης, καθώς έγινε εφικτή η παραλαβή ποσότητας 7.6 mg ελαίου/g ιστού, έναντι 6.2 mg ελαίου/g ιστού με τους εναλλακτικούς διαλύτες. Επιπλέον, αν και από το σολομό εκχυλίστηκε μεγαλύτερη ποσότητα ελαίου ο λαγοκέφαλος εμφάνιζε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε *DHA* 39.92% έναντι 17.22% του σολομού, που είναι το κύριο χρησιμοποιούμενο λιπαρό οξύ στην κοσμετολογία. Έγινε επίσης σύγκριση της ποσότητας λιπαρών οξέων του λαγοκέφαλου στη σάρκα και στο δέρμα, και βρέθηκε ότι από το δέρμα απομονώνεται μεγαλύτερη ποσότητα ιχθυελαίου.

Το κολλαγόνο παραλήφθηκε, τόσο από το δέρμα και τα κόκαλα του λαγοκέφαλου, όσο και του σολομού, με τη χρήση δύο μεθόδων *Acid Soluble Collagen (ASC)* και *Pepsin Soluble Collagen (PSC)*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος *PSC* είναι πιο αποτελεσματική για την εκχύλιση του κολλαγόνου συγκριτικά με τη μέθοδο *ASC*, καθώς απομονώθηκε 45% μεγαλύτερη ποσότητα κολλαγόνου σε σχέση με τη μέθοδο *ASC*. Ενώ επιπλέον, ο λαγοκέφαλος εμφανίζεται να έχει μεγαλύτερη ποσότητα κολλαγόνου συγκριτικά με το σολομό. Τέλος, μεγαλύτερη ποσότητα κολλαγόνου εμφανίζεται να έχει το δέρμα (83.37mg κολλαγόνου/g ιστού) του *L. sceleratus* σε σχέση με τα κόκαλα (57.48 mg κολλαγόνου/g ιστού).

Την παραλαβή των *BΣ* ακολούθησε η ενθυλάκωση κολλαγόνου και ωμέγα-3 λιπαρών οξέων ψαριών σε μήτρα κυκλοδεξτρίνης, με τη τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης (*electrospinning*). Για το σκοπό αυτό εξετάστηκαν οι συνθήκες λειτουργίας του *electrospinning* καθώς και της συγκέντρωσης της κάθε βιοδραστικής ουσίας στη κυκλοδεξτρίνη. Οι συνθήκες που τελικά χρησιμοποιήθηκαν ήταν: Ροή= 1000 μL/h, Τάση=27 kV και Απόσταση= 13 cm ενώ η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 7% σε ω-3 λιπαρά οξέα και 3% σε κολλαγόνο. Ύστερα από την συλλογή επαρκούς ποσότητας νανοϊνών προσδιορίστηκε η απόδοση εγκλεισμού σε 91% και 89% για τα λιπαρά οξέα και το κολλαγόνο αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η αξιολόγηση με χρήση SEM και FTIR, επιβεβαίωσαν την επιθυμητή δομή των νανοϊνών καθώς και τον εγκλεισμό των ουσιών.

Οι νανοϊνες με το εγκλεισμένο προϊόν ενσωματώθηκαν στην κρέμα βάση σε περιεκτικότητα 1% (σε *BΣ*), και έγινε η σύγκριση του προϊόντος αυτού, τόσο με τη κρέμα βάση όσο και με κρέμα που περιείχε σε περιεκτικότητα 1% τις μη εγκλεισμένα *BΣ*. Στη συνέχεια, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες (5°C, 25°C και 45°C) για συνολικό διάστημα 50 ημερών και πραγματοποιούνταν έλεγχοι σε διαφορετικούς χρόνους (t=0, t=30days και t=50days). Τα δείγματα σε όλες τις θερμοκρασίες και τους χρόνους εξέτασης, αναλύθηκαν μικροβιολογικά ως προς το ολικό μικροβιακό φορτίο, τις ζύμες/μούχλες και το *E.coli* και βρέθηκαν μικροβιακά σταθερές. Επιπλέον, μετρήθηκε το *pH* σε κάθε εξεταζόμενο δείγμα, που κυμαίνονταν από 5.75-6.51, τιμές αποδεκτές δεδομένου ότι το *pH* του δέρματος παρουσιάζει εύρος 5.4-5.9. Όσον αφορά στο χρώμα, η εξέταση των δειγμάτων έδειξε ότι σε θερμοκρασίες 5°C και 25°C η συνολική μεταβολή του χρώματος του δείγματος για το εγκλεισμένο προϊόν δεν έχει μεγάλη απόκλιση από αυτήν της κρέμας βάσης, γεγονός που δεν παρατηρείται για τη κρέμα με τα μη εγκλεισμένα προϊόντα. Τέλος, η Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (*DMA*) έδειξε ότι τα δείγματα παρουσιάζουν κατάλληλη συνεκτικότητα για πρακτική εφαρμογή, ενώ η εισαγωγή εγκλεισμένων και μη βιοδραστικών ουσιών στη κρέμα βάση είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του σύνθετου ιξώδους της κρέμας.

ABSTRACT

In the present diploma thesis, the exploitation of fishery waste *Lagocephalus sceleratus* was studied in order to develop innovative cosmetic products. In particular, omega-3 fatty acids, collagen and tetrodotoxin were extracted from the flesh, skin, bones and internal organs of *lagocephalus*. Subsequently, the latter bioactive compounds were included in cosmetic creams.

Despite the fact that *lagocephalus* exist in large populations in Indian and Pacific Ocean, it appeared in Mediterranean Sea during the last years, due to water heating. The population growth of these species induces negative effects both in socioeconomic aspects and in marine ecosystem. These fish species carry a lethal toxin, tetrodotoxin, due to which a high risk prohibition is placed on the consumption of this kind of fish. The rapid growth population of *lagocephalus* in coastal waters, in combination with the absence of predators, has led to the reduction of the fish's preys, such as cephalopods. As a result, the fish's competitors for food -which are commercially exploitable- also decline, affecting the fishery and income of fishermen. Moreover, *lagocephalus* possesses two potent teeth in each jaw, which are used to attack and rip fisherman's nets. Until today, the main method of tackling with *lagocephalus* is fishermen's hire to collect these fishes and discard them. This method doesn't seem to be effective, because it doesn't consort with circular economy. Isolation of precious bioactive compounds and tetrodotoxin and their incorporation in cosmetic products could be a possible solution.

Tetrodotoxin (*TTX*) acts by inhibiting the mechanism of sodium ion transport in the sodium-potassium pump in nerve and muscle cells. So far, this toxin has been used as a drug in patients with migraine headaches, heroin addiction and cancer. In the field of cosmetics, one possible use of *TTX* could be the development of injectable products such as Botox, to treat skin relaxation.

Fish are a source of polyunsaturated fatty acids (*PUFAs*), viz fatty acids having at least two double bonds, which are called omega-3 and omega-6 fatty acids. Fish oils rich in *PUFAs* appear to have significant health benefits, especially, *DHA* and *EPA*. Particularly, omega-3 fatty acids have beneficial properties for skin, protecting it from photo-aging process, skin carcinogenesis, dermatitis and also reveal a positive effect on the healing of skin wounds.

Collagen is the major connective tissue protein in animals and the most abundant protein in mammals. Although the main source of collagen was usually bovine and porcine skins, in recent years the interest has shifted to marine species, due to the emergence of certain contagious diseases and religious issues. Collagen has the ability to slow down the formation of free radicals by preventing skin aging, as well as fortifying skin repair and regeneration.

In order to cover the unpleasant odor of fish origin fatty acids and collagen and to protect them from adverse environmental conditions, their encapsulation in polymeric matrices is necessary. For the encapsulation electrospinning technique was applied. This technique based on the application of a high-voltage electric field, which creates a jet of charged polymer, forming the Taylor cone on the jet, thereby drying the solvent and producing fiber.

Initially, *TTX* was obtained both from flesh of *L. Sceleratus* and from its internal organs, in order to determine their *TTX* content and detoxifying it for the subsequent recovery and collection of its bioactive constituents (*BACs*). The toxin was obtained using two solvents, (a) 0.1% aqueous acetic acid solution and (b) 1% acetic acid solution in methanol. The results showed that the most effective solvent for the isolation of *TTX* was the 1% acetic acid solution in methanol. Furthermore, a higher content of *TTX* was found -with both solvents- in the internal organs of the *lagocephalus*, namely 14.1 $\mu\text{g TTX/g}$ tissue (extraction with most effective solvent) vs. 1.77 $\mu\text{g TTX g}$ flesh (extraction with most effective solvent).

Subsequently, omega-3 fatty acids were recovered from *L. Sceleratus*, both from flesh and skin, using chloroform-methanol solvents according to *Bligh and Dyer* method, but also by alternative hexane-isopropanol solvents. Alternative solvents were also used to extract fatty acids from salmon, in order to compare the amount of omega-3 fatty acids isolated by *lagocephalus* with the equivalent of a well-known fatty fish. The results of the extraction showed that the most effective extraction solvent for *L.*

Sceleratus was the chloroform-methanol mixture, as 7.6 mg oil/g of tissue were obtained, compared to 6.2 mg oil/g of tissue with the alternative solvents. Although, a larger amount of oil was extracted from salmon, lagocephalus had a higher *DHA* (the main fatty acid used in cosmetology) content of 39.92% compared to 17.22% of salmon. The amount of fatty acids in the flesh and skin of lagocephalus was also compared and it was revealed that a larger amount of fish oil was extracted from the skin.

Collagen was obtained from both the skin and bones of the lagocephalus and salmon, using the methods of *Acid Soluble Collagen (ASC)* and *Pepsin Soluble Collagen (PSC)*. The results showed that the *PSC* method was more effective for collagen extraction than the *ASC* method, because 45% more collagen was isolated by the *PSC* method. In addition, lagocephalus proved to have a higher amount of collagen than salmon. Finally, fish's skin contained a higher amount of collagen (83.37 mg collagen/g of tissue) than bones (57.48 mg collagen/g of tissue). The extraction of *BACs* was followed by the encapsulation of collagen and omega-3 fatty acids in a cyclodextrin matrix, via electrospinning technique. For this purpose, the operating conditions of electrospinning as well as the concentration of each *BAC* in cyclodextrin were examined. The conditions finally applied are: Flow = 1000 $\mu\text{L}/\text{h}$, Voltage = 27 kV and Distance = 13 cm, while the concentration of the solution was 7% in omega-3 fatty acids and 3% in collagen. After collecting a sufficient amount of nano fibers, the encapsulation yield was calculated equal to 91% and 89% for fatty acids and collagen, respectively. Moreover, the evaluation of the produced encapsulated structures through *SEM* and *FTIR* techniques confirmed the desired structure of nanofibers as well as the successful encapsulation of *BACs*.

The encapsulated nanofibers were incorporated into the basic cream at 1% content (*BACs*) and this product was compared with both the basic cream and the cream containing 1% of non-encapsulated *BACs*. All samples were then stored at different temperatures (5°C, 25°C and 45°C) for a total of 50 days and tests were performed at different times (t=0, t=30days and t=50days). Samples from each temperature and test time were microbiologically analyzed for total microbial load, yeasts/molds and *E. coli*. Every sample was proved microbiologically stable. Furthermore, *pH* of each sample was measured, and ranged from 5.75 to 6.51, thus all *pH* values were acceptable and neutral, as the skin *pH* ranges from 5.4 to 5.9. Regarding color, examination of the samples showed that, at temperatures of 5 °C and 25 °C, the overall color change of the sample with the encapsulated *BACs* did not differ significantly from basic cream, contrary to the cream with the non-encapsulated *BACs*. Finally, Dynamic Mechanical Analysis (*DMA*) showed that the samples exhibited appropriate consistency for practical application, whereas the incorporation of encapsulated or non-encapsulated *BACs* to basic cream resulted in a reduction in the composite viscosity of the cream.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	I
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	III
ABSTRACT	V
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	VII
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	IX
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	XI
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	XIII
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Αντικείμενο και στόχοι.....	1
1.2 Τοποθέτηση της διπλωματικής εργασίας-Μεθοδολογική προσέγγιση	1
1.3 Επιμέρους στόχοι-Αναμενόμενη συνεισφορά	1
1.4 Διάρθρωση	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	3
2.1 Χαρακτηριστικά του <i>L. Sceleratus</i>	3
2.1.1 Μορφολογία	3
2.1.2 Σύσταση	4
2.1.2.1 Τετραδοτοξίνη	4
2.1.2.2 Λιπίδια	8
2.1.2.3 Κολλαγόνο	12
2.1.3 Καλλυντικές και θεραπευτικές εφαρμογές συστατικών <i>L. Sceleratus</i>	15
2.1.3.1 Τετραδοτοξίνη	15
2.1.3.2 Λιπαρά Οξέα.....	15
2.1.3.3 Κολλαγόνο	16
2.2 Εγκλεισμός βιοδραστικών ουσιών	17
2.2.1 Εφαρμογές εγκλεισμού.....	17
2.2.1.1 Βιομηχανία των καλλυντικών.....	18
2.2.1.2 Φαρμακευτική Βιομηχανία	20
2.2.1.3 Βιομηχανία των τροφίμων	21
2.2.2 Μέθοδοι εγκλεισμού	21
2.2.2.1 Εκβολή.....	22
2.2.2.2 Γαλακτωματοποίηση	22
2.2.2.3 Ξήρανση με ψεκασμό.....	22
2.2.2.4 Ξήρανση υπό κατάψυξη.....	22
2.2.2.5 Ηλεκτροστατική ινοποίηση και ψεκασμός (electrospinning και electrospraying)	22
2.3 Σύγχρονες τάσεις στα καλλυντικά.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	29
3.1 Υλικά.....	29
3.1.1 Απομόνωση τετραδοτοξίνης από τον μυϊκό ιστό και τα εσωτερικά όργανα του ψαριού <i>Lagocephalus sceleratus</i>	29
3.1.2 Απομόνωση λιπαρών οξέων από το ψάρι <i>Lagocephalus sceleratus</i> και από το σολομό.....	29
3.1.3 Απομόνωση κολλαγόνου από το ψάρι <i>Lagocephalus sceleratus</i> και από το σολωμό	29
3.1.4 Εγκλεισμός των ω-3 λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου	30
3.1.5 Χαρακτηρισμός τελικών προϊόντων εγκλεισμού	31
3.1.6 Ανάπτυξη καλλυντικών κρεμών και μικροβιολογική ανάλυση	31

3.2	Μέθοδοι-Όργανα και Συσκευές	32
3.2.1	Παραλαβή τετραδοτοξίνης από τον μυϊκό ιστό και τα εσωτερικά όργανα του ψαριού <i>Lagocephalus sceleratus</i>	33
3.2.2	Παραλαβή λιπαρών οξέων από το ψάρι <i>Lagocephalus sceleratus</i> και από το σολωμό.	34
3.2.3	Παραλαβή κολλαγόνου από το ψάρι <i>Lagocephalus sceleratus</i> και από το σολωμό.....	39
3.2.4	Εγκλεισμός των ω-3 λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου μέσω ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning)	44
3.2.5	Χαρακτηρισμός τελικών προϊόντων εγκλεισμού	49
3.2.5.1	Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού.....	49
3.2.5.2	Υπόλοιπες τεχνικές (SEM, ATR-FTIR)	50
3.2.6	Ανάπτυξη καλλυντικών κρεμών και μικροβιολογική ανάλυση	53
3.2.6.1	Ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών και προετοιμασία δειγμάτων.....	53
3.2.6.2	Μικροβιολογική ανάλυση κρεμών.....	54
3.2.6.3	Μέτρηση pH	56
3.2.6.4	Μέτρηση του χρώματος.....	57
3.2.6.5	Δυναμική μηχανική ανάλυση (Dynamic Mechanical Analysis –DMA)	58
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		61
4.1	Προσδιορισμός Τετραδοτοξίνης (ΤΤΧ) στα δείγματα <i>L. Sceleratus</i>	61
4.2	Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων από τον <i>L. Sceleratus</i> και το σολωμό.	62
4.3	Προσδιορισμός της ποσότητας κολλαγόνου του <i>L.sceleratus</i> και του σολωμού.	66
4.4	Χαρακτηρισμός τελικών προϊόντων εγκλεισμού.	68
4.4.1	Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού	68
4.4.2	Υπόλοιπες τεχνικές (SEM, ATR-FTIR).....	70
4.4.2.1	Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscopy-SEM).....	70
4.4.2.2	Φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infared Spectroscopy-FTIR)	72
4.5	Χαρακτηρισμός καλλυντικών κρεμών	73
4.5.1	Μικροβιολογική ανάλυση κρεμών	73
4.5.2	Μέτρηση pH	74
4.5.3	Μέτρηση χρώματος	76
4.5.4	Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (Dynamic Mechanical Analysis-DMA)	80
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ		91
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		93

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Σύγκριση διαλυτών εκχύλισης της ΤΤΧ από τη σάρκα και τα όργανα του ψαριού.	61
Διάγραμμα 2: Σύγκριση της συγκέντρωσης της ΤΤΧ μεταξύ της σάρκας και των εσωτερικών οργάνων του λαγοκέφαλου με χρήση των δύο διαλυτών.	62
Διάγραμμα 3: Αποτελέσματα GC-MS για την εκχύλιση της σάρκας του σολομού με διάλυμα εξανίου-ισοπροπανόλης (Δείγμα 1).	64
Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα GC-MS για την εκχύλιση της σάρκας του L.scleratus με διάλυμα εξανίου-ισοπροπανόλης (Δείγμα 2).	65
Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα GC-MS για την εκχύλιση της σάρκας του L.scleratus με διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης (Δείγμα 3).	65
Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα GC-MS για την εκχύλιση του δέρματος του L.scleratus με διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης (Δείγμα 4).	65
Διάγραμμα 7: Καμπύλη αναφοράς για το κολλαγόνο.	66
Διάγραμμα 8: Σύγκριση ποσότητας κολλαγόνου ανά μονάδα μάζας ιστού για τα δύο είδη ψαριών, L.scleratus-σολομό.	67
Διάγραμμα 9: Αποτελέσματα GC-MS για τη μέτρηση της απόδοσης εγκλεισμού των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων.	69
Διάγραμμα 10: Φασματογράφημα ATR-FTIR για την ταυτοποίηση του εγκλεισμού των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου σε διάλυμα κυκλοδεξτρίνης μέσω της ηλεκτροστατικής ιονοποίησης.	72
Διάγραμμα 11: pH των τριών δειγμάτων C, NE, E συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης στους 5°C.	74
Διάγραμμα 12: pH των τριών δειγμάτων C, NE, E συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης στους 25°C.	75
Διάγραμμα 13: pH των τριών δειγμάτων C, NE, E συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης στους 45°C.	75
Διάγραμμα 14: Μεταβολή της παραμέτρου L^* σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5°C, 25°C και 45°C.	76
Διάγραμμα 15: Μεταβολή της παραμέτρου a^* σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5°C, 25°C και 45°C.	77
Διάγραμμα 16: Μεταβολή της παραμέτρου b^* σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5°C, 25°C και 45°C.	78
Διάγραμμα 17: Συνολική μεταβολή χρώματος ΔE σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5°C, 25°C και 45°C.	79
Διάγραμμα 18: Μέτρο αποθήκευσης (G'), Μέτρο απώλειας(G'') και σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της γωνιακής συχνότητας, για την κρέμα βάσης (C) τη χρονική στιγμή $t=0$	80
Διάγραμμα 19: Μέτρο αποθήκευσης (G'), Μέτρο απώλειας(G'') και σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της γωνιακής συχνότητας, για την κρέμα με τις μη εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες (NE) τη χρονική στιγμή $t=0$	80
Διάγραμμα 20: Μέτρο αποθήκευσης (G'), Μέτρο απώλειας(G'') και σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της γωνιακής συχνότητας, για την κρέμα με τις εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες (E) τη χρονική στιγμή $t=0$	81
Διάγραμμα 21: Σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για την κρέμα βάση (C) σε διάφορους χρόνους και θερμοκρασίες.	84
Διάγραμμα 22: Σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για την κρέμα με τις μη εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες (NE) σε διάφορους χρόνους και θερμοκρασίες.	85
Διάγραμμα 23: Σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για την κρέμα με τις εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες(E) σε διάφορους χρόνους και θερμοκρασίες.	86
Διάγραμμα 24: Σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για την κρέμα βάση (C) σε χρόνο αποθήκευσης 30 ημερών (πάνω) και 50 ημερών (κάτω) στις διαφορετικές θερμοκρασίες.	87
Διάγραμμα 25: Σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για την κρέμα με τις μη εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες(NE) σε χρόνο αποθήκευσης 30 ημερών (πάνω) και 50 ημερών (κάτω) στις διαφορετικές θερμοκρασίες.	88
Διάγραμμα 26: Σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για την κρέμα με τις εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες (E) σε χρόνο αποθήκευσης 30 ημερών (πάνω) και 50 ημερών (κάτω) στις διαφορετικές θερμοκρασίες.	89
Διάγραμμα 27: Σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για τα τρία δείγματα C, NE, E στους 25°C για χρόνος $t=0$, $t=30days$ και $t=50days$	90

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Οι κύριοι βαθμοί τετραδοτοξικότητας και τα σχετικά συμπτώματα.....	6
Πίνακας 2: Ποσοστιαία αναλογία λιπαρών οξέων σε ιχθυέλαια.[12, 14]	10
Πίνακας 3: Κύρια λιπαρά οξέα που απαντώνται στα ιχθυέλαια.....	11
Πίνακας 4: Τα είδη κολλαγόνου και η κατανομή τους στους ιστούς.....	14
Πίνακας 5: Αραιώσεις του διαλύματος του πρότυπου κολλαγόνου για τη κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.	40
Πίνακας 6: Συνθήκες λειτουργίας electrospinning για διάλυμα κυκλοκλοδεξτρίνης στο οποίο έχουν διαλυθεί 1g ω-3 λιπαρών οξέων και 1g κολλαγόνου.....	46
Πίνακας 7: Συνθήκες λειτουργίας electrospinning για διάλυμα κυκλοκλοδεξτρίνης στο οποίο έχουν διαλυθεί 0.5 g ω-3 λιπαρών οξέων και 0.5 g κολλαγόνου.....	47
Πίνακας 8: Συνθήκες λειτουργίας electrospinning για διάλυμα κυκλοκλοδεξτρίνης στο οποίο έχουν διαλυθεί 0.7 g ω-3 λιπαρών οξέων και 0.3 g κολλαγόνου.....	48
Πίνακας 9: Κωδικοί δειγμάτων κρέμας.....	54
Πίνακας 10: Συγκέντρωση ΤΤΧ στα εξεταζόμενα δείγματα λαγοκέφαλου.....	61
Πίνακας 11: Ποσότητα παραγόμενων ελαίων από τα Δείγματα 1-4.....	62
Πίνακας 12: Αποτελέσματα GC-MS για τα εκχυλίσματα λιπαρών που εξήχθησαν από τη σάρκα και το δέρμα του <i>L.scleratus</i> και από τη σάρκα του σολομού με τους δύο διαλύτες.....	63
Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις και ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) στα δείγματα του σολομού και του <i>L.scleratus</i> που εκχυλίστηκαν με τα δύο είδη διαλυτών.....	63
Πίνακας 14: Συνολική ποσότητα PUFAs ανά μονάδα μάζας ιχθυελαίου για κάθε δείγμα.....	64
Πίνακας 15: Ποσοστιαία αναλογία λιπαρών οξέων στα παραγόμενα ιχθυέλαια από το σολομό και τον <i>L.scleratus</i> που εκχυλίστηκαν με τα δύο είδη διαλυτών.....	64
Πίνακας 16: Δεδομένα απορρόφησης για τις διάφορες αραιώσεις του διαλύματος πρότυπου κολλαγόνου .	66
Πίνακας 17: Μετρήσεις φωτομέτρησης για τα Δείγματα Α-ΣΤ.....	67
Πίνακας 18: Προσδιορισμός της ποσότητας του κολλαγόνου στα εξεταζόμενα δείγματα.....	67
Πίνακας 19: Ποσότητα κολλαγόνου των παραγόμενων στο electrospinning νανοϊνών.....	68
Πίνακας 20: Αποτελέσματα GC-MS για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλεισμού των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων.	68
Πίνακας 21: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης κρεμών αποθηκευμένων στους 5°C, στους 25°C και στους 45°C για διάστημα t=30days.....	73
Πίνακας 22: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης κρεμών αποθηκευμένων στους 5°C, στους 25°C και στους 45°C για διάστημα t=50days.....	73
Πίνακας 23: Μετρήσεις pH σε χρόνους t=0, t=30days και t=50days και θερμοκρασίες 5°C, 25°C και 45°C.	74
Πίνακας 24: Τιμές του Μέτρου Αποθήκευσης και του Μέτρου Απώλειας των δειγμάτων C, NE, E για γωνιακή συχνότητα $\omega=0.1\text{rad/s}$, σε χρόνους t=0, t=30days, t=50days και θερμοκρασίες 5°C, 25°C, 45°C.....	82

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Απεικόνιση της μορφής του <i>L. Sceleratus</i> και των ισχυρών δοντιών της άνω και κάτω γνάθου από όπου έχει πάρει το γένος Tetraodontidae το όνομα του.	4
Εικόνα 2: Απουσία των πλευρών και των επίπλευρων, που δίνει τη δυνατότητα στον <i>L. Sceleratus</i> να φουσκώνει το σώμα του απορροφώντας αέρα ή νερό όταν διαισθάνεται κίνδυνο.	4
Εικόνα 3: Αντλία Νατρίου-Καλίου που χρησιμοποιεί το ATP για να μεταφέρει τα ιόντα νατρίου έξω από το κύτταρο [7].	5
Εικόνα 4: Απεικόνιση της δομής της τετραδοτοξίνης.	8
Εικόνα 5: Μεταβολικό μονοπάτι για την παραγωγή EPA, DHA και DPA.	12
Εικόνα 6: Μοριακή δομή των ινιδίων του κολλαγόνου (τύπος I κολλαγόνου), που παρουσιάζει τη τριπλή έλικα και τις τερματικές περιοχές N-, C-.	13
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της α-, β-, γ- κυκλοδεξτρίνης.	19
Εικόνα 8: Υδροφобыες και πολικές περιοχές των κυκλοδεξτρίνων.	20
Εικόνα 9: Κάθετη διάταξη της ηλεκτροστατικής ινοποίησης.	24
Εικόνα 10: Οριζόντια διάταξη της ηλεκτροστατικής ινοποίησης.	24
Εικόνα 11: Εσωτερικά όργανα <i>L. sceleratus</i> (πάνω αριστερά: έντερα, πάνω δεξιά: ωθήκες, κάτω: νεφρός και χολή)	29
Εικόνα 12: Πρότυπο κολλαγόνο από δέρμα μόσχου.	30
Εικόνα 13: Διάλυμα οξικού οξέος 0,05M, Διάλυμα A, Διάλυμα B και αραιωμένο διάλυμα Follin-Ciocalteu.	30
Εικόνα 14: Σκόνη ω-3 λιπαρού οξέος (DHA) και σκόνη κολλαγόνου από ψάρια.	31
Εικόνα 15: Υδατικό διάλυμα β-κυκλοδεξτρίνης.	31
Εικόνα 16: Διάγραμμα πειραματικής διαδικασίας.	32
Εικόνα 17: Ομογενοποιητής (BagMixer, Interscience)	33
Εικόνα 18: Συσκευή υπερήχων (Dentsply Neytech Ultrasonik 28H)	33
Εικόνα 19: Φυγόκεντρος (ROTOFIX 32A-Hettich)	34
Εικόνα 20: Μαγνητικός Αναδευτήρας (SELECTA MULTIMATIC-5N)	35
Εικόνα 21: Διάταξη διαχωρισμού.	35
Εικόνα 22: Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας (BUCHI Rotavapor R-200) συζευγμένος με αντλία κενού (BUCHI Vacuum Controller V-800).	36
Εικόνα 23: Διάταξη ανάδευσης Vortex (VORTEX-GENIE 2).	37
Εικόνα 24: Σχηματισμός δύο φάσεων στα δείγματα λιπιδίων που απομονώθηκαν από τον <i>L. sceleratus</i> και από τον σολομό, ύστερα από την κατεργασία τους για το σχηματισμό των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων. ...	38
Εικόνα 25: Αέριος χρωματογράφος (GAS CHROMATOGRAPH SHIMADZU GC-17A).	38
Εικόνα 26: Εκχύλιση με εξάνιο για την παραλαβή των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAMES) από τα δείγματα λιπιδίων που προήλθαν από την επεξεργασία του <i>L. sceleratus</i> και του σολομού.	39
Εικόνα 27: Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 4 δεκαδικών (KERN ABS 220).	39
Εικόνα 28: Πάνω: Αυτόματη πιπέτα των 10-100μL, Κάτω: Αυτόματη πιπέτα των 100-1000μL.	40
Εικόνα 29: Υδατόλουτρο (Selecta Agibat 20)	41
Εικόνα 30: Φωτόμετρο (UV-VIS SPECTROPHOTOMETER, UV-M51, BEL PHOTONICS).	41
Εικόνα 31: Κατεργασμένα διαλύματα πρότυπου κολλαγόνου σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.05M με κατάλληλους διαλύτες για την χάραξη καμπύλης αναφοράς.	42
Εικόνα 32: Κατεργασία δειγμάτων A, Γ με τη μέθοδο ASC και των δειγμάτων B, Δ, E, ΣΤ με τη μέθοδο PSC.	43
Εικόνα 33: (Φυγόκεντρος NÜVE NF 400 Centrifuge)	43
Εικόνα 34: Η διάταξη στο electrospinning (BioInicia FLUIDNATEK LE-10) σε λειτουργία με το διάλυμα κυκλοδεξτρίνης.	45
Εικόνα 35: Διάταξη electrospinning (BioInicia FLUIDNATEK LE-10).	45
Εικόνα 36: Προσδιορισμός ολικού κολλαγόνου στο προϊόν εγκλεισμού.	50
Εικόνα 37: Αριστερά: Συσκευή επιχρύσωσης (SC7620 Mini Sputter Coater, Quorum Technologies), Δεξιά: Συλλογή δείγματος στο αλουμινοχαρτό πάνω στο οποίο έχουν τοποθετηθεί δειγματοφορείς.	51
Εικόνα 38: Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (FEI Quanta 200 SEM).	52
Εικόνα 39: Φασματομέτρο υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier (JASCO FT/IR-4200).	53
Εικόνα 40: Αριστερά: Νανοΐνες DHA και κολλαγόνου σε κυκλοδεξτρίνη Δεξιά: Χρησιμοποιούμενη κρέμα βάση.	53
Εικόνα 41: Παρασκευή δειγμάτων κρεμών C, NE, E για μελέτη της σταθερότητας τους με το χρόνο σε διαφορετικές θερμοκρασίες.	54
Εικόνα 42: Απαγωγός μικροβιολογίας (NÜVE MN 090 Microbiological Safety Cabinet).	55

Εικόνα 43: Τρυβλίο προσδιορισμού ολικού μικροβιακού φορτίου(Compact Dry TC, Hyserve GmbH&Co.KG, Uffing, Germany).	55
Εικόνα 44: Τρυβλίο προσδιορισμού ζυμών και μούχλας(Compact Dry YMR, Hyserve GmbH&Co.KG, Uffing, Germany).	56
Εικόνα 45: Τρυβλίο προσδιορισμού Escherichia coli (Compact Dry EC, Hyserve GmbH&Co.KG, Uffing, Germany).	56
Εικόνα 46: Ηλεκτρονικό πεχάμετρο (MARTINI Instruments 180 Bench Meter).	57
Εικόνα 47: Χρωματόμετρο (MiniScan XE Hunter Associates Laboratory Inc, Reston, Virginia).	58
Εικόνα 48: Μηχανική Δυναμική Ανάλυση, DMA ((Physica MCR 301 Anton Paar DMA analyzer)	59
Εικόνα 49: Απεικόνιση από ανάλυση SEM για νανοοϊνες κυκλοδεξτρίνης με 7% ω-3 λιπαρά οξέα και 3% κολλαγόνο , με επιβαλλόμενη τάση 27kV, ροή 1000μL/h και απόσταση ακροφυσίου-επιφάνειας συλλογής=13cm (x300).	70
Εικόνα 50: Απεικόνιση από ανάλυση SEM για νανοοϊνες κυκλοδεξτρίνης με 7% ω-3 λιπαρά οξέα και 3% κολλαγόνο , με επιβαλλόμενη τάση 27kV, ροή 1000μL/h και απόσταση ακροφυσίου-επιφάνειας συλλογής=13cm (x5000).	70
Εικόνα 51: Απεικόνιση από ανάλυση SEM για τελικό προϊόν διαλύματος κυκλοδεξτρίνης 60% (x1000).....	71
Εικόνα 52: Απεικόνιση από ανάλυση SEM για τελικό προϊόν διαλύματος κυκλοδεξτρίνης 60% (x5000).....	71

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αντικείμενο και στόχοι

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η αξιοποίηση του απορριπτόμενου αλιεύματος *Lagocephalus sceleratus* (Λαγοκέφαλος) για την ανάπτυξη καινοτόμων προϊόντων κοσμετολογίας και συγκεκριμένα την παραλαβή των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων, του κολλαγόνου και της τετραδοτοξίνης από τη σάρκα, το δέρμα, τα κόκκαλα και τα εσωτερικά όργανα του εν λόγω ψαριού.

Ο *L. Sceleratus* είναι ένα είδος ψαριού ευρείας εξάπλωσης στον Ινδικό και στον Ειρηνικό ωκεανό που τα τελευταία χρόνια λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας των υδάτων έχει εισβάλει στη Μεσόγειο θάλασσα προκαλώντας κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις στη θαλάσσια αλιεία, ενώ δυσμενείς είναι οι επιπτώσεις και για το θαλάσσιο οικοσύστημα. **Το πρόβλημα** έγκειται στο ότι το είδος αυτό του ψαριού φέρει μια θανατηφόρα τοξίνη, την τετραδοτοξίνη, η οποία το καθιστά απαγορευμένο είδος υψηλού κινδύνου για κατανάλωση. Επιπλέον, λόγω της τοξίνης αυτής, αυτό το είδος του ψαριού, δεν παρουσιάζει θηρευτές στα νερά της Μεσογείου έχοντας ως αποτέλεσμα τη συνεχή αύξηση του πληθυσμού του. Το γεγονός δε ότι ο λαγοκέφαλος θρέφεται κυρίως με μαλάκια και ψάρια, έχει επιφέρει μείωση στις εκφορτώσεις κεφαλόποδων (κυρίως χταποδιών και σουπιών) επηρεάζοντας το αλιεύμα και το εισόδημα των αλιέων, αλλά και το θαλάσσιο οικοσύστημα. Αξίζει να σημειωθεί ότι έμμεσα επηρεάζονται και πολλά εμπορικά είδη ψαριών τα οποία τρέφονται με αυτά τα κεφαλόποδα. Δεν είναι λίγες, επίσης, οι αναφορές ψαράδων για επιθέσεις στα δίχτυα τους από λαγοκέφαλους. Συνεπώς, κρίνεται επιτακτική η ανάγκη για την αξιοποίηση αυτού του είδους του ψαριού, καθώς οι λύσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι στιγμής αφορούν την μίσθωση ψαράδων για τη συλλογή λαγοκέφαλων και η μετέπειτα απόρριψη των ψαριών ως απόβλητα, γεγονός που δεν συνάδει με τις αρχές της κυκλικής βιοοικονομίας. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι το **επιστημονικό και εμπορικό ενδιαφέρον** για την πλήρη αξιοποίηση του ψαριού αυτού είναι υψηλό, παρέχοντας λύσεις τόσο στην αντιμετώπιση τέτοιου είδους αποβλήτων που κρίνονται επικίνδυνα, όσο και στην αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών και κοινωνικοοικονομικών προβλημάτων που προκύπτουν.

1.2 Τοποθέτηση της διπλωματικής εργασίας-Μεθοδολογική προσέγγιση

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της αξιοποίησης του *L.sceleratus*, μέσω της παραλαβής των περιεχομένων σε αυτό βιοδραστικών συστατικών (ωμέγα-3 κολλαγόνο) καθώς και της τετραδοτοξίνης, και την ενσωμάτωση των εγκλεισμένων βιοδραστικών συστατικών σε καλλυντικές κρέμες. Ο εγκλεισμός των βιοδραστικών ουσιών, πραγματοποιήθηκε με την καινοτόμο μέθοδο της ηλεκτροστατικής ισοποίησης (electrospinning).

Η μεθοδολογική προσέγγιση που υιοθετήθηκε ήταν αποτέλεσμα ενδελεχούς βιβλιογραφικής ανασκόπησης. Συγκεκριμένα, παρελήφθησαν από το λαγοκέφαλο ουσίες σημαντικές για την βιομηχανία των καλλυντικών και ενθυλακώθηκαν σε μια συμβατή μήτρα εγκλεισμού. Αφού εξετάστηκαν οι κατάλληλες συνθήκες λειτουργίας της συσκευής ηλεκτροστατικής ισοποίησης (electrospinning), έγινε ενθυλάκωση των βιοδραστικών ουσιών και παρήχθησαν νανοΐνες, που μετέπειτα ενσωματώθηκαν σε κρέμα βάση. Στη συνέχεια, ακολούθησαν μετρήσεις αξιολόγησης των κρεμών που αναπτύχθηκαν και σύγκρισή τους με την κρέμα βάση και με κρέμες με ενσωματωμένα μη εγκλεισμένα συστατικά.

1.3 Επιμέρους στόχοι-Αναμενόμενη συνεισφορά

Οι **επιμέρους στόχοι** της παρούσας εργασίας περιλαμβάνουν συνοπτικά:

- την εφαρμογή και επιλογή κατάλληλων πρωτόκολλων για την παραλαβή των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων από τη σάρκα και το δέρμα του *L.sceleratus*,
- την εφαρμογή και επιλογή κατάλληλων πρωτόκολλων για την παραλαβή του κολλαγόνου από το δέρμα και τα κόκκαλα του *L.sceleratus*,
- την εφαρμογή και επιλογή κατάλληλων πρωτόκολλων για την παραλαβή της τοξίνης από τη σάρκα και τα εσωτερικά όργανα του ψαριού,

- τη διερεύνηση των κατάλληλων συνθηκών λειτουργίας της συσκευής ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning) για τον εγκλεισμό των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου,
- τη μελέτη και την αξιολόγηση των παραγόμενων νανοϊνών, και
- την ενσωμάτωση των νανοϊνών σε καλλυντικά σκευάσματα και τη αξιολόγηση των βασικών ιδιοτήτων των κρεμών.

Οι παραπάνω στόχοι πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία, συνεπώς η παρούσα διπλωματική εργασία **δύναται να συνεισφέρει** στη διεξαγωγή παρόμοιων πειραμάτων από άλλους ερευνητές. Επιπλέον, η παρούσα εργασία θα μπορούσε να αποτελεί λύση για την αξιοποίηση του απορριπτόμενου είδους *L.scleratus* από σύγχρονες μικρομεσαίες επιχειρήσεις του κλάδου της κοσμετολογίας, επηρεάζοντας έμμεσα τόσο το οικολογικό πρόβλημα που έχει δημιουργηθεί από την ύπαρξη του ψαριού αυτού στις ακτές της Μεσογείου όσο και το κοινωνικοοικονομικό.

1.4 Διάρθρωση

Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζονται το αντικείμενο και οι στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η μεθοδολογική προσέγγιση που ακολουθήθηκε, καθώς και οι επιμέρους στόχοι και η αναμενόμενη συνεισφορά της εργασίας αυτής. Τέλος, παρουσιάζεται και η διάρθρωση της.

Στο δεύτερο κεφάλαιο παρουσιάζονται αρχικά τα χαρακτηριστικά του *L. Scleratus*, και δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην τοξικότητα του, ενώ αναλύονται οι ιδιότητες της τοξίνης που φέρει (τετραδοτοξίνη) όπως η χημική σύσταση, η προέλευση και η θεραπεία. Ακολουθεί ανάλυση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου, καθώς και οι ευεργετικές τους ιδιότητες για το δέρμα. Έπειτα γίνεται αναφορά των μεθόδων εγκλεισμού και αναλύεται η τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning) και οι παράγοντες από τους οποίους επηρεάζεται.

Στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε. Αρχικά, γίνεται αναφορά στα υλικά και έπειτα στη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε τόσο για την απομόνωση της τετραδοτοξίνης, των λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου όσο και για την εφαρμογή της τεχνικής της ηλεκτροστατικής ινοποίησης, της ανάπτυξης και αξιολόγησης των καλλυντικών κρεμών.

Στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζονται αναλύονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.

Τέλος, στο πέμπτο κεφάλαιο πραγματοποιείται η εξαγωγή των συμπερασμάτων και προτείνονται μελλοντικές προοπτικές για την εξέλιξη του μελετώμενου θέματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η βιοποικιλότητα στη Μεσόγειο θάλασσα έχει επηρεαστεί αρνητικά από την εισβολή διάφορων ζωικών ειδών από την Ερυθρά θάλασσα, μέσω της διώρυγας του Σουέζ. Τα είδη αυτά καλούνται ως Λεσειψιανοί μετανάστες, και έχουν προκαλέσει μεγάλα οικονομικά και οικολογικά προβλήματα κυρίως στην ανατολική Μεσόγειο. Η αύξηση της θερμοκρασίας των θαλασσών τα τελευταία είκοσι χρόνια φαίνεται να είναι ο καθοριστικός παράγοντας που προσδίδει στα τροπικά είδη τις κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη, αναπαραγωγή και επιβίωση τους φέρνοντας τα ξένα είδη σε πλεονεκτική θέση έναντι των ντόπιων. Το μεγαλύτερο ποσοστό των εισβολικών ειδών αποτελείται από μέλη της οικογένειας Tetraodontidae, όπως είναι ο *Lagocephalus sceleratus*. Ο Λαγοκέφαλος θεωρείται από τα χειρότερα εισβολικά είδη ψαριών στη Μεσόγειο θάλασσα με σημαντικό αντίκτυπο στο περιβάλλον και στον αλιευτικό τομέα. Η πρώτη καταγραφή του είδους αυτού στα μεσογειακά ύδατα έγινε το 2003 στον κόλπο Γökona της Τουρκίας [1]. Στα ελληνικά ύδατα, πρώτη φορά καταγράφηκε τον Ιούλιο του 2005, στο νότιο Αιγαίο και πιο συγκεκριμένα στο Κρητικό πέλαγος. Από τότε, η συχνότητα εμφάνισης του αυξάνεται με ταχύς ρυθμούς φανερώνοντας την ικανότητα του ψαριού αυτού να προσαρμόζεται σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, έχοντας πιθανώς μελλοντικά αντίκτυπο στην ποικιλία και αφθονία των γηγενών ειδών. Ο *L. Sceleratus* έχει πλέον εγκατασταθεί στο Αιγαίο Πέλαγος, το γεγονός αυτό φανερώνει το ευρύ φάσμα μεγεθών *L. Sceleratus* που έχουν συλλεχθεί στο Αιγαίο. Το φαινόμενο αυτό είναι συνέπεια του υψηλού ποσοστού ανάπτυξης και αναπαραγωγής του ψαριού, της έλλειψης φυσικών θηρευτών σε αυτά τα ύδατα, της δυνατότητας του ψαριού να αξιοποιήσει τους υπάρχοντες πόρους τροφής και όπως προαναφέρθηκε, της ικανότητας του να προσαρμόζεται στις περιβαλλοντικές συνθήκες[2].

2.1 Χαρακτηριστικά του *L. Sceleratus*

2.1.1 Μορφολογία

Ο *L. Sceleratus* ανήκει στην οικογένεια των *Tetraodontidae*, που περιλαμβάνει σε παγκόσμιο επίπεδο 187 διαφορετικά είδη, μέλη της οικογένειας αυτής που έχουν βρεθεί στη Μεσόγειο θάλασσα είναι τα εξής: *L. Sceleratus*, *Lagocephalus guentheri*, *L. Spadiceus*, *L. Lagocephalus*, *L. Suezensis*, *Torquigener flavimaculosus*, *Tylerius spinosissimus*, *Sphoeroides spengleri*, *Sphoeroides pachygaster*, *Sphoeroides marmoratus* και *Ehippion guttiferum* [3, 4]. Το γένος *Tetraodontidae* ονομάζεται έτσι λόγω της οδοντοστοιχίας των μελών της οικογένειας, καθώς έχουν από δύο ισχυρά δόντια σε κάθε γνάθο που είναι συμπτυγμένα και διαχωρισμένα από μια κεντρική ραφή [5].

Ένα από τα μεγαλύτερα μέλη της οικογένειας *Tetraodontidae* είναι ο *L. Sceleratus* φθάνοντας τα 110 cm σε μήκος και τα 7 kg σε μάζα. Το σώμα του είναι επίμηκες και ελαφρώς συμπίεσμένο πλευρικά. Η ράχη του έχει χρώμα πράσινο-καφέ με κάποια μαύρα στίγματα, μια ασημένια λωρίδα που ξεκινάει από το στόμα του ψαριού και φθάνει μέχρι την άκρη της ουράς του, άσπρη κοιλιά και μια ασημένια βούλα μπροστά από κάθε μάτι. Επιπλέον, διαθέτει όπως όλα τα μέλη της οικογένειας αυτής δυο ισχυρά δόντια σε κάθε γνάθο (Εικόνα 1) που είναι ικανά να καταστρέψουν ακόμα και τα αγκίστρια και τα δίχτυα των ψαράδων, δημιουργώντας μεγάλα προβλήματα στην αλιεία. Τα λέπια και τα κοιλιακά πτερύγια απουσιάζουν, ενώ παρουσιάζουν μικρά αγκάθια στη ράχη και στην κοιλιά. Επίσης, απουσιάζουν τα πλευρά και τα επίπλευρα, δίνοντας τη δυνατότητα στο ψάρι να φουσκώνει το σώμα του απορροφώντας αέρα ή νερό και να απωθεί με αυτόν τον τρόπο τους θηρευτές του (Εικόνα 2) [4, 5].



Εικόνα 1: Απεικόνιση της μορφής του *L. Sceleratus* και των ισχυρών δοντιών της άνω και κάτω γνάθου από όπου έχει πάρει το γένος *Tetraodontidae* το όνομα του.



Εικόνα 2: Απουσία των πλευρών και των επίπλευρων, που δίνει τη δυνατότητα στον *L. Sceleratus* να φουσκώνει το σώμα του απορροφώντας αέρα ή νερό όταν διαισθάνεται κίνδυνο.

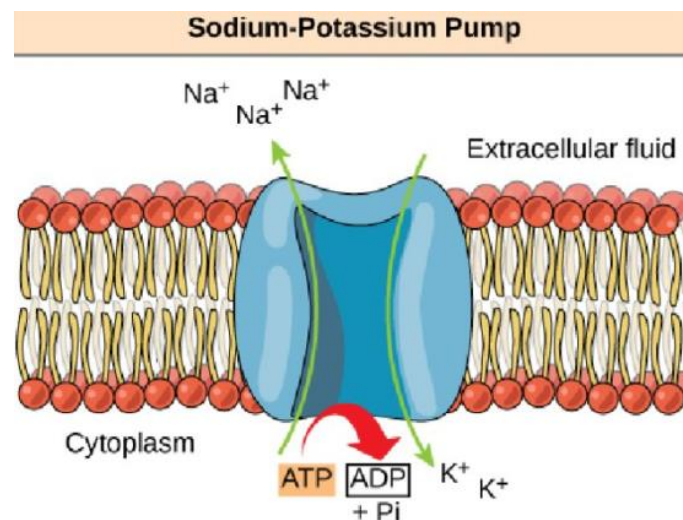
Ο λαγοκέφαλος γενικά είναι ένα αργοκίνητο ψάρι, ωστόσο μπορεί να κινηθεί πολύ γρήγορα όταν νιώθει κίνδυνο ή όταν κυνηγά. Όσον αφορά στη διατροφή του, τρέφεται κυρίως με μαλάκια, μαλακόστρακα και ψάρια. Είναι ένα σχετικά επιθετικό ψάρι, που μπορεί να επιτεθεί απρόκλητα και με τη βοήθεια των ισχυρών του δοντιών να σπάσει κόκκαλα και αγκίστρια με ευκολία. Το ψάρι αυτό φέρει μια θανατηφόρα τοξίνη, την τετραδοτοξίνη, η οποία το καθιστά απαγορευμένο είδος υψηλού κινδύνου για κατανάλωση. Επιπλέον, λόγω της τοξίνης αυτής, αυτό το είδος του ψαριού, δεν παρουσιάζει ανταγωνιστές στα νερά της Μεσογείου έχοντας ως αποτέλεσμα τη συνεχή αύξηση του πληθυσμού του. Το γεγονός δε ότι ο λαγοκέφαλος θρέφεται κυρίως με μαλάκια και ψάρια, έχει επιφέρει μείωση στις εκφορτώσεις κεφαλόποδων (κυρίως χταποδιών και σουπιών) επηρεάζοντας το αλιεύμα και το εισόδημα των αλιέων, αλλά και το θαλάσσιο οικοσύστημα. Αξίζει να σημειωθεί ότι έμμεσα επηρεάζονται και πολλά εμπορικά είδη ψαριών τα οποία τρέφονται με αυτά τα κεφαλόποδα. Δεν είναι λίγες, επίσης, οι αναφορές ψαράδων για επιθέσεις στα δίχτυα τους από λαγοκέφαλους [5].

2.1.2 Σύσταση

2.1.2.1 Τετραδοτοξίνη

Η τετραδοτοξίνη (ΤΤΧ) είναι μια θανατηφόρα νευροτοξίνη που δρα αναστέλλοντας το δυναμικό δράσης στα νευρικά και μυϊκά κύτταρα με έναν εξαιρετικά επιλεκτικό τρόπο, αποτελώντας ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη των ευερέθιστων κυττάρων. Μπλοκάρει επιλεκτικά το μηχανισμό μεταφοράς ιόντων νατρίου, Na^+ , στην αντλία νατρίου-καλίου στα νευρικά και μυϊκά κύτταρα, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει τη διαπερατότητα των ιόντων καλίου, K^+ . Εξαιτίας αυτής της δράσης

αποκλεισμού του διαύλου νατρίου, εξετάζεται η χρήση της τετραδοτοξίνης σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Η τετραδοτοξίνη έχει ήδη γίνει μια δημοφιλής χημική ουσία στη μελέτη της νευροφυσιολογίας, ενώ διαρκώς κερδίζει έδαφος για την θεραπεία της ημικρανίας και συμπτωμάτων στέρησης σε χρήστες ηρωίνης ως παράγοντα αναισθητικό και ρύθμισης της αίσθησης του πόνου. Μια μελλοντική προοπτική της χρήσης της εν λόγω τοξίνης, είναι στη θεραπεία της ισχαιμικής νευρωνικής βλάβης. Η τετραδοτοξίνη ως φαρμακευτικό προϊόν έχει ήδη εξεταστεί από μια καναδική εταιρεία, την International Wex technologies σε συνεργασία με ένα κινέζικο ινστιτούτο. Τα ευρήματα που προέκυψαν σχετικά με τη χρήση της *TTX* στην διαδικασία αποκατάστασης ασθενών εθισμένων σε ηρωίνη τους οδήγησαν στην ανακάλυψη των δυνατοτήτων της *TTX* για τον περιορισμό του πόνου σε ασθενείς με καρκίνο. Επίσης, η *TTX* έχει φαρμακολογική εφαρμογή ως μοριακός και κυτταρικός δείκτης για τους διαύλους ιόντων νατρίου (Na^+) που είναι εξαρτώμενοι από την τάση, για τη μελέτη των κυτταρικών μεμβρανών [6].



Εικόνα 3: Αντλία Νατρίου-Καλίου που χρησιμοποιεί το ATP για να μεταφέρει τα ιόντα νατρίου έξω από το κύτταρο [7].

Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία

Όπως, πολλά άλλα είδη της οικογένειας Tetraodontidae, ο *L. Sceleratus* περιέχει την *TTX*, αποτελώντας πηγή τροφικής δηλητηρίασης με υψηλή θνησιμότητα. Η *TTX*, μπορεί να προκαλέσει θάνατο από μυϊκή παράλυση, αναπνευστική ανεπάρκεια και κατάρρευση του κυκλοφοριακού συστήματος. Για έναν άνθρωπο 50 kg, η ελάχιστη θανατηφόρα δόση *TTX* είναι περίπου 2 mg ενώ η ελάχιστη οξεία δόση είναι 0,2mg. Τα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως 10-45 λεπτά από την στιγμή της έκθεσης στην τοξίνη, έχουν αναφερθεί, ωστόσο, και περιπτώσεις που τα συμπτώματα έγιναν αντιληπτά 3-6 ώρες μετά την έκθεση. Τα συμπτώματα αυτά αφορούν στα εξής: (α) στοματική παραισθησία, η οποία σταδιακά εξαπλώνεται προς τα άκρα και τον κορμό, (β) μούδιασμα στη γλώσσα, (γ) ναυτία, (δ) κεφαλαλγία, (ε) εμετό, (στ) υπεραιμία, (ζ) διάρροια και (η) στοματικό πόνο. Σταδιακά, ο ασθενής δυσκολεύεται να περπατήσει και οδηγείται προς πλήρη παράλυση [2]. Ο τύπος, η σοβαρότητα και η ποικιλία των συμπτωμάτων εξαρτώνται από την ποσότητα της προσλαμβανόμενης τοξίνης, την υγεία αλλά και την ηλικία του ασθενή. Μέχρι στιγμής έχουν ταξινομηθεί τέσσερα στάδια για τα συμπτώματα που προκαλούνται από την κατανάλωση τετραδοτοξίνης, που αναφέρονται ως βαθμοί τετραδοξικότητας, και παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Οι κύριοι βαθμοί τετραδοτοξικότητας και τα σχετικά συμπτώματα.

Βαθμός	Χαρακτηριστικά συμπτώματα
Πρώτος	Νευρομυϊκά συμπτώματα (μούδιασμα χεριών, γλώσσας και φάρυγγα, απώλεια γεύσης, ζαλάδες, κεφαλαλγίες, συστολή της κόρης του οφθαλμού), Γαστροεντερικά συμπτώματα (σιελόρροια, ναυτία, εμετός, διάρροια, υπερκινητικότητα, κοιλιακοί πόνοι)
Δεύτερος	Πρόσθετα νευρομυϊκά συμπτώματα (γενικευμένη παραισθησία, παράλυση των άκρων, διαστολή της κόρης του οφθαλμού, καθυστέρηση των αντανακλαστικών)
Τρίτος	Αυξημένα νευρομυϊκά συμπτώματα (απώλεια όρεξης, δυσαρθρία, λήθαργος, απώλεια συντονισμού κινήσεων, παράλυση κρανιακού νεύρου, μυϊκή ακαμψία), καρδιοαγγειακά συμπτώματα (υπόταση ή υπέρταση, αγγειοσκλήρυνση, καρδιακές αρρυθμίες, ταχυκαρδία, δύσπνοια)
Τέταρτος	Δυσλειτουργία αναπνευστικού συστήματος, μειωμένες νοητικές ικανότητες, ακραία υπόταση, καταστολή και ολική παράλυση

Ο τρόπος δράσης της *TTX* βασίζεται στην αναστολή του διαύλου νατρίου προκαλώντας τελικά δηλητηρίαση. Επιπρόσθετα, η *TTX* είναι ανθεκτική στη θερμότητα, και έτσι δεν αποσυντίθεται κατά το μαγείρεμα [8].

Θεραπεία

Μέχρι στιγμής δεν έχουν βρεθεί αντίδοτα για την αντιμετώπιση της κατανάλωσης *TTX*, η διάγνωση βασίζεται στην παρουσίαση των κλινικών συμπτωμάτων και στην καταγραφή του ιστορικού κατανάλωσης τοξικών ειδών. Η αντιμετώπιση της περιλαμβάνει την χορήγηση εμετικών εάν δεν έχει προηγηθεί εμετός και έπειτα την πλύση στομάχου. Επιπλέον, χορηγούνται φάρμακα για την αντιμετώπιση της υπότασης και της βραδυκαρδίας, καθώς και αναπνευστική υποστήριξη [8].

Προέλευση της τετραδοτοξίνης

Για την μελέτη της προέλευσης της *TTX* έχουν διατυπωθεί διαφορές υποθέσεις μερικές εκ των οποίων παρατίθενται παρακάτω.

- Εξωγενής προέλευση: Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση, τα διάφορα είδη προσλαμβάνουν την *TTX* καταναλώνοντας βακτήρια που υπάρχουν στο περιβάλλον τους. Ο μηχανισμός για την συσσώρευση *TTX* από την τροφική αλυσίδα προτάθηκε το 2006, όπου έγιναν πειράματα σε περισσότερα από 5000 δείγματα *ruffers* τα οποία εκτράφηκαν σε ενυδρείο, για έναν χρόνο και παρατηρήθηκε ότι δεν περιείχαν την τοξίνη όταν η διατροφή τους δεν περιλάμβανε τους οργανισμούς που την παράγουν. Ενώ όταν μη τοξικά *ruffers* τροφοδοτούνταν με τα βακτήρια που παράγουν την *TTX*, μετατρέπονταν σε τοξικά.
- Ενδογενής προέλευση: Η *TTX* μπορεί να είναι ένα μεταβολικό προϊόν με ορισμένες φυσιολογικές λειτουργίες στα ζώα που την παράγουν, όπως κάποιος σκοπός επιβίωσης. Σύμφωνα με έρευνες το ποσοστό της *TTX* σε σαλαμάνδρες (*Taricha granulosa*) που εξετάστηκαν αυξήθηκε όταν φυλάσσονταν σε αιχμαλωσία για ένα χρόνο, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανώς η *TTX* δεν έχει ξενική προέλευση. Ενώ αντίστοιχα, αποτελέσματα προέκυψαν για σαλαμάνδρες που κρατήθηκαν σε αιχμαλωσία για 9 μήνες. Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα έδειξαν αναγέννηση της *TTX* στο δέρμα ή αναπλήρωση της από άλλα μέλη του σώματος τους.
- Συμβιωτικοί μικροοργανισμοί: Αυτή η υπόθεση αναφέρει ότι η *TTX* παράγεται από συμβιωτική σχέση μεταξύ των ζώων που την αποκτούν και των βακτηρίων που την παράγουν. Συγκεκριμένα, οι μικροοργανισμοί παράγουν *TTX* στο σώμα των φορέων, και στη συνέχεια συσσωρεύονται στο σώμα των φορέων και δεν προσλαμβάνονται από τη διατροφή τους. Η μικροβιακή παραγωγή του *TTX* σε *ruffers* έχει μελετηθεί εκτενώς.

Η προέλευση της τετραδοτοξίνης μπορεί να οφείλεται σε οποιονδήποτε από τους συνδυασμούς των τριών παραπάνω υποθέσεων. [6]

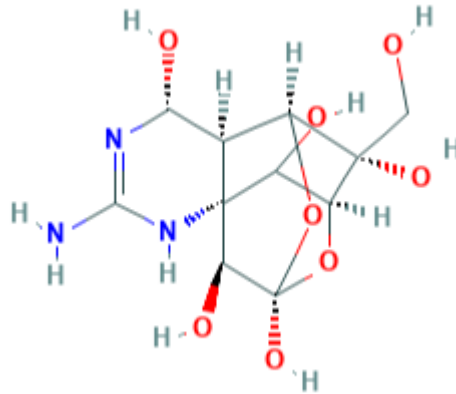
Η παραγωγή *TTX* από θαλάσσια βακτήρια έχει αρχίσει να μελετάται ήδη από το 1980, και επικεντρώνεται κυρίως σε βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Vibrio* και σε μικρότερη κλίμακα σε

βακτήρια του γένους *Pseudomonas*. Τα βακτήρια *Vibrio* είναι ένα γένος με υδρόβια βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια *Vibrionaceae* και μπορούν να προκαλέσουν πολλές σοβαρές ασθένειες στα ζώα. Η πιο συνηθισμένη πηγή βακτηρίων που σχετίζεται με την παραγωγή του *TTX* είναι ο *Vibrio alginolyticus*. Η *TTX* απορροφάται από την τροφική αλυσίδα, αλλά οι μηχανισμοί μεταφοράς, συσσώρευσης και απομάκρυνσης της *TTX* παραμένουν ασαφής. Ο λόγος για τον οποίο παράγεται η *TTX* από τα βακτήρια παραμένει άγνωστος, καθώς δεν έχει βρεθεί ότι αποτελεί παραπροϊόν οποιασδήποτε γνωστής οδού. Αν και για τους θηρευτές των βακτηρίων η τοξίνη χρησιμεύει ως αμυντικός μηχανισμός, δεν προσδίδει προστασία στα ίδια τα βακτήρια, ωστόσο οι ενδείξεις δείχνουν ότι η τοξίνη είναι ένα τελικό προϊόν μιας βιοσυνθετικής οδού παρά ένα παραπροϊόν, πράγμα που σημαίνει ότι η *TTX* πρέπει να έχει μια σημαντική λειτουργία για τα βακτηρίδια που πρέπει να ανακαλυφθεί. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι στα θαλάσσια είδη η προέλευση της τοξίνης είναι κατά πάσα πιθανότητα εξωγενής. Παρόλο που η *TTX* έχει απομονωθεί κυρίως από *puffer fishes*, έχει ανιχνευθεί και σε διάφορα άλλα είδη συμπεριλαμβανομένων των ψαριών «παπαγάλων» (*parrot fishes*), βατράχων του γένους *Atelopus*, διάφορων ειδών χταποδιών του γένους *Hapalochlaena*, διάφορων αστεριών και καβουριών της οικογένειας *Xanthidae*. Η τοξίνη χρησιμοποιείται από τους οργανισμούς που τη φέρουν ως μηχανισμός άμυνας, ενώ οι ίδιοι παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλή αντίσταση στην *TTX*. Αν και η ακριβής οδός εισόδου της τετραδοτοξίνης στην τροφική αλυσίδα δεν είναι γνωστή, πιστεύεται ότι τα βακτήρια είναι η κύρια πηγή της τετραδοτοξίνης, καθώς είναι ο μόνος κοινός παράγοντας στη διατροφή των οργανισμών που τη φέρουν.

Σύμφωνα με πολλές έρευνες στα *pufferfish*, διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν πολλές διακυμάνσεις στη ποσότητα της *TTX* μεταξύ των διαφόρων οργάνων του ψαριού αλλά επιπλέον υπάρχουν και διακυμάνσεις ανάλογα με την εποχή. Οι περισσότερες έρευνες ανέφεραν ότι το ήπαρ πολλών *pufferfish* παρουσιάζει συγκεκριμένο μηχανισμό πρόσληψης της *TTX* και η οποία αρχικά απορροφάται από το ήπαρ και στη συνέχεια μεταφέρεται στο δέρμα μέσω του κυκλοφοριακού συστήματος. Η μεταφορά της τοξίνης μέσω των ιστών και η συσσώρευση της εξαρτάται από το βαθμό ωρίμανσης του ψαριού. Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της θερμοκρασίας του νερού και της πρόσληψης *TTX* από τους οργανισμούς. Συγκεκριμένα, η αύξηση της θερμοκρασίας του νερού οδηγεί σε αύξηση της ποσότητας πρόσληψης της *TTX* στο σώμα του οργανισμού. Το γεγονός αυτό είναι συνέπεια του ότι οι οργανισμοί δέχονται τα βακτήρια που παράγουν *TTX* με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και με ταχύτερο ρυθμό όταν αυξάνονται οι θερμοκρασίες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2001 στο *Lagocephalus lunaris*, είδος της οικογένειας *Tetrodontidae*, που απέδειξε ότι το ψάρι προσέλαβε περισσότερη *TTX* κατά τους θερμότερους μήνες. Παρόλο που χρειάζονται περισσότερες έρευνες για να επιβεβαιωθεί η σχέση μεταξύ τοξικότητας και θερμοκρασίας, μπορεί να προβλεφθεί ότι καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία των νερών της Μεσογείου, λόγω της κλιματικής αλλαγής, θα αυξάνεται και η περιεκτικότητα και τα είδη που περιέχουν *TTX* [4].

Χημική σύσταση τετραδοτοξίνης

Η *TTX* έχει συντακτικό τύπο $C_{11}H_{17}N_3O_8$ και μοριακό βάρος $MW=319.27$, είναι υδατοδιαλυτή, παρουσιάζει ανθεκτικότητα στη θερμότητα (Σημείο ζέσεως= $225^{\circ}C$) και απορροφάται μέσω της βλεννογόνου και του λεπτού εντέρου [9].



Εικόνα 4: Απεικόνιση της δομής της τετραδοτοξίνης.

Τοξικότητα

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην περιοχή της Μεσογείου έδειξαν ότι λαγοκέφαλοι που βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης τους, με μέγεθος μικρότερο από 16 cm σε μήκος, συνήθως δεν διαθέτουν επαρκή ποσότητα *TTX* ώστε η κατανάλωση τους να είναι θανατηφόρα, ωστόσο μεγαλύτερης ηλικίας ψάρια φαίνεται να είναι ικανά να προκαλέσουν θάνατο σε έναν άνθρωπο με κατανάλωση μόλις 200g της σάρκας του. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι τα ψάρια αυτού του είδους συσσωρεύουν *TTX* καθώς ωριμάζουν με το χρόνο ως παράγοντα βιολογικής άμυνας.

Η *TTX* εντοπίζεται κυρίως στις γονάδες, το ήπαρ και τα έντερα αυτού του είδους αλλά έχει καταγραφεί επίσης στο δέρμα και περιστασιακά στους μύες. Επιπλέον η *TTX* εντοπίζεται και στα αυγά του ψαριού προστατεύοντας τα από τους θηρευτές. Οι ωθήκες, είναι έντονα τοξικές (>1000 MU/g ιστού), τα έντερα μέτρια τοξικά (100-1000 MU/g ιστού) ενώ το ήπαρ, οι μύες και το δέρμα είναι ασθενώς τοξικά (10-100 MU/g ιστού). Επιπλέον, όταν το ψάρι βρίσκεται σε εχθρικό περιβάλλον, διογκώνεται το σώμα του και η τοξίνη εκκρίνεται από το δέρμα του ως απωθητικό. Το φύλο φαίνεται να επηρεάζει και αυτό την τοξικότητα του ψαριού, σύμφωνα με έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στην Αίγυπτο και έδειξαν ότι το 57% των δειγμάτων που εξετάστηκαν ήταν τοξικά. Πιο συγκεκριμένα, τα θηλυκά βρέθηκαν γενικά πιο τοξικά από τα αρσενικά, και τα υψηλότερα επίπεδα τοξικότητας καταγράφηκαν το Μάρτιο, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η τοξικότητα αρχίζει να αυξάνεται καθώς πλησιάζει η εποχή της ωοτοκίας. Παρόλο που η *TTX* είναι κυρίως συγκεντρωμένη στα εσωτερικά όργανα, η μυϊκοί ιστοί παρουσιάζουν μέτρια τοξικότητα ειδικά την άνοιξη και το καλοκαίρι, επιβεβαιώνοντας το κίνδυνο που παρουσιάζει το είδος στη δημόσια υγεία [4].

2.1.2.2 Λιπίδια

Τα λιπίδια αποτελούνται από δομικές μονάδες με έντονη υδροφοβικότητα, κατά συνέπεια είναι διαλυτά στους οργανικούς διαλύτες και αδιάλυτες στο νερό. Η ιδιότητα τους αυτή να μη διαλύονται στο νερό είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το διαχωρισμό των λιπών από τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες. Ωστόσο μερικά λιπίδια είναι αμφιφιλικά μόρια, δηλαδή μόρια που περιέχουν τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες μονάδες, με αποτέλεσμα να είναι επιφανειακώς ενεργά [10].

Βασικές πηγές λιπιδίων είναι τα λίπη και τα έλαια φυτικής ή ζωικής προέλευσης. Καθώς το μεγαλύτερο μέρος των βρώσιμων λιπών και ελαίων αποτελούνται από τριγλυκερίδια συχνά αυτά αποκαλούνται ως λιπαρά σώματα ή απλά λιπαρά. Τα λιπαρά σώματα αποτελούν θρεπτικές ουσίες υψηλής ενεργειακής αξίας, περιέχουν λιποδιαλυτές βιταμίνες και απαραίτητα λιπαρά οξέα. Παράλληλα αποτελούν πηγή ενέργειας για τους οργανισμούς, παρέχοντας σχεδόν διπλάσια ενέργεια από τις πρωτεΐνες ή τους υδατάνθρακες, αποτελώντας ουσιαστικά την πιο συμπυκνωμένη πηγή ενέργειας παρέχοντας στον οργανισμό περίπου 9 kcal/g. Ο ρόλος των λιπιδίων στους οργανισμούς είναι τόσο μηχανικός όσο και βιολογικός. Πιο συγκεκριμένα, αποτελούν κύρια συστατικά του υποδόριου ιστού, χρησιμεύουν στη θερμική μόνωση του σώματος, την προστασία των εσωτερικών οργάνων και συμβάλλουν στη διαμόρφωση του σχήματος του σώματος. Επιπλέον, οι συνοδές ουσίες των λιπαρών σωμάτων, παρόλο που βρίσκονται σε μικρές αναλογίες στα λιπαρά είναι δραστικές

ουσίες του βιοχημικού μεταβολισμού, και είναι απαραίτητες στο γενικό μεταβολισμό του ανθρώπινου σώματος. Για αυτόν το λόγο κατά την επεξεργασία του λιπαρού πρέπει να προστατεύονται οι ουσίες αυτές.

Τα λιπίδια ταξινομούνται ως εξής :

- Απλά ή ουδέτερα λιπίδια: είναι εστέρες λιπαρών οξέων με αλκοόλες που κατά την υδρόλυση τους παρέχουν μόνο αλκοόλες και λιπαρά οξέα. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται τα τριγλυκερίδια, δηλαδή οι εστέρες λιπαρών οξέων με γλυκερίνη, και οι κηροί, που είναι εστέρες λιπαρών οξέων με μονοσθενείς αλκοόλες σχετικά υψηλού μοριακού βάρους (εκτός της γλυκερίνης).
- Σύνθετα λιπίδια: ενώσεις που περιέχουν και άλλες προσθετικές ομάδες σε ένα εστέρα λιπαρού οξέος και μια αλκοόλη, και ως συνέπεια κατά την υδρόλυση τους παρέχουν λιπαρά οξέα, αλκοόλες και πρόσθετες ομάδες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα φωσφολιπίδια ή φωσφατίδια, δηλαδή εστέρες που περιέχουν λιπαρά οξέα, φωσφορικό οξύ και άλλες ομάδες που συνήθως περιέχουν άζωτο, τα γλυκολιπίδια ή σεροβροζίδια, που είναι ενώσεις που περιέχουν λιπαρά οξέα ενωμένα με ένα υδατάνθρακα και ένα αζωτούχο τμήμα χωρίς να περιέχουν φωσφορικό οξύ, και άλλα σύνθετα λιπίδια, όπως είναι τα σουλφολιπίδια και αμινολιπίδια.
- Παράγωγα λιπίδια: ουσίες προερχόμενες συνήθως με υδρόλυση, από ουδέτερα ή σύνθετα λιπίδια και εμφανίζουν τις γενικές ιδιότητες των λιπιδίων ή απαντώνται ως έχουν μέσα στα λιπαρά σώματα. Τέτοιες ουσίες είναι τα λιπαρά οξέα, οι αλκοόλες (π.χ. γλυκερίνη, μερικές ανώτερες αλειφατικές αλκοόλες, χοληστερόλη και άλλες στερόλες), υδρογονάνθρακες, λιποδιαλυτές βιταμίνες (π.χ. οι βιταμίνες A,D,E,K) και στεροειδείς ορμόνες.

Κύριες πηγές λιπαρών σωμάτων αποτελούν τα φυτικά και ζωικά λίπη και έλαια. Τα λιπαρά σώματα διακρίνονται με βάση τη θερμοκρασία σε λίπη, εάν είναι στερεά ή ημιστερεά, και σε έλαια, εάν είναι ρευστά. Ένας άλλος τρόπος διάκρισης των λιπαρών σωμάτων είναι η προέλευση, όπου ταξινομούνται σε φυτικά και ζωικά λίπη.

Όσον αφορά στα φυτικά λίπη και έλαια απαντώνται σε σημαντικές ποσότητες σε ορισμένους φυτικούς σπόρους και καρπούς, από τους οποίους εξαγονται με έκθλιψη ή με εκχύλιση με τη χρήση οργανικών διαλυτών. Ενώ τα ζωικά λίπη και έλαια περιέχονται σχεδόν σε όλους τους ζωικούς ιστούς και στα όργανα, και κυρίως εντός του μυελού των οστών καθώς και σε κατώτερα στρώματα της επιδερμίδας από όπου και εξαγονται κυρίως με τήξη [11].

Λιπαρά οξέα

Οι ιδιότητες των λιπών και ελαίων εξαρτώνται κυρίως από τη σύσταση σε λιπαρά οξέα και την κατανομή των οξέων αυτών στα μόρια των αλκυλογλυκερολών (δηλαδή εστέρες της τρισθενούς αλκοόλης γλυκερόλης με λιπαρά οξέα). Καθώς και από τη φύση και τη συγκέντρωση των άλλων λιπιδίων που απαρτίζουν τους εστέρες αυτούς στα φυσικά λίπη [12].

Τα λιπαρά οξέα είναι μονοκαρβοξυλικά οξέα μακριάς ανθρακικής αλυσίδας με, συνήθως, άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα και γενικό τύπο $H(CH_2)_nCOOH$, που φέρουν την καρβοξυλομάδα στο άκρο της αλυσού και μπορεί να είναι κορεσμένα ή ακόρεστα. Τα λιπαρά οξέα είναι γνωστά με διάφορα ονόματα όπως: πτητικά λιπαρά οξέα που έχουν έως 5 άτομα άνθρακα (C1-C5), λιπαρά οξέα από 6 έως 24 άτομα άνθρακα (C6-C24), μακράς αλυσού λιπαρά οξέα από 25 έως 40 άτομα άνθρακα (C25-C40) και πολύ μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα με πάνω από 40 άτομα άνθρακα.

Τα λιπαρά οξέα υπάρχουν στη φύση ως καθαρά ελεύθερα λιπαρά οξέα (Free Fatty Acids, FFA) ή ως μέρος πιο πολύπλοκων μορίων, των λιπιδίων. Τα λιπαρά οξέα που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με πρωτεΐνες, αλκοόλες, σάκχαρα ή άλλα οργανικά μόρια ονομάζονται δεσμευμένα λιπαρά οξέα (Bound Fatty Acids, BFA). Υπάρχουν, επίσης, ορισμένα μόρια που μπορούν να ταξινομηθούν ως υποκατεστημένα λιπαρά οξέα ή συνθετικά λιπαρά οξέα (Synthetic Fatty Acids, SFAs), όπως το μεθυλοπροπιονικό οξύ [13].

Ιδιότητες κορεσμένων λιπαρών οξέων

Κορεσμένα ονομάζονται τα λιπαρά οξέα που οι άνθρακες της αλυσίδας συνδέονται μεταξύ τους μόνο με απλούς δεσμούς. Κορεσμένα λιπαρά οξέα με λιγότερα από 10 άτομα άνθρακα στο μόριο τους

είναι υγρά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ μόρια με μεγαλύτερο αριθμό ανθράκων είναι στερεά. Το σημείο τήξης είναι χαμηλότερο καθώς μικραίνει ο αριθμός των ατόμων άνθρακα στην ανθρακική αλυσίδα, εξαίρεση αποτελεί το οξικό οξύ. Ενώ η διαλυτότητα αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας και της υδροφοβικότητας του διαλύτη. Τα πρώτα μέλη της σειράς των κορεσμένων λιπαρών οξέων είναι υδατοδιαλυτά.

Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που απαντώνται στα φυσικά λίπη και έλαια είναι το βουτυρικό οξύ ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$), το δαφνικό οξύ ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$), το μυριστικό οξύ ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$), το παλμιτικό οξύ ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$) και το στεατικό οξύ ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$).

Ιδιότητες ακόρεστων λιπαρών οξέων

Ακόρεστα ονομάζονται τα λιπαρά οξέα που περιέχουν στο μόριο τους διπλούς δεσμούς μεταξύ των ατόμων άνθρακα, και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον αριθμό των ατόμων άνθρακα και ως προς τα χαρακτηριστικά των διπλών δεσμών. Στα ακόρεστα λιπαρά οξέα το σημείο τήξης και η διαλυτότητα σε υδρόφοβους διαλύτες αυξάνεται καθώς αυξάνεται το μήκος της αλυσίδας του λιπαρού οξέος. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, ωστόσο, έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα και υψηλότερο σημείο τήξης σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ακόρεστα. Τα πρώτα μέλη της σειράς των ακόρεστων λιπαρών οξέων είναι υδατοδιαλυτά.

Τα κυριότερα ακόρεστα λιπαρά οξέα που συναντώνται σε φυσικά λίπη και έλαια είναι το παλμιτελαϊκό οξύ ($\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{COOH}$), το ελαϊκό οξύ ($\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$), το λινελαϊκό ($\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{COOH}$), το λινολενικό ($\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{COOH}$), το αραχιδονικό ($\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{COOH}$) και το ερουκικό ($\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{COOH}$) [11].

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα λιπαρά οξέα που συναντώνται σε διάφορα είδη ιχθυελαίων.

Πίνακας 2: Ποσοστιαία αναλογία λιπαρών οξέων σε ιχθυέλαια. [12, 14]

Λιπαρά Οξέα	Ηπατέλαιο μπακαλιάρου (%)	Έλαιο ρέγκας (%)	Έλαιο σολομού (%)	Έλαιο Menhaden (%)	Έλαιο L. Sceleratus (%)
12:0	-	-	-	-	0.40
14:0	2.8	3.6	3.4	7.7	0.40
14:1	-	-	-	-	0.74
15:0	0.4	0.4	0.1	-	0.85
15:1	0.2	-	-	-	-
16:0	10.7	18.3	10.2	25.3	20.74
16:1	6.9	8.3	5.0	6.7	1.09
16:2	-	-	-	-	1.42
17:0	1.2	0.5	1.6	3.0	0.51
18:0	3.7	2.2	4.4	3.1	16.27
18:1	23.9	16.9	17.6	15.4	14.52
18:2	1.5	1.6	1.6	-	7.08
18:3	0.9	0.3	1.1	1.6	3.14
18:4	2.6	2.8	0.6	4.0	-
19:0	0.6	-	0.7	-	-
20:0	-	-	-	-	0.9
20:1	8.8	9.4	4.0	-	0.73
20:2	0.5	-	0.6	1.6	-
20:3	0.1	-	0.1	-	-
20:4	1.0	0.4	0.1	2.0	0.40
20:5	8.0	8.6	13.6	12.9	6.08
22:1	5.3	11.6	3.5	-	1.52
22:2	1.1	-	1.8	-	1.86
22:4	0.3	-	0.6	-	-
22:5	1.3	1.3	3.1	2.3	4.34
22:6	14.3	7.6	18.9	14.0	15.68

24:1	0.5	0.9	1.1	-	-
------	-----	-----	-----	---	---

*Ο πρώτος αριθμός δείχνει τον αριθμό ατόμων άνθρακα και ο δεύτερος των διπλών δεσμών [12].

Πολυακόρεστα Λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) στα ιχθυέλαια.

Οι πιο σημαντικές κατηγορίες πολυακόρεστων οξέων, δηλαδή λιπαρών οξέων που έχουν δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς, είναι τα ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα. Η ονοματολογία των ακόρεστων αυτών λιπαρών οξέων προκύπτει από τον αριθμό των ατόμων άνθρακα μεταξύ του διπλού δεσμού και της τελευταίας μεθυλομάδας που συμβολίζονται με ω και έναν αριθμό. Πιο συγκεκριμένα για το λινελαϊκό οξύ που το τέλος της αλυσίδας του είναι $\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{CH}=\text{CH}-$ αναφέρεται ως ω-6 λιπαρό οξύ, ενώ το λινολενικό οξύ ως ω-3 λιπαρό οξύ. Το ανθρώπινο σώμα δε μπορεί να συνθέσει ορισμένα λιπαρά οξέα για αυτό πρέπει να προσλαμβάνονται από τη διατροφή. Η συνιστώμενη ημερήσια δόση ω-3 λιπαρών οξέων είναι 1-2g/ημέρα και η συνιστώμενη αναλογία τους είναι ω-6:ω-3=6:1 [11].

Τα ψάρια είναι γνωστό ότι αποτελούν την κύρια πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs), έτσι οι άνθρωποι προσλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος αυτών των απαραίτητων λιπαρών οξέων καταναλώνοντας ψάρια, υδρόβια ασπόνδυλα και φύκια. Η σύνθεση λιπαρών οξέων από τα ψάρια εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων του είδους του ψαριού, της διατροφής του, καθώς και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η αλατότητα, η θερμοκρασία, η εποχή, η γεωγραφική θέση και από το εάν τα ψάρια είναι άγρια ή εκτρεφόμενα. Η περιεκτικότητα σε PUFAs στα θαλάσσια ψάρια είναι μεγαλύτερη από εκείνη των ψαριών του γλυκού νερού, ενώ επίσης τα άγρια ψάρια παρουσιάζουν και αυτά μεγαλύτερο ποσοστό PUFAs από τα εκτρεφόμενα. Το ιχθυέλαιο που παράγεται από θαλάσσια ψάρια περιέχει συνήθως σημαντικό αριθμό PUFAs με τις μεγαλύτερες αλυσίδες (>20 άτομα άνθρακα), ενώ το ιχθυέλαιο που προέρχεται από ψάρια του γλυκού νερού αποτελείται από PUFAs με μικρότερα μήκη αλυσίδας (<20 άτομα άνθρακα).

Μεταξύ των λιπαρών οξέων, τα μακράς αλύσου πολυακόρεστα ω-3 λιπαρά οξέα, και ιδιαίτερα το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (22:5, eicosapentaenoic acid, EPA) και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (22:6, docosahexaenoic acid, DHA) επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία, την πρώιμη ανάπτυξη και την πρόληψη ορισμένων ασθενειών. Τα ψάρια, όπως προαναφέρθηκε, αποτελούν την κύρια πηγή αυτών των λιπαρών οξέων. Λιπαρά ψάρια όπως οι σαρδέλες, το σκουμπρί και ορισμένα είδη σολομού είναι πλούσια σε EPA και DHA. Τα ψάρια δεν μπορούν να συνθέσουν αυτά τα λιπαρά οξέα, ωστόσο τα αποκτούν από τη διατροφή τους καταναλώνοντας τρόφιμα όπως άλγη και πλακτόν [15].

Το ιχθυέλαιο περιέχει κυρίως λίπη και λιπαρά οξέα, τα οποία μπορούν να περιέχουν βιταμίνη Α, βιταμίνη D, χοληστερόλη, μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, τριγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια και στερολεστέρες. Από αυτά τα συστατικά, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι εστέρες διότι συνδέονται με βιοδραστικές ουσίες. Η συνήθης σύνθεση των λιπαρών οξέων του εκχυλίσματος ιχθυελαίου μπορεί να διαιρεθεί σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Τα κύρια λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα ιχθυέλαια φαίνονται στον Πίνακα 3.

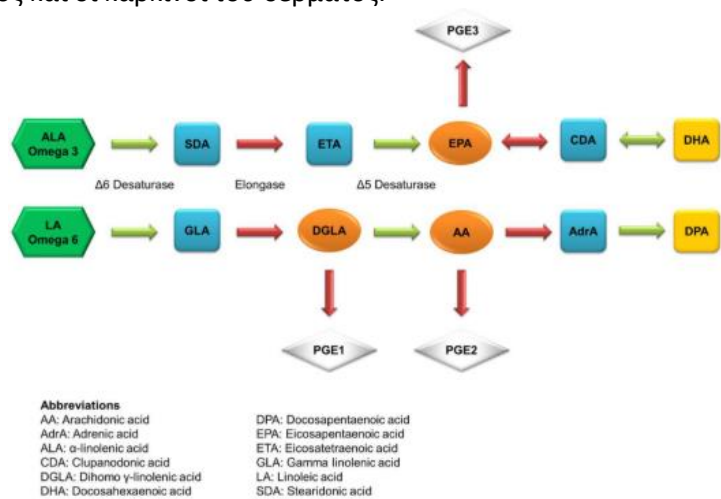
Πίνακας 3: Κύρια λιπαρά οξέα που απαντώνται στα ιχθυέλαια.

Λιπαρά οξέα ιχθυελαίων	
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	μυριστικό οξύ (14:0) παλμιτικό οξύ (16:0) στεατικό οξύ (18:0) βεχενικό οξύ (22:0)
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα	μυριστολεϊκό οξύ (14:1 ω-5) παλμιτολεϊκό οξύ (16:1 ω-7) ελαϊκό οξύ (18:1 ω-9) εικοσενοϊκό οξύ (20:1 ω-9) γαδολεϊκό οξύ (22:1 ω-9) κατιολικό οξύ (22:1 ω-11)
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	λινελαϊκό οξύ (LA, 18:2 ω-6) α-λινολενικό οξύ (ALA, 18:3 ω-3)

εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA, 22:6 ω-3) εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA, 22:5 ω-3)

Το λινελαϊκό οξύ (LA) και το α-λινολενικό οξύ (ALA), δηλαδή τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με τις αλυσίδες μικρότερου μήκους (18 άτομα άνθρακα), είναι οι πρόδρομες ουσίες για τη σύνθεση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ω-3 και ω-6 με μεγαλύτερα μήκη αλυσίδων. Και τα δύο λιπαρά οξέα είναι άφθονα σε ιχθυέλαιο, φιστίκια, έλαιο κανόλα και φυτικό έλαιο. Το λινελαϊκό οξύ (LA) και το α-λινολενικό οξύ (ALA) έχουν παρόμοιες χημικές δομές αλλά διαφορετικές λειτουργίες στο ανθρώπινο σώμα.

Το λινελαϊκό οξύ (LA) είναι το κυρίαρχο ω-6 σε ιχθυέλαια, και είναι απαραίτητο τόσο για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή όσο και για τη λειτουργία του δέρματος, καθώς είναι το πλουσιότερο λιπαρό οξύ στο επιδερμικό στρώμα. Πολλά ω-3 λιπαρά οξέα παράγονται από το α-λινολενικό οξύ (ALA), συμπεριλαμβανομένων των DHA και EPA, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Το ALA βρίσκεται σε μεγάλο βαθμό σε φυτικά έλαια, ζωπλαγκτόν, φυτοπλαγκτόν και ιχθυέλαια, και είναι απαραίτητο για την όραση και τις λειτουργίες εγκεφάλου επηρεάζοντας την ρευστότητα της μεμβράνης, διότι τα PUFAs και τα παράγωγα τους εντοπίζονται κυρίως στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης. Τα παράγωγα του λινελαϊκού οξέος (ALA) μπορούν να επηρεάσουν την ανοσοαπόκριση της επιδερμίδας ανακουφίζοντας τις φλεγμονώδεις δερματοπάθειες όπως η ακμή, η ψωρίαση, η δερματίτιδα, ο λύκος και οι καρκίνοι του δέρματος.



Εικόνα 5: Μεταβολικό μονοπάτι για την παραγωγή EPA, DHA και DPA.

Το DHA και το EPA έχουν χρησιμοποιηθεί διατροφικά και θεραπευτικά σε διάφορες ασθένειες. Το DHA κυρίως βρίσκεται στον αμφιβληστροειδή και τον εγκέφαλο για να διατηρήσει τη συνοχή της μεμβράνης και τη δραστηριότητα των ενζύμων που συνδέονται με αυτήν. Η έλλειψη DHA εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της γήρανσης και σε περιπτώσεις άνοιας, παρεμποδίζοντας τη μνήμη και τη μάθηση και προάγοντας τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Alzheimer, παράλληλα φαίνεται να βοηθάει στην αναστολή του όγκου σε διάφορα είδη καρκίνων. Ανάλογα, με το DHA το EPA χρησιμοποιείται για την πρόληψη ή τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών λόγω της αντιφλεγμονώδους και νευροπροστατευτικής δράσης του [16].

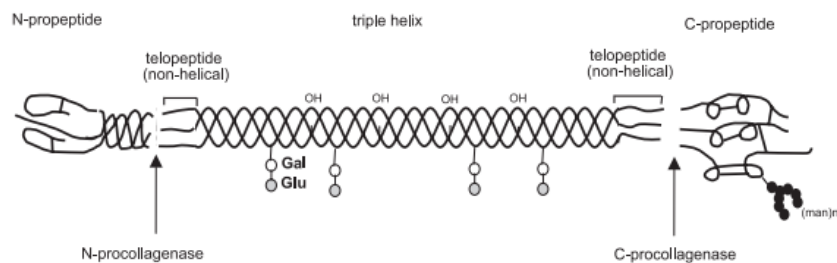
2.1.2.3 Κολλαγόνο

Το κολλαγόνο είναι η κύρια πρωτεΐνη του συνδετικού ιστού στα ζώα και είναι η πλέον άφθονη πρωτεΐνη στα θηλαστικά, αποτελώντας το 25% της συνολικής τους περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες. Είναι μια από τις μακρές αλύσου, ινώδεις, δομικές πρωτεΐνες των οποίων οι λειτουργίες είναι διαφορετικές από τις σφαιρικές πρωτεΐνες, όπως είναι τα ένζυμα. Οι ίνες κολλαγόνου είναι βασικό συστατικό της εξωκυτταρικής μήτρας που υποστηρίζει τους περισσότερους ιστούς και δίνει την εξωτερική δομή στα κύτταρα, σε ορισμένα κύτταρα συναντάται και στο εσωτερικό τους. Το κολλαγόνο έχει μεγάλη αντοχή σε εφελκυσμό και αποτελεί το κύριο συστατικό του χόνδρου, των συνδέσμων, των τενόντων, των οστών και των δοντιών. Το κολλαγόνο μαζί με την κερατίνη, είναι

υπεύθυνο για την αντοχή και την ελαστικότητα του δέρματος και η υποβάθμιση του οδηγεί σε ρυτίδες που συνοδεύουν τη γήρανση, ενισχύει τα αιμοφόρα αγγεία και βοηθάει την ανάπτυξη των ιστών. Χρησιμοποιείται, επίσης, στην αισθητική και επεμβατική χειρουργική [17].

Ο όρος κολλαγόνο χρησιμοποιείται για να περιγράψει πρωτεΐνες που σχηματίζουν μια χαρακτηριστική τριπλή έλικα τριών πολυπεπτιδικών αλυσίδων και όλα τα μέλη της οικογένειας του κολλαγόνου σχηματίζουν αυτές τις δομές στην εξωκυτταρική μήτρα αν και διαφέρουν ως προς το μέγεθος, τη λειτουργία και την κατανομή τους στους ιστούς. Μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί 26 γενετικά διακριτοί τύποι κολλαγόνου.

Οι διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου χαρακτηρίζονται από σημαντική πολυπλοκότητα και ποικιλομορφία στη δομή τους, σε παραλλαγές ματίσματος, σε παρουσία επιπρόσθετων μη ελικοειδών περιοχών, σε διαφορετική συνδεσμολογία των δομικών μονάδων και εν τέλη διαφορετική λειτουργία. Η κύρια κατηγορία κολλαγόνου είναι αυτή που σχηματίζει ινίδια, αποτελώντας το 90% του συνολικού κολλαγόνου. Παρά τη μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των διάφορων τύπων κολλαγόνου, όλα τα μέλη της οικογένειας του κολλαγόνου έχουν δεξιόστροφη τριπλή έλικα αποτελούμενη από τρεις α-αλυσίδες. Στο κολλαγόνο τύπου II,III,VII,VIII και X οι τρεις αυτές αλυσίδες είναι ταυτόσημες, ενώ στο κολλαγόνο τύπου I,IV,V,VI,IX και XI η έλικα αποτελείται από δύο ή περισσότερες διαφορετικές αλυσίδες [18]. Η τριπλή αυτή έλικα σταθεροποιείται κυρίως από δεσμούς που δημιουργούνται εσωτερικά μεταξύ των αλυσίδων, και είναι το προϊόν μια σχεδόν συνεχούς επανάληψης της αλληλουχίας Gly-X-Y, όπου του X είναι κυρίως προλίνη και το Y κυρίως υδροχυπρολίνη. Μόνο οι πολύ μικρές N- και C- τερματικές περιοχές που ονομάζονται τελοπεπτίδια δε σχηματίζουν τις τριπλές ελικοειδής δομές. Τέσσερα έως οκτώ μόρια κολλαγόνου σταθεροποιούνται και συνδέονται μέσω ομοιοπολικών δεσμών για να αποτελέσουν την βασική μονάδα των ινιδίων κολλαγόνου. Έτσι, η τυπική ισχυρή, άκαμπτη φύση των δερμάτων, των τενόντων και των ιστών οφείλεται στη βασική δομή που σχηματίζεται από πολλά συνδεδεμένα ινίδια κολλαγόνου [19].



Εικόνα 6: Μοριακή δομή των ινιδίων του κολλαγόνου (τύπος I κολλαγόνου), που παρουσιάζει τη τριπλή έλικα και τις τερματικές περιοχές N-,C-.

Πίνακας 4: Τα είδη κολλαγόνου και η κατανομή τους στους ιστούς.

Είδος κολλαγόνου	Κατανομή στους ιστούς
I	κόκκαλα, χόριο δέρματος, τένοντας, συνδέσμους, κερατοειδής χιτώνας
II	χόνδρος, υαλοειδές σώμα, πηκτοειδής πυρήνας
III	δέρμα, τοιχώματα αγγείων, ίνες των περισσότερων ιστών (πνεύμονες, συκώτι, σπλήνα κ.λ.π.)
V	πνεύμονες, κερατοειδής χιτώνας, οστά, εμβρυϊκές μεμβράνες
XI	χόνδρος, υαλοειδές σώμα
IV	βασικές μεμβράνες
VI	χόριο δέρματος, χόνδρος, πλακούντας, πνεύμονες, τοιχώματα αγγείων, μεσοσπονδύλιος δίσκος
VII	δέρμα, δερματικές-επιδερμικές συνδέσεις, στοματική βλεννογόνο, τράχηλος
VIII	ενδοθηλιακά κύτταρα, μεμβράνη Descemet (κερατοειδής χιτώνας)
X	υπερτροφικός χόνδρος
IX	χόνδρος, υαλοειδής χιτώνας, κερατοειδής χιτώνας
XII	περιχόνδριος δακτύλιος, συνδέσμους, τένοντες
XIV	χόριο δέρματος, τένοντας, τοιχώματα αγγείων, πλακούντας, πνευμόνια, συκώτι
XIX	ανθρώπινο ραβδομυοσάρκωμα
XX	επιθήλιο του κερατοειδούς, εμβρυϊκό δέρμα, χόνδρος, τένοντας
XXI	τοιχώματα αιμοφόρων αγγείων
XIII	επιδερμίδα, θυλάκιο τριχών, έντερο, χονδροκύτταρα, πνεύμονες, ήπαρ
XVII	δερματικές-επιδερμικές συνδέσεις
XV	ινοβλάστες, κύτταρα λείου μυός, νεφρά, πάγκρεας
XVI	ινοβλάστες, αμνιακός σάκος, κερατινοκύτταρα
XVIII	πνευμόνια, συκώτι

Οι ίνες του κολλαγόνου είναι συνήθως λευκές, αδιαφανείς και αναγνωρίζονται εύκολα στους ιστούς. Το κολλαγόνο είναι ένα ιξωδοελαστικό υλικό που παρουσιάζει υψηλή αντοχή εφελκυσμού και χαμηλή εκτασιμότητα. Το ισοηλεκτρικό σημείο του κολλαγόνου είναι περίπου $pI = 5.8$ ενώ η θερμοκρασία συρρίκνωσης των ινιδίων στα περισσότερα θηλαστικά είναι $T_s = 62-65^\circ C$, ενώ στα ψάρια είναι $T_s = 38-54^\circ C$. Ενώ η θερμοκρασία μετουσίωσης είναι $25^\circ C-30^\circ C$ μικρότερη από τη θερμοκρασία συρρίκνωσης. Το κολλαγόνο είναι ένα μόριο με χαμηλή ανοσογονικότητα, με μειωμένες πιθανότητες να μην γίνει αποδεκτό από τον δέκτη [20].

Κολλαγόνο προερχόμενο από ψάρια

Το κολλαγόνο, που λαμβάνεται συνήθως από δέρμα βοοειδών και χοίρων, χρησιμοποιείται εκτενώς για φαρμακευτικούς και καλλυντικούς σκοπούς. Ωστόσο, η εκδήλωση ορισμένων μεταδοτικών ασθενειών, όπως η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών και ορισμένα θρησκευτικά ζητήματα που συνδέονται με τη χρήση πρωτεϊνών από βοοειδή, παρεμποδίζουν τη χρήση τους [21]. Ως εκ τούτου, κρίθηκε αναγκαία η εύρεση μια εναλλακτικής πηγής κολλαγόνου έχοντας ως αποτέλεσμα να στραφεί το ενδιαφέρον προς τις θαλάσσιες πηγές. Το προερχόμενο από ψάρια κολλαγόνο το 2007 αντιστοιχούσε σε ποσοστό μικρότερο του 1,5% του συνολικού παραγόμενου κολλαγόνου, ωστόσο το ποσοστό αυτό ήταν διπλάσιο από τα στοιχεία της αγοράς το 2002, γεγονός που φανερώνει ότι η παραγωγή κολλαγόνου από εναλλακτικά – μη θηλαστικά είδη έχει αυξηθεί. Εκτός από τις κοινωνικοπολιτισμικές και υγειονομικές πτυχές, το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ορθή χρήση των αποβλήτων από τις ιχθυοβιομηχανίες είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους η εξερεύνηση διάφορων ειδών και η βελτιστοποίηση της εκχύλισης κολλαγόνου από ψάρια έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον τη τελευταία δεκαετία [19].

Παρόλο που τα ψάρια αποτελούνται κατά 75% του βάρους τους από δέρμα, κόκκαλα, κεφάλι και λέπια, συχνά αυτά απορρίπτονται ως απόβλητα από τις από τις βιομηχανίες επεξεργασίας ψαριών.

Ωστόσο τα προϊόντα αυτά είναι μια πλούσια πηγή κολλαγόνου και βιοδραστικών ουσιών. Το κολλαγόνο που συνήθως απαντάται στα ψάρια είναι ινώδες τύπου I, και βρίσκεται κυρίως στα κόκκαλα και στο δέρμα [21].

2.1.3 Καλλυντικές και θεραπευτικές εφαρμογές συστατικών *L. Sceleratus*

2.1.3.1 Τετραδοτοξίνη

Μια εφαρμογή της τετραδοτοξίνης στη κοσμετολογία θα μπορούσε να αποτελεί η εισαγωγή της σε ενέσιμα σκευάσματα τύπου *Botox*. Η ήδη χρησιμοποιούμενη τοξίνη σε αυτά τα σκευάσματα είναι η αλλαντική νευροτοξίνη (*botulinum neurotoxins*), μια νευροτοξική πρωτεΐνη που παράγεται από τον αναερόβιο σχηματισμό σποριών του βακτηρίου *Clostridium botulinum*. Η αλλαντική τοξίνη είναι μια από τις πιο δραστικές τοξίνες που είναι γνωστές στην ανθρωπότητα, που οδηγεί στο θάνατο του ασθενούς λόγω της παράλυσης των αναπνευστικών μυών. Εκκρίνεται στα τρόφιμα από το βακτήριο, που αναπτύσσεται όταν βρεθεί στις κατάλληλες συνθήκες, αποτελώντας μεγάλο κίνδυνο για τη βιομηχανία τροφίμων. Η θανατηφόρα δόση για ένα άτομο που προσέλαβε τη τοξίνη δια στόματος είναι περίπου 30 ng, για εισαγωγή στο σώμα μέσω της αναπνευστικής οδού 0,8-0,9 μg, ενώ τέλος για ενέσιμη μορφή 0,09-0,15 μg. Το *Botox* χρησιμοποιείται κυρίως για τη μείωση των ρυτίδων του προσώπου, και αποτελεί μια ασφαλή και αποτελεσματική θεραπεία. Ένα φιαλίδιο *Botox* περιέχει 100 units καθαρής νευροτοξίνης που παράγεται από το *C. Botulinum*, 0,5mg αλβουμίνης και 0,9 mg χλωριούχου νατρίου. Η θανατηφόρος δόση *Botox* για έναν άνθρωπο 70 kg είναι 2500- 3000 units [22].

2.1.3.2 Λιπαρά Οξέα

Η επίδραση των ιχθυελαίων στην πρόληψη και στη θεραπεία διάφορων ασθενειών έχει μελετηθεί για περισσότερο από 50 χρόνια. Τα ιχθυέλαια που είναι πλούσια σε λιπαρά οξέα δείχνουν να έχουν σημαντικά οφέλη για την υγεία. Στα εκχυλίσματα των ιχθυελαίων βρίσκονται μεγάλα ποσά πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (*PUFAs*), με κυρίαρχα το *DHA* και το *EPA*. Εκτός από τις βιταμίνες και τα μέταλλα, τα ιχθυέλαια είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα διατροφικά συμπληρώματα σε ηλικιωμένους άνω των 65 ετών. Τα *PUFAs* σε ιχθυέλαια έχουν αποδειχθεί ωφέλιμα για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της ψωρίασης, της ελκώδους κολίτιδας, του άσθματος, της νόσου Parkinson, της οστεοπόρωσης, του σακχαρώδους διαβήτη, των καρδιαγγειακών επεισοδίων, του καρκίνου και της κατάθλιψης. Επίσης, φαίνεται ότι τα *PUFAs* επιδεικνύουν ευεργετική δράση στην ανάπτυξη των νευρικών, ανοσολογικών, οπτικών και δερματικών συστημάτων.

Τα οφέλη του ιχθυελαίου αποδίδονται κυρίως στα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, τα οποία απαντώνται κυρίως σε λιπαρά ψάρια. Δεδομένου ότι το ήπαρ των ψαριών έχει υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια, τα περισσότερα ιχθυέλαια προέρχονται από την ηπατική περιοχή. Τα σκευάσματα ιχθυελαίου που κυκλοφορούν στην αγορά προέρχονται από διάφορα είδη ψαριών συμπεριλαμβανομένων των καρχαριών, των τόνων, των μπακαλιάρων, του σκουμπριού και της ρέγγας. Η σύνθεση των ω-3 λιπαρών οξέων στα διάφορα εμπορικά σκευάσματα εξαρτάται από την πηγή των ψαριών, το τμήμα του σώματος των ψαριών και τις μεθόδους εξαγωγής των ελαίων που χρησιμοποιούνται. Η αυξανόμενη έρευνα στους τομείς της κοσμετολογίας και της δερματολογίας φανερώνει το όφελος της λήψης ιχθυελαίων για το δέρμα. Η έλλειψη των *PUFAs* μπορεί να προκαλέσει αυξημένη διαδερμική απώλεια νερού, έχοντας ως συνέπεια τον ανεπαρκή λειτουργία του δέρματος ως φραγμού. Επιπλέον, η ανεπάρκεια σε *PUFAs* προκαλεί αύξηση στη ρύθμιση των πολλαπλασιαστικών κερατινών, *K6* και *K16*, καθώς και της κερατίνης *K17* που σχετίζεται με τις φλεγμονές. Από τα παραπάνω ευρήματα έγινε σαφής η σημασία των *PUFAs* για την επιδερμική ομοιόσταση. Η εφαρμογή του ιχθυελαίου σε καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα αναμένεται να αλλάξει το τοπίο της δερματολογικής θεραπείας. Η θεραπεία με βάση το ιχθυέλαιο φαίνεται να αντιμετωπίζει διάφορες παθήσεις του δέρματος όπως φωτογήρανση, καρκίνο του δέρματος, δερματίτιδα, μελανογένεση και δερματική μόλυνση.

Φωτογήρανση

Η γήρανση του δέρματος διακρίνεται σε φυσική γήρανση και σε φωτογήρανση. Η φωτογήρανση προκαλείται από βλάβες που δημιουργούνται στο δέρμα λόγω υπέρμετρης έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) από το ηλιακό φως, προκαλώντας δυσμενείς επιπτώσεις στο δέρμα, όπως ηλιακό

έγκαυμα, φωτοευαισθησία, φλεγμονή, ανοσοκαταστολή και φωτοκαρκινογένεση. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των ιχθυελαίων φαίνεται να σχετίζονται με την προστασία του δέρματος από την υπεριώδη ακτινοβολία.

Δερματική καρκινογένεση

Ο πιο διαδεδομένος παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη δερματικών καρκίνων είναι η UV-B (280-315nm) ακτινοβολία, ενώ φαίνεται επίσης ότι η UV-A ακτινοβολία (315-400nm) προκαλεί και αυτή προκαρκινογόνο δράση στο δέρμα. Το οξειδωτικό στρές, οι φλεγμονές και η καταστολή της δερματικής ανοσίας ενισχύουν την καρκινογένεση του δέρματος από UV ακτινοβολία. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν τόσο τη φάση έναρξης όσο και την προώθηση της δερματικής καρκινογένεσης, και πιστεύεται ότι τα συνδυασμένα αντικαρκινικά φάρμακα με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μπορεί να είναι πλεονεκτικά για την επίτευξη συνεργικής αναστολής της καρκινογένεσης.

Δερματίτιδα

Η δερματίτιδα είναι μια φλεγμονώδης δερματική νόσος που προκαλεί κνησμό, ο έντονος κνησμός έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της λειτουργίας του φραγμού του δέρματος με αποτέλεσμα να εισχωρήσουν στο δέρμα βακτήρια και αλλεργιογόνοι παράγοντες, ενώ παράλληλα σημαντική είναι και η απώλεια νερού και λίπους. Τα ιχθυέλαια και τα περιεχόμενα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα φαίνεται να είναι χρήσιμα για τη βελτίωση των συμπτωμάτων της δερματίτιδας. Πιο συγκεκριμένα, έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η από στόματος χορήγηση ιχθυελαίων μείωσε τη δερματική ξηρότητα και τον κνησμό.

Πληγές του δέρματος

Οι δερματικές πληγές, όπως εγκαύματα δευτέρου βαθμού, χρόνιες πληγές και έλκη, απασχολούν καθημερινά εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο. Αν και υπάρχουν πολλά επιθέματα για τις πληγές, είναι αναγκαία η ανάπτυξη προϊόντων για την επούλωση των δερματικών πληγών. Η επούλωση των τραυμάτων χωρίζεται σε τρία στάδια: τη φλεγμονώδη απόκριση, το πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση. Τα PUFAs παίζουν βασικό ρόλο στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης αλλά και στις διεργασίες του αναβολισμού κατά την ανάπλαση του δέρματος. Ενώ είναι πιθανό τα πολυακόρεστα ωμέγα-3 και ωμέγα-6 λιπαρά οξέα να διαμορφώνουν ή να ενισχύουν την τοπική φλεγμονώδη απόκριση στις περιοχές των πληγών, επιταχύνοντας το ρυθμό της επούλωσης.

Παρά τα οφέλη του ένα ολικό εκχύλισμα λιπαρών οξέων προερχόμενο από ψάρια περιέχει και άλλα συστατικά, για αυτό είναι δύσκολο να ελεγχθεί με ακρίβεια η ποιότητα του. Η μεγάλη ποικιλία των ψαριών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ιχθυελαίου περιπλέκουν επίσης τον έλεγχο της ποιότητας του. Ο τύπος του ψαριού και το ποσοστό των PUFAs στο ιχθυέλαιο είναι σημαντικοί παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την χρήση τους στο δέρμα. Επιπρόσθετα, στη βιοδραστικότητα του ιχθυελαίου μπορεί να συμβάλλουν και άλλα συστατικά όπως η βιταμίνη A, η βιταμίνη D, η ρετινόλη και το σελίνιο, για αυτό θεωρείται σκόπιμο να εξετασθούν και αυτά τα συστατικά πέρα από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Ο κύριος κίνδυνος για την υπέρμετρη χορήγηση ωμέγα-3 PUFAs είναι η πιθανότητα να αυξηθεί ο κίνδυνος αιμορραγίας λόγω της αντιπηκτικής δράσης τους. Σε μερικές περιπτώσεις αναφέρεται, επίσης, η διαταραχή του γαστρεντερικού συστήματος από το διατροφικό ιχθυέλαιο. Για τους παραπάνω λόγους θεωρείται σκόπιμη η εύρεση της βέλτιστης χορηγούμενης ποσότητας ιχθυελαίου ή ωμέγα-3 λιπαρών οξέων έτσι ώστε τα σκευάσματα που τα περιέχουν να είναι αποτελεσματικά χωρίς να είναι τοξικά για τον χρήστη [16].

2.1.3.3 Κολλαγόνο

Το κολλαγόνο είναι γνωστό ότι έχει άμεση επίδραση στη πρόληψη αντιμετώπισης της γήρανσης του δέρματος, η οποία προκαλείται λόγω σοβαρής έκθεσης στην υπεριώδη ακτινοβολία ή λόγω του γήρατος. Όταν το κολλαγόνο υποστεί βλάβη δημιουργούνται ρυτίδες στο δέρμα και μειώνεται η ελαστικότητα του. Έρευνες έχουν δείξει ότι οι κατεστραμμένες ίνες του κολλαγόνου μπορούν να αντικατασταθούν από νέες μέσω της λήψης της υδρολυόμενης πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην αύξηση της παραγωγής κολλαγόνου για την βελτίωση της όψης του δέρματος. Έτσι, η βιομηχανία καλλυντικών κατέβαλε μεγάλες προσπάθειες για την ενσωμάτωση του κολλαγόνου σε διάφορα προϊόντα. Η μεγάλη διαθεσιμότητα του κολλαγόνου, η βιοσυμβατότητα και η

βιοαποικοδομησιμότητα του έχουν κάνει το κολλαγόνο προϊόν αναφοράς για τη βιομηχανία των καλλυντικών [20].

Το κολλαγόνο που παράγεται από τα θαλάσσια είδη έχει την ικανότητα να επιβραδύνει το σχηματισμό των ελεύθερων ριζών και επομένως είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την δημιουργία προϊόντων φροντίδας του δέρματος. Επιπλέον, το κολλαγόνο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη κατασκευή ικριωμάτων στη μηχανική των ιστών λόγω των εξαιρετικά βιοδραστικών ιδιοτήτων του, συμπεριλαμβανομένης της βιοσυμβατότητας, της υψηλής βιοδιασπασιμότητας, του δυναμικού ανάπτυξης των κυττάρων και λόγω του ότι δεν προκαλεί ανοσολογική απόκριση στον δέκτη.

Το προερχόμενο από ψάρια κολλαγόνο απορροφάται πιο εύκολα από το δέρμα συγκριτικά με το κολλαγόνο που προέρχεται από ζωικές πηγές. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε καλλυντικές κρέμες που προστέθηκε κολλαγόνο, προκειμένου να αξιολογηθεί η ενυδάτωση και η ενίσχυση του δέρματος, έδειξαν ότι τα σκευάσματα serum που περιείχαν κολλαγόνο προσέφεραν καλύτερη ενυδάτωση του δέρματος σε γρήγορο χρονικό διάστημα, ενώ τα σκευάσματα των κρεμών φάνηκαν να γίνονται πιο ενεργά σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές. Εντούτοις, κατά τη θεραπεία παρατηρήθηκε σύσφιξη του δέρματος χρησιμοποιώντας τόσο τη κρέμα όσο και το serum [21].

Οι τύποι κολλαγόνου που χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά είναι οι I, II και III, καθώς σχηματίζουν τα δομικά ινίδια των ιστών και είναι οι σημαντικότεροι και πιο άφθονοι τύποι κολλαγόνου. Οι άλλοι τύποι κολλαγόνου δεν έχουν χρησιμοποιηθεί σε καλλυντικά διαλύματα καθώς συμμετέχουν κυρίως στη σύνδεση των ινιδίων με άλλα ινίδια. Ο τύπος I κολλαγόνου είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο είδος κολλαγόνου στη βιομηχανία των καλλυντικών λόγω της υψηλής βιοσυμβατότητας του με το ανθρώπινο σώμα. Πιο συγκεκριμένα, το κολλαγόνο τύπου I χρησιμοποιείται ως συστατικό σε καλλυντικά, οδοντικά σύνθετα, πρότυπα αναγέννησης δερμάτων, βιοδιασπώμενες μήτρες καθώς και σε οφθαλμολογικά σκευάσματα.

Η χρήση του κολλαγόνου στα καλλυντικά έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη κρεμών και πηκτωμάτων με υψηλή ενυδατική, αντιγηραντική και αντιρυτιδική δράση, που προσδίδουν προστασία από τις UV ακτινοβολίες και βοηθούν στην επούλωση των τραυμάτων. Επίσης, η προσθήκη του σε καλλυντικά σκευάσματα σχετίζεται και με τις ιδιότητες σχηματισμού φιλμ, καθώς όταν εφαρμόζεται καλύπτει το δέρμα και μειώνει την διαδερμική απώλεια νερού, προστατεύοντας το δέρμα από διαβρωτικά στοιχεία [20].

2.2 Εγκλεισμός βιοδραστικών ουσιών

Ο εγκλεισμός ουσιών σε μικροδομές ή νανοδομές είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται προκειμένου να γίνει η ενσωμάτωση μιας βιοδραστικής ουσίας μέσα σε μια άλλη ουσία, τη μήτρα, παράγοντας έτσι σωματίδια ή ίνες με διάμετρο λίγων νανόμετρων έως μερικών χιλιοστών [23]. Ο εγκλεισμός μπορεί, επίσης, να εκφραστεί ως η επικάλυψη στερεών, υγρών ή αερίων συστατικών, ενζύμων, μικροοργανισμών, κυττάρων ή άλλων ουσιών, με μήτρα που έχει ως βάση πρωτεΐνες ή υδατάνθρακες. Ο εγκλεισμός διακρίνεται σε νανοεγκλεισμό με διάμετρο σωματιδίων/ινών μικρότερη από 0.2μm, μικροεγκλεισμό με διάμετρο σωματιδίων/ινών 0,2μm έως 5μm και μακροεγκλεισμό με διάμετρο σωματιδίων/ινών μεγαλύτερη από 5μm.

Ένα από τα σημαντικότερα βήματα για την πραγματοποίηση του εγκλεισμού είναι η επιλογή του κατάλληλου υλικού που θα λειτουργήσει ως μήτρα. Η επιλογή αυτή γίνεται με βάση τη βιοδραστική ουσία και τα επιθυμητά χαρακτηριστικά το τελικού προϊόντος. Επίσης, πρέπει να δοθεί προσοχή σε μερικά από τα χαρακτηριστικά του υλικού που πρόκειται να εγκλειστεί, ώστε να επιτευχθούν οι επιθυμητές ιδιότητες. Η φυσικοχημική δομή των βιοσυμβατών ενώσεων, ο χρόνος αναμονής του μέσου εγκλεισμού, οι συνθήκες αποθήκευσης του εγκλεισμένου υλικού, το μέγεθος και η πυκνότητα των υλικών που πρόκειται να εγκλειστούν καθώς και το οικονομικό κόστος της διαδικασίας είναι μερικοί παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψιν [24].

2.2.1 Εφαρμογές εγκλεισμού

Η τεχνολογία του εγκλεισμού χρησιμοποιείται σήμερα σε πολλούς διαφορετικούς τομείς όπως η φαρμακολογία, η χημεία, τα καλλυντικά, η ιατρική, η βιοτεχνολογία και τα τρόφιμα προσφέροντας ένα ευρύ φάσμα δυνατοτήτων για τη βελτίωση των λειτουργικών ιδιοτήτων του προϊόντος. Στις

χρησιμοποιούμενες μεθόδους εγκλεισμού που σκοπό έχουν να προστατέψουν διάφορα ωφέλιμα συστατικά, που είναι κυρίως στερεά ή υγρά έλαια, όπως βιταμίνες, συστατικά που περιέχουν κάποιο άρωμα, ανόργανα συστατικά, συστατικά που περιέχουν κάποιο χρώμα (β-καροτένιο, λυκοπένιο), λιπαρά οξέα (ω-3 λιπαρά οξέα, λινολεϊκό οξύ) και ένζυμα, τα οποία εγκλείονται με προστατευτικό υλικό παρέχοντας πολλά οφέλη.

Ο εγκλεισμός πραγματοποιείται σε γενικές γραμμές για τη στερεοποίηση υγρών ώστε να είναι εύκολη η μεταφορά τους, για την αποτροπή απώλειας πτητικών ουσιών λόγω εξάτμισης, για την απόκρυψη κάποιας ανεπιθύμητης γεύσης και οσμής, για προστασία από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, για αύξηση της σταθερότητας και παράταση της διάρκειας δράσης της βιοδραστικής ουσίας [24].

2.2.1.1 Βιομηχανία των καλλυντικών

Ο τομέας των καλλυντικών και των προϊόντων προσωπικής φροντίδας είναι μια διεθνής αγορά με μεγάλη ισχύ που αναπτύσσεται διαρκώς. Προκειμένου να είναι ανταγωνιστικά τα προϊόντα εφαρμόζονται συνεχώς καινοτομίες που βασίζονται σε αναδυόμενες τεχνολογίες όπως είναι ο μικρο- και ο νανο- εγκλεισμός. Τα προϊόντα καλλυντικών και προσωπικής φροντίδας περιέχουν συχνά βιοδραστικές ουσίες που είναι ασταθής και ευαίσθητες στη θερμοκρασία, το pH, το φως και την οξειδωση. Οι ουσίες αυτές ενδέχεται να υποστούν ανεπιθύμητες αντιδράσεις που οδηγούν σε μείωση ή απώλεια της αποτελεσματικότητας τους ή ακόμα και να οδηγήσουν στην υποβάθμιση του καλλυντικού προϊόντος. Συνεπώς, έχουν προταθεί τεχνολογίες εγκλεισμού για την αύξηση της σταθερότητας, την προστασία από την αποικοδόμηση και της στοχευμένης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης των δραστικών ουσιών. Ο μικρο- και ο νανο- εγκλεισμός έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη καλλυντικών συνθέσεων που είναι πιο σταθερές, πιο αποτελεσματικές, και με βελτιωμένες αισθητικές ιδιότητες.

Ο μικρό/νάνο εγκλεισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε καλλυντικές εφαρμογές όπως τα αφρόλουτρα, κρέμες και λοσιόν, προϊόντα για τα μαλλιά, αντηλιακά και κρέμες μαυρίσματος, προϊόντα μακιγιάζ, αρώματα, σαπούνια, πάστες δοντιών και άλλα. Ο εγκλεισμός μπορεί να συμβάλει στη βελτίωση της βιομηχανίας καλλυντικών και προσωπικής φροντίδας καθώς επιτρέπει την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, ανταποκρινόμενα στις ανθρώπινες ανάγκες και επιθυμίες.

Όπως προαναφέρθηκε μια ιδιαίτερα χρήσιμη συμβολή του εγκλεισμού στη κοσμετολογία είναι ότι προσφέρει την δυνατότητα ελεγχόμενης απελευθέρωσης των δραστικών ουσιών με καθορισμένους ρυθμούς, με βελτιωμένη αποτελεσματικότητα, ασφάλεια και ευκολία. Η μικρο- και νανο-ενθυλάκωση δίνει τη δυνατότητα μεταφοράς των δραστικών ουσιών στο δέρμα με ασφαλή, στοχευμένο, αποτελεσματικό και όχι οδονηρό τρόπο, για την προστασία των αρωμάτων ή των πτητικών ενώσεων από την εξάτμιση, για την προστασία ενώσεων όπως τα αντιοξειδωτικά από την οξειδωση, για την προστασία από την υποβάθμιση που προκαλείται από τη θερμότητα, το φως και την υγρασία ή τον έλεγχο της ταχύτητας αποδέσμευσης [25].

Επιλογή μήτρας για εγκλεισμό βιοδραστικών ουσιών σε καλλυντικές εφαρμογές

Προκειμένου να εξασφαλιστεί ο αποτελεσματικός εγκλεισμός των βιοδραστικών ουσιών και η σταθερότητα των παραγόμενων σωματιδίων/ινών είναι απαραίτητη η κατάλληλη επιλογή του υλικού της μήτρας που θα περικλείει τη δραστική ουσία. Οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την επιλογή του υλικού της μήτρας για καλλυντικές εφαρμογές είναι: η τοξικότητα, η βιοσυμβατότητα, η σταθερότητα, το ιξώδες και οι μηχανικές ιδιότητες, η συμβατότητα μεταξύ της βιοδραστικής ουσίας και του υλικού της μήτρας, η απελευθέρωση του δραστικού συστατικού από τη μήτρα στο δέρμα, η ενίσχυση της διείσδυσης της βιοδραστικής ουσίας από την ανώτερη στιβάδα της επιδερμίδας, το επιδιωκόμενο μέγεθος σωματιδίων, οι μικροσκοπικές ιδιότητες της επιφάνειας των μικροσωματιδίων, οικονομικοί παράγοντες και παράγοντες επεξεργασίας του προϊόντος.

Συνήθως, επειδή είναι δύσκολο να βρεθεί ένα υλικό μήτρας που να περιλαμβάνει όλες τις επιθυμητές ιδιότητες, επιλέγεται ένας συνδυασμός υλικών που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα [26]. Τα υλικά εγκλεισμού μπορούν να επιλεγούν από μια ευρεία ποικιλία φυσικών και συνθετικών πολυμερών. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα υλικά που χρησιμοποιούνται ως μήτρες στα

καλλυντικά περιλαμβάνουν πολυσακχαρίτες (κόμμεα, άμυλο, κυτταρίνες, κυκλοδεξτρίνες και χιτοζάνη), πρωτεΐνες (ζελατίνη, καζεΐνη και πρωτεΐνες σόγιας), λιπίδια (κεριά, παραφίνη, και έλαια) και συνθετικά πολυμερή (ακρυλικά πολυμερή, πολυβινυλική αλκοόλη και πολυβινυλοπυρρολιδόνη), ανόργανα υλικά, όπως πυριτικά, πολυφωσφορικά και αργιλικά, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως δεύτερο πολυμερές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα βιοπολυμερή και τα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, όπως είναι η χιτοζάνη και οι αλειφατικοί πολυεστέρες (π.χ. πολυγαλακτικό οξύ, *PLA*), καθώς είναι φυσικά και μη τοξικά υλικά που δεν ερεθίζουν το δέρμα και μπορούν να διασπαστούν ή να μεταβολιστούν και να απομακρυνθούν στο σώμα μέσω φυσιολογικών μεταβολικών οδών, ενώ άλλες ενώσεις ενδέχεται να συσσωρευτούν στους ιστούς του σώματος και να προκαλέσουν ερεθισμούς [25].

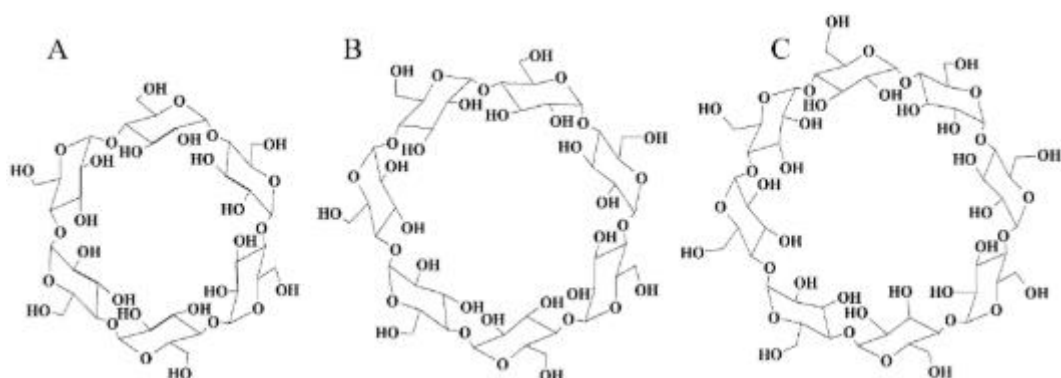
Κυκλοδεξτρίνη

Με την ονομασία κυκλοδεξτρίνη χαρακτηρίζονται οι κυκλικοί, υδατοδιαλυτοί ολιγοσακχαρίτες με δομικές μονάδες α-D-γλυκοκυρανόζες τοποθετημένες σε ένα κυκλικό δακτύλιο. Τα πιο συχνά απαντώμενα μόρια είναι οι α-,β- και γ- κυκλοδεξτρίνες που σχηματίζονται από έξι, επτά και οκτώ μονάδες γλυκοκυρανόζης αντίστοιχα.

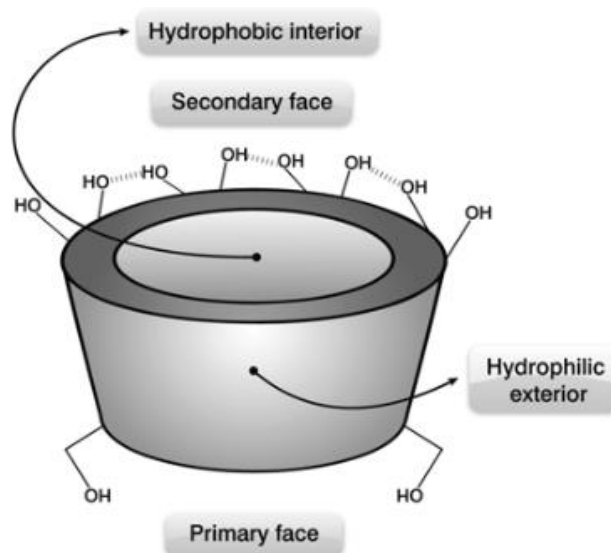
Η κυκλοδεξτρίνη είναι μια ουσία που χρησιμοποιείται συχνά ως υλικό μήτρας για τον εγκλεισμό βιοδραστικών ουσιών στη βιομηχανία των καλλυντικών άλλα και στη βιομηχανία τροφίμων. Μερικοί από τους βασικούς λόγους της εξάπλωσης της χρήσης της κυκλοδεξτρίνης από τις βιομηχανίες είναι οι εξής:

- ημιφυσικό προϊόν που παράγεται με απλή ενζυματική επεξεργασία από μια ανανεώσιμη άφθονη πηγή, το άμυλο,
- μη τοξική, δεν απορροφάται από το γαστρεντερικό σύστημα και μεταβολίζεται πλήρως από τη μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου, και
- η τιμή της είναι αρκετά χαμηλή (μικρότερη από 10 \$/kg) έτσι ώστε να είναι επιτρεπτή η χρήση της για τη πλειοψηφία των βιομηχανικών προϊόντων .

Οι κυκλοδεξτρίνες έχουν σχήμα κόλουρου κώνου όπου τα άτομα υδρογόνου των ομάδων C-H είναι τοποθετημένα στο εξωτερικό της κοιλότητας του μορίου και οι πολικές υδροξυλομάδες των σακχάρων βρίσκονται και αυτές προς το εξωτερικό του κώνου προσδίδοντας υδρόφιλο χαρακτήρα στις εξωτερικές επιφάνειες των προσόψεων της κυκλοδεξτρίνης. Λόγω, λοιπόν, αυτών των πολικών ομάδων οι κυκλοδεξτρίνες είναι διαλυτές στο νερό. Αντίθετα, το εσωτερικό του κοιλώματος είναι υδρόφοβο καθώς η πολικότητα του είναι μικρότερη από εκείνη του νερού. Αυτή η διττή φύση έχει ως αποτέλεσμα οι κυκλοδεξτρίνες να σχηματίζουν διαλυτά, αναστρέψιμα προϊόντα εγκλεισμού με ενώσεις χαμηλής υδατοδιαλυτότητας [27].



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της α-,β-γ- κυκλοδεξτρίνης.



Εικόνα 8: Υδρόφοβες και πολικές περιοχές των κυκλοδεξτρινών.

Ως υλικά επικάλυψης κατά τον εγκλεισμό βιοδραστικών ουσιών οι κυκλοδεξτρίνες προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα οι κυκλοδεξτρίνες:

- ενισχύουν την κάλυψη των δυσάρεστων οσμών και γεύσεων,
- βοηθούν στη σταθεροποίηση των πτητικών ενώσεων και των ευοξειδωτων ουσιών, ή ουσιών ευαίσθητων στο φως ή το οξυγόνο,
- προσφέρουν βραδεία και ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας,
- αυξάνουν την υδατοδιαλυτότητα διαφόρων ουσιών, και
- αποτρέπουν τη διάσπαση των εγκλεισμένων ουσιών [28].

2.2.1.2 Φαρμακευτική Βιομηχανία

Ένα καλά σχεδιασμένο σύστημα χορήγησης φαρμάκων μπορεί να ξεπεράσει μερικά από τα προβλήματα της συμβατικής θεραπείας και να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη θεραπευτική αποτελεσματικότητα, είναι απαραίτητο να παραδοθεί η δραστική ουσία στον ιστό στοχευμένα, στη βέλτιστη ποσότητα, στη σωστή χρονική στιγμή, με την πρόκληση ελάχιστης τοξικότητας και ελάχιστων παρενεργειών. Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις για την απελευθέρωση μιας θεραπευτικής ουσίας στην στοχευμένη θέση με ελεγχόμενη αποδέσμευση. Μια από αυτές είναι και η χρήση μικρο/νανο σφαιρών ως φορείς για τη δραστική ουσία του φαρμάκου. Η πολυμερική μήτρα που περιβάλλει τη δραστική ουσία είναι βιοαποικοδομήσιμη. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία στις μήτρες που χρησιμοποιούνται για τον εγκλεισμό των βιοδραστικών ουσιών, ωστόσο ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην ασφάλεια αυτών των υλικών και να συμφωνούν με τη λίστα των υλικών που θεωρούνται ασφαλή για φαρμακευτική χρήση (GRAS) [29].

Η διεργασία του εγκλεισμού βιοδραστικών ουσιών σε μήτρες είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στην ανάπτυξη και παραγωγή φαρμάκων. Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει ο εγκλεισμός στη φαρμακευτική βιομηχανία είναι:

- Ελεγχόμενη αποδέσμευση των σωματιδίων/ινών που φέρουν τη δραστική ουσία του φαρμάκου με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η μείωση της συχνότητας χορήγησης του.
- Στοχευμένη δράση του φαρμάκου που έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών και αύξηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, καθώς και τη μείωση της ποσότητας του χορηγούμενου φαρμάκου στον ασθενή.
- Ενίσχυση της σταθερότητας του φαρμάκου με τη δημιουργία φραγμού μεταξύ της δραστικής ουσίας και του περιβάλλοντος.
- Ενίσχυση της διαλυτότητας των φαρμάκων που δεν είναι επαρκώς διαλυτά μέσω της μείωσης του μεγέθους των σωματιδίων.

- Κάλυψη της γεύσης και οσμής ορισμένων φαρμάκων [30].

Στη φαρμακευτική βιομηχανία υπάρχουν διάφορες τεχνικές κατασκευής μικρο/νανο σφαιρών, η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής γίνεται μεταξύ άλλων με βάση τις επιθυμητές ιδιότητες των παραγόμενων σφαιρών, όπως είναι:

- Ικανότητα ενσωμάτωσης υψηλών συγκεντρώσεων του φαρμάκου.
- Σταθερότητα του παρασκευάσματος μετά από τη σύνθεση του, με κλινικά αποδεκτή διάρκεια ζωής.
- Ελεγχόμενο μέγεθος σωματιδίων και δυνατότητα διασποράς σε υδατικά διαλύματα για χρήση σε ενέσιμη μορφή.
- Ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα.
- Βιοσυμβατότητα με ελεγχόμενη βιοαποικοδομησιμότητα και ευαισθησία στη χημική τροποποίηση [29].

2.2.1.3 Βιομηχανία των τροφίμων

Ο τομέας των τροφίμων και των ποτών είναι μια παγκόσμια βιομηχανία πολλών τρισεκατομμυρίων δολαρίων, όλες οι μεγάλες εταιρείες τροφίμων αναζητούν συνεχώς τρόπους βελτίωσης της αποδοτικότητας της παραγωγής, της ασφάλειας των τροφίμων και των χαρακτηριστικών τους, έτσι ενισχύεται η έρευνα και τα αναπτυξιακά έργα με στόχο την απόκτηση ανταγωνιστικού πλεονεκτήματος στην αγορά [31]. Στη βιομηχανία των τροφίμων η διαδικασία του εγκλεισμού βρίσκει πολλές εφαρμογές καθώς προστατεύει τα συστατικά των τροφίμων από την υγρασία, τη θερμοκρασία, το pH, κλπ. ενισχύοντας έτσι τη βιωσιμότητά τους. Τα συστατικά των τροφίμων που εγκλείονται συνήθως είναι αρωματικά συστατικά όπως έλαια, μπαχαρικά, καρυκείματα και γλυκαντικά, οξέα και αλκάλια, λιπίδια, ένζυμα ή μικροοργανισμοί, τεχνητές γλυκαντικές ουσίες, πυκνωτικά μέσα, αντιοξειδωτικά, συντηρητικά, χρωστικές ουσίες, συστατικά με ανεπιθύμητες γεύσεις και οσμές, αιθέρια έλαια, αμινοξέα, βιταμίνες και μέταλλα. Η πιο διαδεδομένη εφαρμογή αφορά στη χρήση του εγκλεισμού για την επικάλυψη δυσάρεστων οσμών και γεύσεων, η στη βελτίωση της υφής, στην ελεγχόμενη απελευθέρωση των αρωμάτων και στη βελτίωση του χρώματος των τροφίμων. Τα προϊόντα του εγκλεισμού, σωματίδια ή ίνες, είναι συνήθως υδατοδιαλυτά με αποτέλεσμα να διαλύονται όταν προστεθεί νερό. Πέρα όμως από την ενίσχυση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων, ο εγκλεισμός ενισχύει συστατικά όπως είναι τα ένζυμα προκειμένου να διατηρούν τη βιωσιμότητά τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, καθώς προσθήκη εκτεθειμένων ενζύμων στα τρόφιμα τα καθιστά ευάλωτα σε παράγοντες όπως αναστολείς, ιόντα, ρίζες κλπ. που προκαλούν αστάθεια και αδράνεια [32].

Ως αποτέλεσμα ο εγκλεισμός έχει εισβάλει στη βιομηχανία τροφίμων δημιουργώντας καινοτόμα προϊόντα και διεργασίες που στοχεύουν όχι μόνο στη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων, αλλά και μεταξύ άλλων στην ενίσχυση της διατροφικής τους αξίας, της ασφάλειας και της ασφαλούς συσκευασίας τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο εγκλεισμός μικροοργανισμών που προστίθενται στα τρόφιμα για να προάγουν την υγεία των καταναλωτών, γνωστών ως προβιοτικά. Με τον εγκλεισμό αυτό επιτυγχάνεται η προστασία των μικροοργανισμών από το περιβάλλον και η απελευθέρωση τους σε μια βιώσιμη και μεταβολικά δραστική κατάσταση στο έντερο. Με τον εγκλεισμό επιτυγχάνεται επίσης, η προστασία βιοενεργών ουσιών όπως οι βιταμίνες, τα αντιοξειδωτικά, οι πρωτεΐνες και τα λιπαρά οξέα, με αποτέλεσμα τη παραγωγή λειτουργικών τροφίμων με βελτιωμένη λειτουργικότητα και σταθερότητα [31].

2.2.2 Μέθοδοι εγκλεισμού

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εγκλεισμού είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη μικρο- ή νανο- δομημένων συστημάτων εγκλεισμού. Γενικά, χρησιμοποιούνται δύο τύποι προσεγγίσεων για την παραγωγή συστημάτων εγκλεισμού. Η πρώτη προσέγγιση περιλαμβάνει την ενσωμάτωση της βιοδραστικής ουσίας σε διάλυμα της μήτρας και σχηματισμό των σωματιδίων, ενώ η δεύτερη τον εγκλεισμό της ουσίας κατά το σχηματισμό των σωματιδίων. Η πρώτη προσέγγιση αναφέρεται στις μεθόδους της φυγοκεντρικής εκβολής (extrusion), της γαλακτωματοποίησης και της γαλακτωματοποίησης- εξάτμισης του διαλύτη, είναι κατάλληλη για τον εγκλεισμό τόσο υδρόφιλων

όσο και υδρόφοβων ενώσεων, ωστόσο ο έλεγχος του μεγέθους και της δομής των σωματιδίων είναι δύσκολος και ισχύει για περιορισμένους τύπους μήτρας. Στη δεύτερη προσέγγιση ανήκουν μεταξύ άλλων οι τεχνικές της ξήρανσης με ψεκασμό (spray drying), της ξήρανσης υπό κατάψυξη (freeze drying) και της ηλεκτροστατικής ινοποίησης και ψεκασμού (electrospinning και electrospraying). Οι τεχνικές αυτές καταναλώνουν λιγότερη ενέργεια και έχουν καλύτερο έλεγχο του μεγέθους των σωματιδίων, της διανομής και της μορφολογίας τους σε σχέση με τις προαναφερθείσες [33].

Παρακάτω περιγράφονται συνοπτικά οι τεχνικές αυτές:

2.2.2.1 Εκβολή

Η μέθοδος αυτή είναι μια από τις παλαιότερες μεθόδους για τη δημιουργία σφαιριδίων με υδροκολλοειδή και επιτυγχάνεται με απλή ρίψη σταγονιδίων ενός υδατικού αιωρήματος βιοδραστικής ουσίας-πολυμερούς σε ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα, περιέχει ένα πολυσθενές κατιόν που συνήθως είναι το κατιόν ασβεστίου Ca^{2+} . Στις τεχνικές παραγωγής σφαιριδίων με αυτόν τον τρόπο περιλαμβάνεται η τεχνική ομοαξονικού αέρα, η τεχνική εκβολής με ψεκασμό, η ηλεκτροστατική ροή και η τεχνική εκβολής με ψεκασμό.

2.2.2.2 Γαλακτωματοποίηση

Στη συνεχή φάση που αποτελείται από ένα μεγάλο όγκο ελαίου προστίθεται ένας μικρός όγκος αιωρήματος πολυμερούς (διεσπαρμένη φάση). Το μίγμα ομογενοποιείται, προκειμένου να δημιουργηθεί γαλάκτωμα νερού σε έλαιο. Συχνά προστίθενται και γαλακτωματοποιητές προκειμένου να μειώσουν την επιφανειακή τάση των σταγονιδίων της διασπαρμένης φάσης που οδηγεί σε σφαιρίδια μικρότερης διαμέτρου. Μετά το σχηματισμό του γαλακτώματος, προστίθεται κατάλληλος παράγοντας που οδηγεί στη στερεοποίηση των μικροσφαιριδίων.

2.2.2.3 Ξήρανση με ψεκασμό

Είναι μια από τις πιο διαδεδομένους μεθόδους εγκλεισμού βιοδραστικών ουσιών. Ένα υγρό αιώρημα της βιοδραστικής ουσίας ψεκάζεται μέσα σε ένα μεγάλο δοχείο, δημιουργώντας νέφος από λεπτά σταγονίδια σε συνδυασμό με θερμό αέρα. Έπειτα ακολουθεί ξήρανση των σωματιδίων και μετατροπή τους σε στερεά σωματίδια.

2.2.2.4 Ξήρανση υπό κατάψυξη

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται τα τελευταία 40 χρόνια στην παραγωγή τροφίμων, φαρμάκων και άλλων ευπαθών βιολογικών προϊόντων. Πρόκειται για μια μέθοδο ξήρανσης με κατάψυξη και είναι μια διαδικασία αφυδάτωσης υγρών ή στερεών με υψηλή υγρασία.

2.2.2.5 Ηλεκτροστατική ινοποίηση και ψεκασμός (electrospinning και electrospraying)

Οι ηλεκτρουδροδυναμικές διεργασίες, που περιλαμβάνουν το electrospinning και το electrospraying, είναι νέες και ελπιδοφόρες μέθοδοι εγκλεισμού, που προσφέρουν την δυνατότητα οικονομικής παραγωγής υψηλής απόδοσης νάνο- και μικρο- σωματιδίων/ ινών. Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν την εφαρμογή ηλεκτροστατικού πεδίου με υψηλή τάση με σκοπό την εκτόξευση πίδακα διαλύματος πολυμερών [34].

Συγκεκριμένα, με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου υψηλής τάσης, παράγεται ένας ηλεκτρικά φορτισμένος πίδακας από πολυμερές διάλυμα. Η ηλεκτρική φόρτιση έχει ως συνέπεια την έναρξη του πίδακα, ο οποίος ξεκινά όταν η ένταση του πεδίου υπερβεί μια κρίσιμη τιμή τάσης. Έπειτα δημιουργείται ο κώνος Taylor στο πίδακα και παράγονται ίνες και σωματίδια, αντίστοιχα, στην επιφάνεια συλλογής σε μικρο- και νάνο- κλίμακα.

Παρά την ύπαρξη διάφορων τεχνικών εγκλεισμού δεν υπάρχει μια μοναδική μέθοδος που να μπορεί να αναγνωριστεί ως πρότυπη και γενικά εφαρμόσιμη για τον εγκλεισμό όλων των βιοδραστικών ουσιών. Προκειμένου να γίνει η ορθή επιλογή της κατάλληλης μεθόδους εγκλεισμού πρέπει να ληφθούν υπόψιν ορισμένα κριτήρια, αυτά αφορούν στον προσδιορισμό του τύπου και των χαρακτηριστικών της δραστικής ουσίας και της μήτρας (όπως για παράδειγμα το μοριακό βάρος, η πολικότητα, η διαλυτότητα, το μέγεθος των σωματιδίων, η μορφολογία των σωματιδίων και η ικανότητα εγκλεισμού). Για να επιτευχθεί η επιθυμητή ποιότητα εγκλεισμένου προϊόντος, πρέπει η τεχνική εγκλεισμού να είναι ικανή να αναπτύξει ένα σύστημα εγκλεισμού σε σωματίδια/ίνες το οποίο να επιτρέπει την ενσωμάτωση επαρκούς ποσότητας βιοδραστικής ουσίας, να έχει υψηλή ικανότητα

εγκλεισμού, να εξασφαλίζει τη σταθερότητα του συστήματος, μεγάλη διάρκεια ζωής, καθώς και βιοσυμβατότητα και βιοαποικομησιμότητα. [33]

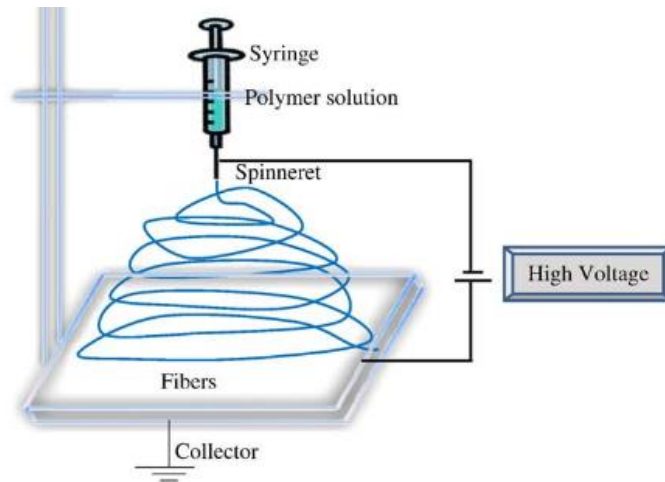
Η **ηλεκτροστατική ινοποίηση (electrospinning)** είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος που χρησιμοποιεί ηλεκτρικές δυνάμεις για την παραγωγή πολυμερικών ινών με διαμέτρους που κυμαίνονται από 2nm έως μερικά μικρόμετρα. Αν και η μέθοδος είναι μια παλιά τεχνική που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1897 από τον Rayleigh, μελετήθηκε λεπτομερώς το 1914 από τον Zeleny για τον ηλεκτροψεκασμό (electrospraying) και κατοχυρώθηκε από τον Formhals το 1934, τη τελευταία δεκαετία παρουσίασε τεράστια αύξηση της έρευνας και της εμπορικής προσοχής, όχι μόνο λόγω της δυνατότητας να παράγει μεγάλη ποικιλία πολυμερικών ινών, αλλά επίσης λόγω της ικανότητας του να παράγει ίνες με σταθερή διάμετρο στην περιοχή των νανο- και μικρο- μέτρων γεγονός που είναι δύσκολο να επιτευχθεί με τις κλασικές μηχανικές τεχνικές νηματοποίησης. Η τεχνική του electrospinning έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε διάφορους τομείς, όπως στα ικρίωματα στη μηχανική των ιστών, στη νανοκατάλυση, στη κατασκευή προστατευτικής ενδυμασίας, στη διήθηση, στη βιοϊατρική, στη φαρμακευτική, στη βιοτεχνολογία, στη μηχανική περιβάλλοντος και στα τρόφιμα. Γενικά, το electrospinning είναι μια απλή τεχνική που παράγει μεγάλη ποικιλία πολυμερικών νανοϊνών, τα οποία φέρουν πολλά πλεονεκτήματα όπως εξαιρετικά υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο, ρυθμιζόμενο πορώδες, ευκαμψία με δυνατότητα παραγωγής μεγάλης ποικιλίας μεγεθών και σχημάτων, καθώς και έλεγχο των ιδιοτήτων και της λειτουργικότητας τους μέσω του ελέγχου της σύνθεσης τους [35]. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, το electrospinning παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα όπως η απλότητα, η υψηλή απόδοση, το χαμηλό κόστος και η υψηλή επαναληψιμότητα.

Αρχή Λειτουργίας

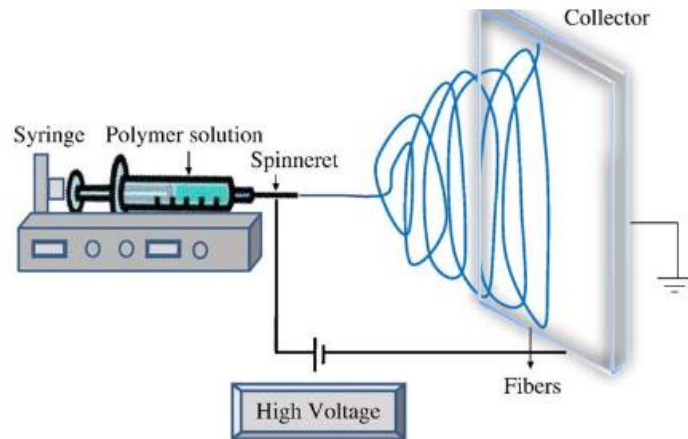
Οι βασικές διατάξεις που ρυθμίζονται στη συσκευή κατά την διεξαγωγή πειραμάτων electrospinning είναι οι εξής:

- υψηλή τάση συνεχούς ρεύματος DC (συνήθως στην περιοχή του kV),
- μια/δύο σύριγγα/ες με μεταλλική βελόνα,
- μια γειωμένη επιφάνεια συλλογής.

Σε μια τυπική διαδικασία electrospinning εφαρμόζεται υψηλή τάση σε διαλύματα ή τήγματα, έπειτα σχηματίζεται ένα σταγονίδιο στην άκρη της βελόνας, όταν η ηλεκτροστατική άπωση υπερνικήσει την επιφανειακή τάση του ρευστού, το σταγονίδιο θα παραμορφωθεί σχηματίζοντας έναν μικρό κώνο, γνωστό ως κώνο Taylor, στην άκρη της βελόνας. Καθώς η ηλεκτροστατική δύναμη υπερνικά την επιφανειακή τάση του κωνικού σταγονιδίου, δημιουργείται ένα λεπτό, φορτισμένο πιδάκιο (jet) διαλύματος πολυμερούς που εκβάλλεται από την άκρη της βελόνας. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του ηλεκτρικού πεδίου και της επιφανειακής τάσης του ρευστού δημιουργεί ένα ευθύγραμμο ρεύμα εκτόξευσης (jet) και οδηγεί στην εξάτμιση του διαλύτη, μέσω έντονου χτυπήματος. Το γεγονός αυτό προκαλεί συνεχή επιμήκυνση του ρεύματος εκτόξευσης (jet) και σχηματισμό λεπτών ινών που εναποτίθενται στην επιφάνεια συλλογής με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας ομοιόμορφης ίνας [36]. Υπάρχουν δύο τυποποιημένες διατάξεις electrospinning, η κάθετη και η οριζόντια όπως φαίνονται στην Εικόνα 9 και στην Εικόνα 10 αντίστοιχα. [35]



Εικόνα 9: Κάθετη διάταξη της ηλεκτροστατικής ινοποίησης.



Εικόνα 10: Οριζόντια διάταξη της ηλεκτροστατικής ινοποίησης.

Επιδράσεις διάφορων παραμέτρων στην ηλεκτροστατική ινοποίηση

Η διαδικασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους, οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν σε παραμέτρους που αφορούν στο διάλυμα, σε παραμέτρους που αφορούν στη διεργασία και σε παραμέτρους περιβάλλοντος. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν το ιξώδες, το μοριακό βάρος, η αγωγιμότητα και η επιφανειακή τάση, ενώ στη δεύτερη το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο, η απόσταση του συλλέκτη και της βελόνας και ο ρυθμός ροής. Κάθε μια από αυτές τις παραμέτρους επηρεάζει σημαντικά τη μορφολογία των ινών που προκύπτουν από την ηλεκτροστατική ινοποίηση και με τον σωστό τους χειρισμό μπορούμε να παράξουμε νανοΐνες της επιθυμητής μορφολογίας και διαμέτρου. Εκτός από αυτές τις μεταβλητές, οι παράμετροι του περιβάλλοντος περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία και την υγρασία που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της μορφολογίας και της διαμέτρου των νανοϊνών.

Παράμετροι που σχετίζονται με το διάλυμα:

- Συγκέντρωση: Στο electrospinning προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός ινών απαιτείται μια ελάχιστη συγκέντρωση διαλύματος. Έχει βρεθεί ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις διαλύματος λαμβάνεται ένα μίγμα από σφαιρίδια και ίνες. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση, το σχήμα των σφαιριδίων αλλάζει από σφαιρικό σε άτακτο και τελικά σχηματίζονται ομοιόμορφες ίνες με αυξημένες διαμέτρους λόγω της αύξησης του ιξώδους. Έτσι, θα πρέπει να υπάρχει μια βέλτιστη συγκέντρωση διαλύματος για το electrospinning, διότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις σχηματίζονται σφαιρίδια αντί για ίνες και σε υψηλές συγκεντρώσεις ο σχηματισμός συνεχόμενων ινών εμποδίζεται από τη μη σταθερή ροή του διαλύματος στην άκρη της βελόνας με αποτέλεσμα το σχηματισμό μεγαλύτερων ινών.

- **Μοριακό βάρος:** Το μοριακό βάρος του πολυμερούς έχει σημαντική επίδραση στις ρεολογικές και ηλεκτρικές ιδιότητες όπως είναι το ιξώδες, η επιφανειακή τάση, και η αγωγιμότητα. Γενικά, στη τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης χρησιμοποιούνται πολυμερή διαλύματα υψηλού μοριακού βάρους διότι παρέχουν το επιθυμητό ιξώδες για την παραγωγή ινών. Έχει παρατηρηθεί ότι χαμηλού μοριακού βάρους διαλύματα τείνουν να σχηματίζουν σωματίδια αντί για ίνες, ενώ διαλύματα μεγαλύτερου μοριακού βάρους παράγουν ίνες με μεγαλύτερη μέση διάμετρο. Το μοριακό βάρος του πολυμερούς στο διάλυμα αντικατοπτρίζει τον αριθμό των πολυμερικών αλυσίδων από τις οποίες απαρτίζεται, και κατά συνέπεια το ιξώδες του διαλύματος. Η αναδίπλωση των πολυμερικών αλυσίδων παίζει σημαντικό ρόλο στο electrospinning. Συνεπώς, ακόμα και όταν η συγκέντρωση του πολυμερικού διαλύματος είναι χαμηλή, μπορεί να περιέχει μεγάλο αριθμό αναδιπλωμένων αλυσίδων, εξασφαλίζοντας έτσι ένα επαρκές επίπεδο ιξώδους για την παραγωγή ομοιόμορφου πίδακα (jet) κατά το electrospinning που να περιορίζει τα αποτελέσματα της επιφανειακής τάσης, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό σφαιριδίων.
- **Ιξώδες:** Το ιξώδες του διαλύματος παίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό του μεγέθους και της μορφολογίας των παραγόμενων πολυμερικών ινών. Έχει αποδειχθεί ότι διαλύματα με πολύ χαμηλό ιξώδες δεν παρουσιάζουν συνεχόμενη παραγωγή ινών, ενώ διαλύματα με πολύ υψηλό ιξώδες αντιμετωπίζουν δυσκολίες στην εκτόξευση του πίδακα (jet), έτσι υπάρχει η απαίτηση του βέλτιστου ιξώδους για την εφαρμογή του εγκλεισμού με τη μέθοδο του electrospinning. Το εύρος του επιθυμητού ιξώδους διαφέρει ανάλογα με το είδος του πολυμερικού διαλύματος. Το ιξώδες, η συγκέντρωση του πολυμερούς και το μοριακό βάρος του πολυμερούς συσχετίζονται μεταξύ τους. Στο electrospinning το ιξώδες του διαλύματος παίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό του εύρους των συγκεντρώσεων από τις οποίες μπορούν να ληφθούν ομοιόμορφες ίνες.
- **Επιφανειακή τάση:** Η επιφανειακή τάση, η οποία πιθανότητα είναι συνάρτηση του συνδυασμού των διαλυτών του διαλύματος, παίζει κρίσιμο ρόλο στη μέθοδο της ηλεκτροστατικής ινοποίησης, καθώς η μείωση της επιφανειακής τάσης οδηγεί σε παραγωγή ομοιογενών ινών χωρίς της παρουσία σφαιριδίων. Γενικά, η υψηλή επιφανειακή τάση ενός διαλύματος εμποδίζει τη διαδικασία του electrospinning καθώς δημιουργεί αστάθεια στον πίδακα (jet) με αποτέλεσμα την δημιουργία σταγονιδίων. Ο σχηματισμός σταγονιδίων, σφαιριδίων και ινών εξαρτάται κυρίως από την επιφανειακή τάση του διαλύματος, όσο χαμηλότερη είναι η επιφανειακή τάση τόσο χαμηλότερο είναι και το απαραίτητο ηλεκτρικό πεδίο που απαιτείται για την πραγματοποίηση της διαδικασίας. Ωστόσο, αυτό δεν σημαίνει ότι η χαμηλή τάση ενός διαλύτη είναι πάντα η καλύτερη λύση.
- **Αγωγιμότητα/ Πυκνότητα επιφανειακού φορτίου:** Τα πολυμερή είναι ως επί το πλείστον αγώγιμα, με λίγες εξαιρέσεις τα διηλεκτρικά υλικά. Τα φορτισμένα ιόντα στα πολυμερικά διαλύματα επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη δημιουργία πίδακα (jet). Η αγωγιμότητα του διαλύματος καθορίζεται κυρίως από το είδος του πολυμερούς, τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη και τη διαθεσιμότητα των αλάτων. Έχει παρατηρηθεί ότι με την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του διαλύματος υπάρχει σημαντική μείωση της διαμέτρου των παραγόμενων νανοϊνών, ενώ με χαμηλή αγωγιμότητα του διαλύματος προκύπτει ανεπαρκής επιμήκυνση του πίδακα (jet) για δημιουργία ομοιόμορφων ινών, και σχηματισμό σφαιριδίων. Επιπλέον, εξαιρετικά αγώγιμα διαλύματα φαίνεται να είναι πολύ ασταθή κατά την παρουσία ισχυρών ηλεκτρικών πεδίων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μη ευθύγραμμου πίδακα (jet) καθώς και δημιουργία ανομοιόμορφων ως προς τη διάμετρο ινών. Πρέπει να σημειωθεί, επίσης, ότι η αύξηση της αγωγιμότητας οδηγεί σε μείωση της διαμέτρου των ινών.

Παράμετροι που σχετίζονται με τη διεργασία:

- **Εφαρμοζόμενη τάση:** Στη διαδικασία του electrospinning ένας κρίσιμος παράγοντας είναι η εφαρμοζόμενη τάση. Η ίνα αρχίζει και σχηματίζεται μόνο μετά την επίτευξη μιας ελάχιστης τιμής τάσης, η οποία προκαλεί τη κατάλληλη φόρτιση στο διάλυμα μαζί με το ηλεκτρικό πεδίο και ξεκινά τη διαδικασία της ηλεκτροστατικής ινοποίησης. Έχει ήδη αποδειχθεί πειραματικά ότι

το σχήμα της σταγόνας έναρξης αλλάζει ανάλογα με τις συνθήκες (τάση, ιξώδες και ρυθμό ροής). Η επίδραση της επιβαλλόμενης τάσης στη διάμετρο και τη μορφολογία των παραγόμενων ινών είναι αμφιλεγόμενη. Μερικοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι με την αύξηση της επιβαλλόμενης τάσης εκτοξεύεται μεγαλύτερη ποσότητα πολυμερούς και αυτό διευκολύνει το σχηματισμό ινιδίων μεγαλύτερης διαμέτρου. Άλλοι όμως ερευνητές υποστηρίζουν ότι μια αύξηση της τάσης, αυξάνει την ηλεκτροστατική απωστική δύναμη στο ρευστό του πίδακα (jet) που τελικά ευνοεί το σχηματισμό μικρότερων ινών. Στις περισσότερες περιπτώσεις, μια υψηλότερη τάση ενισχύει την έκταση του διαλύματος λόγω των μεγαλύτερων ηλεκτροστατικών δυνάμεων στον πίδακα (jet), ως αποτέλεσμα του ισχυρότερου ηλεκτρικού πεδίου, έχοντας ως συνέπεια τη μείωση της διαμέτρου της ίνας και επίσης γρήγορη εξάτμιση του διαλύτη από τις παραγόμενες ίνες. Σε μια υψηλότερη τάση υπάρχει, ακόμα, η πιθανότητα σχηματισμού σφαιριδίων. Πειράματα έχουν δείξει μείωση της διαμέτρου της ίνας κατά περίπου στο ήμισυ διπλασιάζοντας το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Συμπερασματικά, η τάση επηρεάζει τη διάμετρο της ίνας, αλλά η επιρροή αυτή ποικίλει ανάλογα και με άλλους παράγοντες όπως είναι η συγκέντρωση του διαλύματος και η απόσταση μεταξύ του άκρου της βελόνας και της επιφάνειας συλλογής.

- Ρυθμός ροής τροφοδοσίας: Ο ρυθμός ροής του πολυμερούς διαλύματος (τροφοδοσίας) από τη σύριγγα είναι μια σημαντική παράμετρος, καθώς επηρεάζει την ταχύτητα του πίδακα (jet) και τη ταχύτητα μεταφοράς υλικού. Ένας χαμηλός ρυθμός ροής είναι πιο επιθυμητός καθώς ο διαλύτης θα έχει αρκετό χρόνο για να εξατμιστεί. Μελέτες σε ίνες πολυστυρενίου έδειξαν ότι αύξηση του ρυθμού ροής της τροφοδοσίας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαμέτρου της ίνας και της διαμέτρου των πόρων, και επίσης μεταβάλλοντας το ρυθμό ροής η μορφολογική δομή μπορεί να μεταβάλλεται ελαφρά. Επιπλέον, φαίνεται ότι υψηλοί ρυθμοί ροής έχουν ως αποτέλεσμα ίνες με σφαιρίδια λόγω του μικρού χρόνου ξήρανσης πριν φθάσουν στην επιφάνεια συλλογής.
- Είδος της επιφάνειας συλλογής: Άλλη μια σημαντική παράμετρος της διαδικασίας της ηλεκτροστατικής ινοποίησης είναι ο τύπος της επιφάνειας συλλογής που χρησιμοποιείται. Σε αυτή τη διαδικασία, η επιφάνεια συλλογής χρησιμεύει ως ένα αγώγιμο υπόστρωμα πάνω στο οποίο συλλέγονται οι νανοϊνες. Συνήθως, ως επιφάνεια συλλογής χρησιμοποιείται το φύλλο αλουμινίου, αλλά λόγω της δυσκολίας μεταφοράς των συλλεχθέντων ινών και της εκάστοτε εφαρμογής χρησιμοποιούνται και άλλες επιφάνειες όπως το αγώγιμο χαρτί, το αγώγιμο ύφασμα και ο περιστρεφόμενος τροχός. Σύμφωνα με έρευνες λιγότερο αγώγιμες επιφάνειες παρουσιάζουν ανασταλτική επίδραση στη συλλογή.
- Απόσταση ακροφυσίου- συλλέκτη: Η απόσταση μεταξύ της άκρης της βελόνας και της επιφάνειας συλλογής έχει εξεταστεί ως μια άλλη παράμετρος για τον έλεγχο της διαμέτρου και της μορφολογίας των ινών. Είναι απαραίτητη η ύπαρξη μιας ελάχιστης επιτρεπόμενης τιμής της απόστασης έτσι ώστε να δοθεί στις ίνες ο απαιτούμενος χρόνος για να στεγνώσουν πριν εναποτεθούν στον συλλέκτη. Επίσης, με αποστάσεις που είναι είτε πολύ κοντινές είτε πολύ μακρινές έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός σφαιριδίων. Η επίδραση της απόστασης του ακροφυσίου από τον συλλέκτη στη μορφολογία των ινών δεν είναι τόσο σημαντική όσο άλλες παράμετροι.

Περιβαλλοντικοί παράμετροι

Εκτός από τις παραμέτρους που αφορούν στο διάλυμα και αυτές που αφορούν στη διεργασία, υπάρχουν, επίσης, και οι περιβαλλοντικές παράμετροι που περιλαμβάνουν την υγρασία και τη θερμοκρασία. Σύμφωνα με μελέτες, αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μείωση της διαμέτρου των ινών, λόγω της μείωσης του ιξώδους των πολυμερών διαλυμάτων με αύξηση της θερμοκρασίας. Όσον αφορά στην υγρασία, φαίνεται ότι αύξηση των επιπέδων υγρασίας προκαλεί την εμφάνιση μικρών κυκλικών πόρων στην επιφάνεια των ινών, ενώ η περαιτέρω αύξηση της υγρασίας έχει ως αποτέλεσμα τη συγχώνευση των πόρων. Σε πολύ χαμηλή υγρασία, ένας πτητικός διαλύτης μπορεί να ξηραθεί γρήγορα, μερικές φορές ο ρυθμός εξάτμισης είναι πολύ γρήγορος συγκρινόμενος με την απομάκρυνση του διαλύτη από την άκρη της βελόνας, δημιουργώντας πρόβλημα στη διαδικασία της

ηλεκτροστατικής ινοποίησης. Έχοντας ως αποτέλεσμα να διεξαχθεί η διαδικασία του electrospinning μόνο για λίγα λεπτά, προτού το άκρο της βελόνας φράξει [35].

2.3 Σύγχρονες τάσεις στα καλλυντικά

Τα τελευταία 20 χρόνια η παγκόσμια αγορά καλλυντικών αυξάνεται ετησίως κατά μέσο όρο 4.5%, με ρυθμούς ανάπτυξης που κυμαίνονται κάθε χρόνο από 3% έως 5.5%. Η συγκεκριμένη αγορά κατορθώνει σταθερή και συνεχή ανάπτυξη παρουσιάζοντας ελαστικότητα κάτω από τις δυσμενείς οικονομικές συνθήκες. Συνήθως, διακρίνεται σε πέντε κύριους τομείς: περιποίησης δέρματος, περιποίησης μαλλιών, προϊόντα μακιγιάζ, αρώματα και είδη τουαλέτας. Αυτοί οι τομείς είναι συμπληρωματικοί και μέσω της διαφορετικότητας τους ικανοποιούν τις ανάγκες και τις προσδοκίες όλων των καταναλωτών. Από το 1998 έως το 2010 οι πωλήσεις καλλυντικών αυξήθηκαν περισσότερο από δύο φορές. Ενώ το ενδιαφέρον των καταναλωτών φαίνεται να μετατοπίστηκε από τα προϊόντα περιποίησης μαλλιών σε εκείνα για τη περιποίηση του δέρματος. Το αυξημένο ενδιαφέρον για τα προϊόντα περιποίησης δέρματος, οφείλεται στη γήρανση του πληθυσμού των δυτικών χωρών και στην αυξημένη ευαισθητοποίηση των καταναλωτών για τους κινδύνους έκθεσης στον ήλιο [37].

Η σύγχρονη έννοια της ευεξίας περιλαμβάνει την ομορφιά, την υγεία, τη φυσική κατάσταση καθώς και την αντιγήρανση. Οι σύγχρονοι καταναλωτές παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για καλλυντικά που έχουν ως στόχο την αντιγήρανση συγκριτικά με οποιαδήποτε άλλη κατηγορία καλλυντικών. Τα καλλυντικά αποσκοπούν στη βελτίωση της υγείας και της ομορφιάς μέσω συστατικών που επηρεάζουν τη λειτουργία του δέρματος. Για το σκοπό αυτό παρασκευάζονται καινοτόμα καλλυντικά με συστατικά φυσικής προέλευσης, στα οποία εισάγονται βιταμίνες (όπως η βιταμίνη A,C και E), λιπαρά οξέα, βότανα καθώς και προϊόντα που προάγουν την υγεία του δέρματος, όπως το κολλαγόνο, και έχουν αντιφλεγμονώδη δράση [38].

Μεταξύ των καινοτομιών προϊόντων των τελευταίων ετών μπορούν να αναφερθούν δύο τάσεις: τα προϊόντα εξοικονόμησης χρόνου και τα προϊόντα μακράς διάρκειας ζωής. Τα προϊόντα που εξοικονομούν χρόνο αποτελούν απάντηση στις ανάγκες της σύγχρονης καθημερινότητας κατά την οποία οι καταναλωτές επιχειρούν να περιορίσουν το χρόνο που αφιερώνουν στην καθημερινή ρουτίνα ομορφιάς τους. Τέτοια προϊόντα αποτελούν αυτά που συμπεριέχουν δραστικές ουσίες οι οποίες καλύπτουν μεγάλο φάσμα δράσης (π.χ. προϊόντα μακιγιάζ με ενυδατική, επουλωτική και αντηλιακή δράση). Μια άλλη τάση είναι η βιωσιμότητα. Κατά την ανάπτυξη νέων προϊόντων, οι βιομηχανίες καλλυντικών αναζητούν ολοένα και πιο οικολογικούς τρόπους παρασκευής και συσκευασίας των προϊόντων, τονίζοντας, μάλιστα, ότι η αποτελεσματικότητα του προϊόντος δεν θυσιάζεται στο πλαίσιο της βιώσιμης ανάπτυξης των προϊόντων.

Η ανάπτυξη των σύγχρονων καλλυντικών προϊόντων βασίζεται σε προηγμένες έρευνες και τεχνολογίες. Οι καινοτομίες υψηλής τεχνολογίας χρησιμοποιούνται σε όλες τις κατηγορίες προϊόντων και σε όλα τα εύρη τιμών [37].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

3.1 Υλικά

3.1.1 Απομόνωση τετραδοτοξίνης από τον μυϊκό ιστό και τα εσωτερικά όργανα του ψαριού *Lagocephalus sceleratus*.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να απομονωθεί η τετραδοτοξίνη τόσο από τη σάρκα του ψαριού *Lagocephalus sceleratus* όσο και από τα εσωτερικά του όργανα (νεφρό, χολή, έντερα, ωσθήκες) είναι τα εξής:

- 100mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος (CH_3COOH) 0.1% v/v,
- 100mL διαλύματος 1% v/v οξικού οξέος (CH_3COOH) σε μεθανόλη (MeOH),
- 30g μυϊκού ιστού από το ψάρι *Lagocephalus sceleratus*,
- 30g μίγματος εσωτερικών οργάνων (νεφρό, χολή, έντερα, ωσθήκες) του ψαριού *Lagocephalus sceleratus*.



Εικόνα 11: Εσωτερικά όργανα *L.sceleratus* (πάνω αριστερά: έντερα, πάνω δεξιά: ωσθήκες, κάτω: νεφρός και χολή)

3.1.2 Απομόνωση λιπαρών οξέων από το ψάρι *Lagocephalus sceleratus* και από το σολομό.

Προκειμένου να απομονωθούν τα λιπαρά οξέα τόσο από τον λαγοκέφαλο όσο και από το σολομό χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά:

- Διαλύτες (εξάνιο, ισοπροπανόλη, μεθανόλη, χλωροφόρμιο),
- μυϊκός ιστός και δέρμα από το ψάρι *Lagocephalus sceleratus*
- μυϊκός ιστός από το ψάρι σολομός

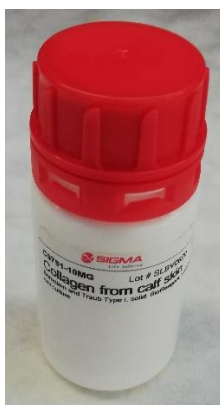
Για μετατροπή των λιπαρών οξέων σε μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAMES) προκειμένου να αναλυθούν με GS-MS, χρησιμοποιούνται τα εξής υλικά:

- Διαλύτες (χλωροφόρμιο, εξάνιο),
- διάλυμα υδροχλωρίου σε μεθανόλη 8% v/v
- υδατικό διάλυμα CaCl_2 5% w/v

3.1.3 Απομόνωση κολλαγόνου από το ψάρι *Lagocephalus sceleratus* και από το σολωμό

Προκειμένου να γίνει η εξαγωγή του κολλαγόνου από τα ψάρια και η ποσοτικοποίηση του χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά:

- υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.05M,
- πρότυπο κολλαγόνο από δέρμα μόσχου



Εικόνα 12: Πρότυπο κολλαγόνο από δέρμα μόσχου.

- Διάλυμα A: 100mL υδατικού διαλύματος με 0.5g $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$, 10g Na_2CO_3 και 2g NaOH,
- Διάλυμα B: 100 mL υδατικού διαλύματος με 2.7g $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$, 3g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ και 0.4g NaOH,
- αντιδραστήριο *Follin-Ciocalteu* αραιωμένο σε απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:15,
- πειψίνη (ενεργότητα= 0,7 FIP U/mg, Mr=36000g/mol),
- δέρμα και κόκκαλα λαγοκέφαλου
- δέρμα και κόκκαλα σολομού

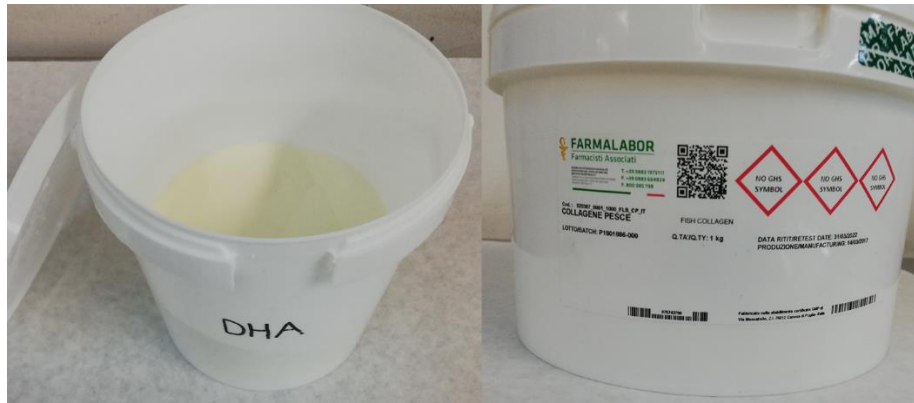


Εικόνα 13: Διάλυμα οξικού οξέος 0,05M, Διάλυμα A, Διάλυμα B και αραιωμένο διάλυμα *Follin-Ciocalteu*.

3.1.4 Εγκλεισμός των ω -3 λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ενθυλάκωση των λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου σε πολυμερικές μήτρες είναι τα εξής:

- σκόνη ω -3 λιπαρού οξέος (κυρίως εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA, 22:6 ω -3) προερχόμενη από ψάρια,
- σκόνη κολλαγόνου προερχόμενη από ψάρια,
- υδατικό διάλυμα β -κυκλοδεξτρίνης 60% v/v,



Εικόνα 14: Σκόνη ω -3 λιπαρού οξέος (DHA) και σκόνη κολλαγόνου από ψάρια.



Εικόνα 15: Υδατικό διάλυμα β-κυκλοδεξτρίνης.

3.1.5 Χαρακτηρισμός τελικών προϊόντων εγκλεισμού

Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της απόδοσης του εγκλεισμού των λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου στη πολυμερική μήτρα είναι τα εξής:

- Διαλύτες (ακετόνη, εξάνιο, χλωροφόρμιο),
- διάλυμα υδροχλωρίου σε μεθανόλη 8% v/v,
- υδατικό διάλυμα CaCl_2 5% w/v,
- διάλυμα οξικού οξέος 0.05M,
- Διάλυμα A: 100mL υδατικού διαλύματος με 0.5g $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10g Na_2CO_3 και 2g NaOH ,
- Διάλυμα B: 100 mL υδατικού διαλύματος με 2.7g $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ και 0.4g NaOH ,
- αντιδραστήριο Follin-Ciocalteu αραιωμένο σε απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:15,

3.1.6 Ανάπτυξη καλλυντικών κρεμών και μικροβιολογική ανάλυση

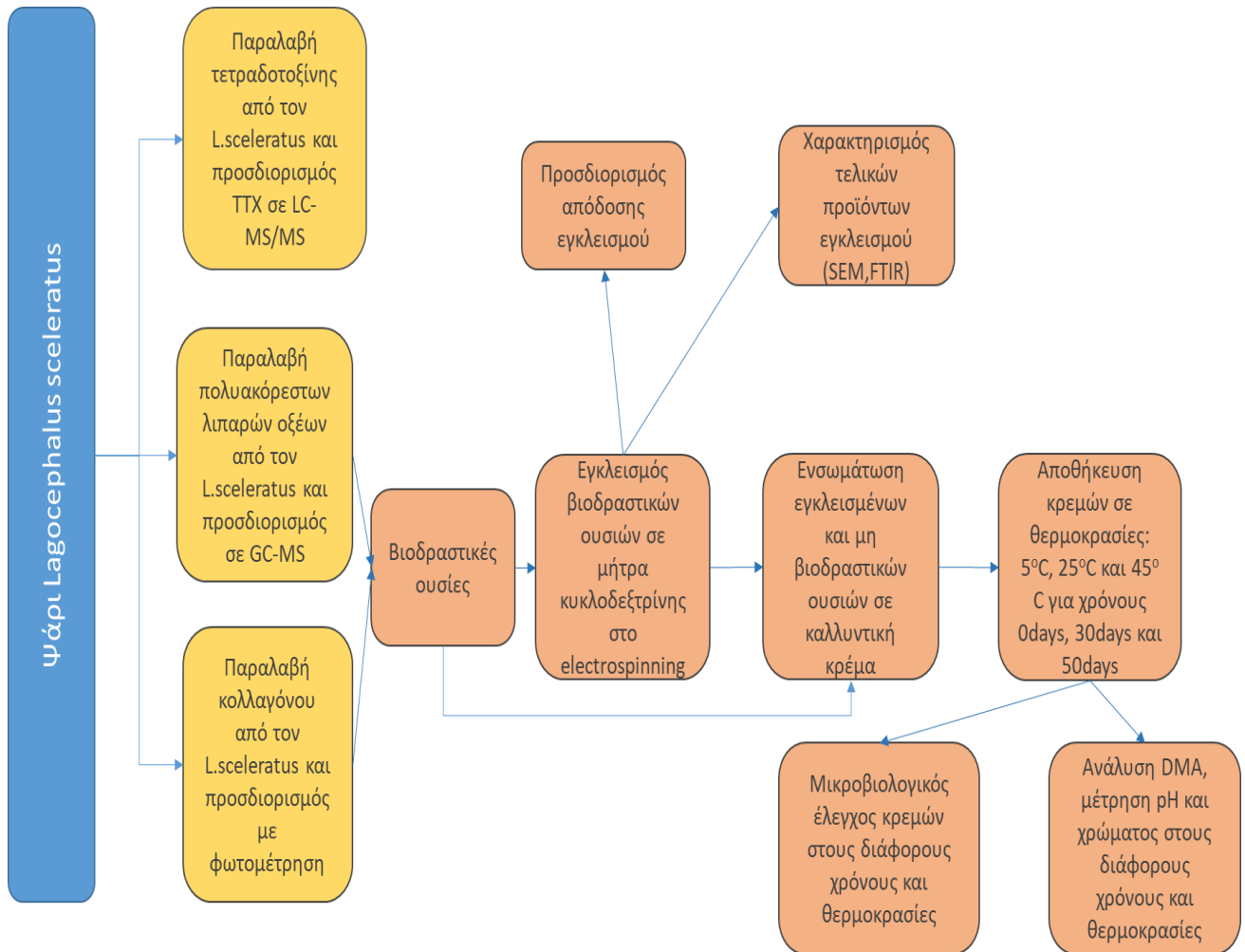
Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των καλλυντικών κρεμών και για την μικροβιακή ανάλυση τους είναι τα παρακάτω:

- διάλυμα Ringer

- θρεπτικά υποστρώματα
- αιθανόλη

3.2 Μέθοδοι Όργανα και Συσκευές

Στην παρακάτω Εικόνα παρουσιάζεται το διάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας, η οποία ακολουθήθηκε και αναλύεται λεπτομερώς στη συνέχεια.



Εικόνα 16: Διάγραμμα πειραματικής διαδικασίας.

3.2.1 Παραλαβή τετραδοτοξίνης από τον μυϊκό ιστό και τα εσωτερικά όργανα του ψαριού *Lagocephalus sceleratus*

Για την παραλαβή της τετραδοτοξίνης από το ψάρι *Lagocephalus sceleratus* ακολουθούνται οι παρακάτω πειραματικές μέθοδοι:

1. Αρχικά ζυγίζονται 30g μυϊκού ιστού από το ψάρι *Lagocephalus sceleratus* τα οποία τεμαχίζονται με τη βοήθεια μπλέντερ.
2. Το δείγμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 250 mL όπου αναμειγνύεται με 100 mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1% v/v.
3. Έπειτα το μίγμα συσκευάζεται και μεταφέρεται σε ομογενοποιητή (BagMixer, Interscience) για 10min.



Εικόνα 17: Ομογενοποιητής (BagMixer, Interscience)

4. Το μίγμα μεταφέρεται εκ νέου σε κωνική φιάλη των 250mL και βυθίζεται σε λουτρό υπερήχων (Dentsply Neytech Ultrasonik 28H) για 10 min.



Εικόνα 18: Συσκευή υπερήχων (Dentsply Neytech Ultrasonik 28H)

5. Το μίγμα καταψύχεται στους -18°C για 10min.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (ROTOFIX 32A-Hettich) για 20min στις 4000rpm.



Εικόνα 19: Φυγόκεντρος (ROTOFIX 32A-Hettich)

7. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό, διατηρείται στη κατάψυξη για επακόλουθη ανάλυση με LC-MS/MS.

Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται, με τη ζύγιση 30 g μυϊκού ιστού από το ψάρι και την ανάμιξή του με 100 mL διαλύματος οξικού οξέος 1% v/v σε μεθανόλη.

Επιπλέον, η διαδικασία επαναλαμβάνεται, με τη ζύγιση 30 g ιστού από εσωτερικά όργανα του ψαριού και την ανάμιξή του με 100 mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1% v/v.

Τέλος, η παραπάνω πειραματική μέθοδος επαναλαμβάνεται, με τη ζύγιση 30 g ιστού από εσωτερικά όργανα του ψαριού και την ανάμιξή του με 100 mL διαλύματος οξικού οξέος 1% v/v σε μεθανόλη.

Προκειμένου να γίνει ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός της TTX σε LC-MS/MS, τα δείγματα εστάλησαν στο Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ), στο Ηράκλειο Κρήτης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ταυτοποίηση της TTX και την ποσοτικοποίησης της είναι η εξής:

- 0,5mL του δείγματος καθαρίστηκαν εφαρμόζοντας εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extractio, SPE). Το προσροφητικό στις μικροστήλες SPE (10mg) αποτελούταν από πολυμερές υλικό ανταλλαγής ισχυρών κατιόντων (strong cation exchange).
- Για την έκλυση της TTX και των αναλόγων της από τις μικροστήλες χρησιμοποιήθηκαν 0.8mL υδατικού διαλύματος 0.1N HCl.
- Τα δείγματα αραιώθηκαν με νερό σε αναλογία 1:20 και αναλύθηκαν με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας- δίδυμης φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS, Agilent 1260 Infinity binary HPLC σε συνδυασμό με Agilent 6460C Triple Quadrupole Mass Spectrometer).
- Η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων TTX πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του εξωτερικού προτύπου (external standard) χρησιμοποιώντας το Πιστοποιημένο Υλικό Αναφοράς (CRM-03-TTXs) της εταιρείας CIFGA.

3.2.2 Παραλαβή λιπαρών οξέων από το ψάρι *Lagocephalus sceleratus* και από το σολομό.

Απομάκρυνση τοξίνης από τον ιστό του *L. sceleratus*

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η απομόνωση των λιπαρών οξέων από το ψάρι *Lagocephalus sceleratus*, απομακρύνεται, αρχικά, η τοξίνη από τον ιστό που χρησιμοποιήθηκε μετέπειτα για την απομόνωση των λιπαρών. Προκειμένου να αποτοξινωθεί ζυγίζονται 30g ιστού τα οποία αφού τεμαχιστούν με τη χρήση μπλέντερ, ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής με το διαλύτη, διαλύονται σε 100mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1% v/v. Το δείγμα τοποθετείται σε ομογενοποιητή (BagMixer, Interscience) για 10 min. Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση (ROTOFIX 32A-Hettich) στα 4000rpm για 20min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης συλλέγεται το ίζημα, το οποίο επαναδιαλύεται σε 100mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1% v/v και ακολουθείται ξανά η παραπάνω διαδικασία για τρεις φορές, προκειμένου να επιτευχθεί η ολοκληρωτική απομάκρυνση της τοξίνης από τον ιστό.

Παραλαβή λιπαρών οξέων από την σάρκα του *L.sceleratus* μέσω της μεθόδου *Bligh and Dyer*

Για την απομόνωση των ω -3, ω -6 λιπαρών οξέων από την σάρκα του *L.sceleratus* χρησιμοποιείται η μέθοδος Bligh and Dyer όπως περιγράφεται παρακάτω:

1. Ζυγίζονται 18.5g αποτοξινωμένης σάρκας λαγοκέφαλου, τα οποία αναμιγνύονται στον ομογενοποιητή (BagMixer, Interscience) με 55mL μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:2 v/v) για 2 min.
2. Ύστερα προστίθενται επιπλέον 18.5mL χλωροφορμίου και πραγματοποιείται ανάδευση επί 30 sec σε μαγνητικό αναδευτήρα (SELECTA MULTIMATIC-5N). Αφού προστεθούν 18.5mL απιονισμένου νερού πραγματοποιείται εκ νέου ανάδευση για 30 sec.



Εικόνα 20: Μαγνητικός Αναδευτήρας (SELECTA MULTIMATIC-5N)

3. Ακολούθως, το μίγμα διηθείται υπό κενό. Το υπόλειμμα ξεπλένεται δύο φορές, αρχικά με 18,5 mL και μετέπειτα με 9,25 mL χλωροφόρμιο.
4. Το διήθημα μεταφέρεται στη διαχωριστική χοάνη και παραλαμβάνεται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη, η οποία περιέχει το χλωροφόρμιο που έχει κατακρατήσει τα λιπαρά.



Εικόνα 21: Διάταξη διαχωρισμού.

5. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστρεφόμενο εξατμιστήρα (BUCHI Rotavapor R-200) συζευγμένο με αντλία κενού (BUCHI Vacuum Controller V-800) σε θερμοκρασία $T=30^{\circ}\text{C}$ και πίεση $P=200\text{ mbar}$
6. Το δείγμα τοποθετείται στον επωαστήρα στους 42°C για 2 ώρες

Παραλαβή λιπαρών οξέων από το δέρμα του *L.scleratus* μέσω της μεθόδου *Bligh and Dyer*

Για την απομόνωση των ω -3, ω -6 λιπαρών οξέων από το δέρμα του *L.scleratus* χρησιμοποιείται η μέθοδος *Bligh and Dyer* όπως περιγράφεται παρακάτω:

1. Ζυγίζονται 22,4g δέρματος λαγοκέφαλου, τα οποία αναμιγνύονται στον ομογενοποιητή (BagMixer, Interscience) με 67mL μίγματος χλωροφορμίου-μεθανόλης (1:2 v/v) για 2 min.
2. Στη συνέχεια, προστίθενται επιπλέον 22,4mL χλωροφορμίου και πραγματοποιείται ανάδευση επί 30 sec σε μαγνητικό αναδευτήρα(SELECTA MULTIMATIC-5N). Αφού προστεθούν 22,4mL απιονισμένου νερού πραγματοποιείται εκ νέου ανάδευση για 30 sec.
3. Ακολούθως, το μίγμα διηθείται υπό κενό. Το υπόλειμμα ξεπλένεται δύο φορές, αρχικά με 22,4 mL και μετέπειτα με 11,2 mL χλωροφόρμιο.
4. Το διήθημα μεταφέρεται στη διαχωριστική χοάνη και παραλαμβάνεται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη, η οποία περιέχει το χλωροφόρμιο που έχει κατακρατήσει τα λιπαρά.
5. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστρεφόμενο εξατμιστήρα (BUCHI Rotavapor R-200) συζευγμένο με αντλία κενού (BUCHI Vacuum Controller V-800) σε θερμοκρασία $T=30^{\circ}\text{C}$ και πίεση $P=200\text{ mbar}$
6. Το δείγμα τοποθετείται στον επωαστήρα στους 42°C για 2 ώρες.



Εικόνα 22: Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας (BUCHI Rotavapor R-200) συζευγμένος με αντλία κενού (BUCHI Vacuum Controller V-800).

Παραλαβή λιπαρών οξέων από τη σάρκα του *L.scleratus* με χρήση μίγματος διαλυτών εξανίου-ισοπροπανόλης

1. Ζυγίζονται 5,1 g αποτοξινωμένης σάρκας λαγοκέφαλου, τα οποία αναμιγνύονται στον ομογενοποιητή (BagMixer, Interscience) με 92mL μίγματος εξανίου-ισοπροπανόλης (3:2 v/v) για 1 min.
2. Ακολούθως, το μίγμα διηθείται υπό κενό. Το υπόλειμμα παραλαμβάνεται και διαλύεται εκ νέου σε 15mL μίγματος εξανίου-ισοπροπανόλης με παράλληλη ανάδευση για 2 min. Έπειτα ακολουθεί έκπλυση του υπολείμματος με 15mL μίγματος εξανίου-ισοπροπανόλης.

3. Το διήθημα που προκύπτει από τις δύο διηθήσεις τοποθετείται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη.
4. Τέλος, πραγματοποιείται απομάκρυνση του μίγματος των διαλυτών στον περιστρεφόμενο εξατμιστήρα (BUCHI Rotavapor R-200) συζευγμένο με αντλία κενού (BUCHI Vacuum Controller V-800) σε θερμοκρασία $T=30^{\circ}\text{C}$ και πίεση $P=200\text{ mbar}$
5. Το δείγμα τοποθετείται στον επωαστήρα στους 42°C για 2 ώρες.

Παραλαβή λιπαρών οξέων από το σολομό με χρήση μίγματος διαλυτών εξανίου-ισοπροπανόλης
 Αρχικά, τεμαχίζουμε τη σάρκα του σολομού με τη χρήση μπλέντερ ώστε να μπορέσουμε να παραλάβουμε τα λιπαρά οξέα. Έπειτα ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφεται στην παραπάνω παράγραφο για 5g από τη σάρκα του σολομού.

Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση με GC-MS

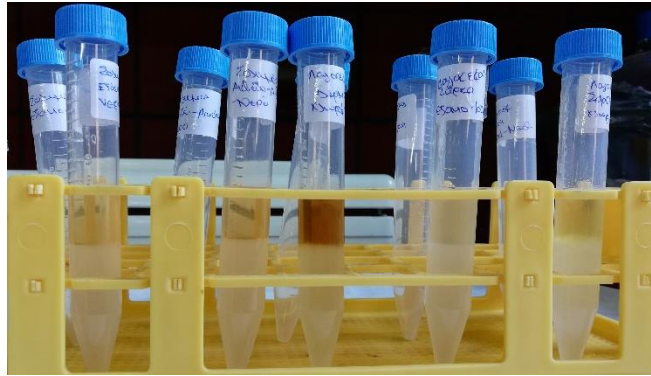
Προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πρέπει πρώτα να γίνει η μετατροπή των λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Οι μεθυλεστέρες είναι μόρια περισσότερο πτητικά και λιγότερο πολικά από τα λιπαρά οξέα. Για να μετατραπούν, λοιπόν, τα λιπαρά οξέα σε μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAMES) και να γίνει η ανάλυση τους στον αέριο χρωματογράφο ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Οι σφαιρικές φιάλες που περιέχουν τα λιπίδια απομακρύνονται από τον επωαστήρα και αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
2. Έπειτα σε κάθε σφαιρική φιάλη προστίθεται 1mL χλωροφόρμιο προκειμένου να γίνει η επαναδιάλυση των λιπαρών.
3. Ακολουθεί προσθήκη 2,5 mL διαλύματος υδροχλωρίου (HCl) σε μεθανόλη (MeOH) 8%v/v.
4. Στη συνέχεια τα δείγματα αναδεύονται έντονα σε Vortex (VORTEX-GENIE 2) και επωάζονται σε υδατόλουτρο (Selecta Agibat 20) στους 60°C για 15min, αφού πρώτα τοποθετηθούν σε πλαστικούς σωλήνες (φάλλον).



Εικόνα 23: Διάταξη ανάδευσης Vortex (VORTEX-GENIE 2).

5. Μετά την απομάκρυνση από το υδατόλουτρο, προστίθεται σε κάθε δείγμα 2,5mL υδατικού διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) 5%w/v και έπειτα τα δείγματα αναδεύονται στο Vortex (VORTEX-GENIE 2).
6. Προσθέτουμε 1 mL εξανίου σε κάθε δείγμα και έπειτα από έντονη ανάδευση στο Vortex (VORTEX-GENIE 2) παρατηρούμε το σχηματισμό 2 φάσεων, παραλαμβάνουμε την επάνω φάση από κάθε δείγμα που περιέχει τα λιπίδια και τη μεταφέρουμε σε νέο φάλλον.

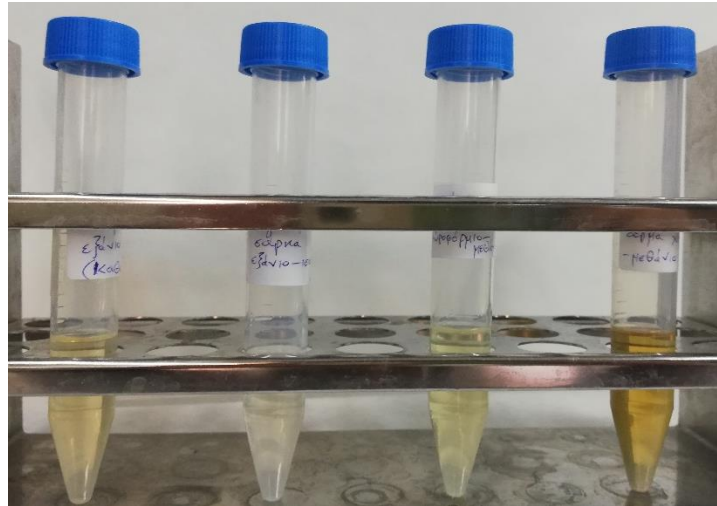


Εικόνα 24: Σχηματισμός δύο φάσεων στα δείγματα λιπιδίων που απομονώθηκαν από τον *L.scleratus* και από τον σολομό, ύστερα από την κατεργασία τους για το σχηματισμό των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων.

7. Έπειτα προσθέτουμε εκ νέου 1 mL εξανίου σε κάθε δείγμα και αναδεύουμε. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται άλλες τρεις φορές.
8. Ο προσδιορισμός των FAMES πραγματοποιείται με τη χρήση συστήματος GC-MS (GAS CHROMATOGRAPH SHIMADZU GC-17A) με αναλυτικό όργανο Varian 450 εφοδιασμένο με στήλη DB5. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο και ο ρυθμός ροής του ήταν ίσος με 1mL/min. Η θερμοκρασία έγχυσης ρυθμίζεται στους 270°C, η ροή αερίου φορέα ήταν 1 mL/min και η θερμοκρασία της στήλης αυξάνεται από 125 °C σε 300 °C εντός 35 min με ρυθμό 5 °C/min. Τα *PUFAs* ταυτοποιούνται μέσω σύγκρισης με εξωτερικά πρότυπα και ποσοτικοποιούνται με χρήση καμπύλης αναφοράς που σχηματίστηκε χρησιμοποιώντας διαλύματα καθαρών *PUFAs* αραιωμένων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Εικόνα 25: Αέριος χρωματογράφος (GAS CHROMATOGRAPH SHIMADZU GC-17A).



Εικόνα 26: Εκχύλιση με εξάνιο για την παραλαβή των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAMES) από τα δείγματα λιπιδίων που προήλθαν από την επεξεργασία του *L.scleratus* και του σολομού.

3.2.3 Παραλαβή κολλαγόνου από το ψάρι *Lagocerphalus scleratus* και από το σολωμό Κατασκευή καμπύλης αναφοράς κολλαγόνου

1. Τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως των 25mL, 5 mg πρότυπου κολλαγόνου και 5 mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0,05M, υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα (SELECTA MULTIMATIC-5N) για 3 ώρες, έως ότου διαλυθεί πλήρως το κολλαγόνο. Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση κολλαγόνου 1mg/mL.
2. Παρασκευάζονται τα Διαλύματα Α και Β. Για την παρασκευή του Διαλύματος Α ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών (KERN ABS 220), 0,5g $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$, 10g Na_2CO_3 και 2g NaOH τα οποία προστίθενται σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL μαζί με 50mL απιονισμένο νερό υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα, έπειτα το μίγμα μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100mL και προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Όμοια παρασκευάζονται και 100 mL υδατικού διαλύματος Β με 2.7g $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$, 3g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ και 0,4g NaOH. Έπειτα, παρασκευάζονται 30mL αραιωμένου διαλύματος Follin-Ciocalteu (αραίωση 1:15).



Εικόνα 27: Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 4 δεκαδικών (KERN ABS 220).

- Με βάση το αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 1mg/mL, παρασκευάζονται τα ακόλουθα αραιωμένα σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.05M, διαλύματα προκειμένου να χαραχθεί η καμπύλη αναφοράς:

Πίνακας 5: Αραιώσεις του διαλύματος του πρότυπου κολλαγόνου για τη κατασκευή της καμπύλης αναφοράς.

A/A	Συγκέντρωση (mg/mL)	Ποσότητα διαλύματος κολλαγόνου 1mg/mL	Ποσότητα υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.05M
1	1	1mL	0
2	0.5	0.5mL	0.5
3	0.25	0.25mL	0.75
4	0.125	0.125mL	0.875
5	0.1	0.1mL	0.9
6	0.05	0.05mL	0.95

Τα δείγματα αυτά παρασκευάζονται λαμβάνοντας από το αρχικό διάλυμα κολλαγόνου C=1mg/mL την κατάλληλη ποσότητα η οποία προστίθεται σε ανάλογη ποσότητα υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0,05M, προκειμένου να παραχθούν διαλύματα κολλαγόνου διαφορετικών συγκεντρώσεων τελικού όγκου 1mL, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5 στις δύο τελευταίες στήλες.

Για την παραλαβή των μικροποσοτήτων του αρχικού διαλύματος κολλαγόνου χρησιμοποιήθηκαν αυτόματες πιπέτες των 100-1000 µL και 10-100µL.



Εικόνα 28: Πάνω: Αυτόματη πιπέτα των 10-100µL, Κάτω: Αυτόματη πιπέτα των 100-1000µL.

- Σε επτά γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0.72mL Διαλύματος Α με τη χρήση της αυτόματης πιπέτας 100-1000µL και 0.08mL Διαλύματος Β με τη χρήση της αυτόματης πιπέτας 10-100µL.
- Έπειτα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 0.8mL από καθένα από τα αραιωμένα Δείγματα 1-6, ενώ στον έβδομο δοκιμαστικό σωλήνα που αποτελεί το τυφλό μας διάλυμα προστίθενται 0.8 mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.05M με τη χρήση της αυτόματης πιπέτας 100-1000µL. Τα μίγματα αναδεύονται έντονα σε Vortex (VORTEX-GENIE 2).
- Ύστερα, οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται σε υδατόλουτρο (Selecta Agibat 20) στους 50°C για 20min.

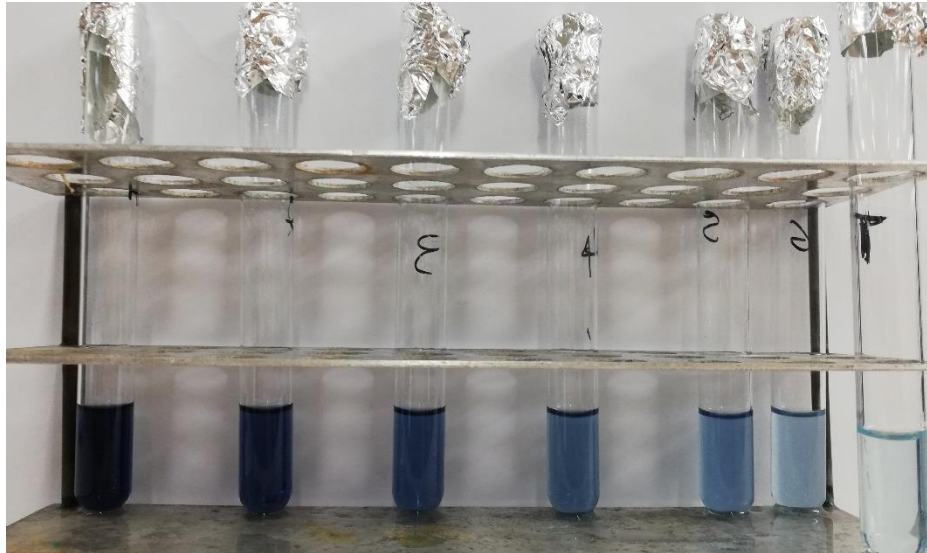


Εικόνα 29: Υδατόλουτρο (Selecta Agibat 20)

7. Τα δείγματα αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολούθως προστίθενται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 2.4mL αραιωμένου αντιδραστηρίου Follin-Ciocalteu.
8. Τα δείγματα αναδεύονται έντονα σε Vortex και επωάζονται στους 50°C για 10min σε υδατόλουτρο.
9. Τέλος, αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φωτομετρούνται στα 650nm (UV-VIS SPECTROPHOTOMETER, UV-M51, BEL PHOTONICS). Αρχικά γίνεται μηδενισμός του οργάνου με το τυφλό δείγμα και έπειτα ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων 1-6, όπου καταγράφεται η απορρόφηση τους για να χαραχθεί η καμπύλη αναφοράς.



Εικόνα 30: Φωτόμετρο (UV-VIS SPECTROPHOTOMETER, UV-M51, BEL PHOTONICS).



Εικόνα 31: Κατεργασμένα διαλύματα πρότυπου κολλαγόνου σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.05M με κατάλληλους διαλύτες για την χάραξη καμπύλης αναφοράς.

Παραλαβή κολλαγόνου από τον *L. Sceleratus* και από τον σολομό

Η απομόνωση του κολλαγόνου από τα δέρματα των δύο ψαριών πραγματοποιείται με δύο μεθόδους την ASC (Acid Soluble Collagen) και την PSC (Pepsin Soluble Collagen). Αντιθέτως, η απομόνωση του κολλαγόνου από τα οστά των ψαριών γίνεται με την μέθοδο ASC.

1. Αρχικά ζυγίζονται 5g από κάθε δείγμα:
 - Δείγμα Α:** δέρμα *L. sceleratus* για επεξεργασία με τη μέθοδο ASC
 - Δείγμα Β:** δέρμα *L. sceleratus* για επεξεργασία με τη μέθοδο PSC
 - Δείγμα Γ:** δέρμα σολομού για επεξεργασία με τη μέθοδο ASC
 - Δείγμα Δ:** δέρμα σολομού για επεξεργασία με τη μέθοδο PSC
 - Δείγμα Ε:** κόκκαλα *L. sceleratus* για επεξεργασία με τη μέθοδο PSC
 - Δείγμα ΣΤ:** κόκκαλα σολομού για επεξεργασία με τη μέθοδο PSC
2. Τα δείγματα τεμαχίζονται και ύστερα τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως των 250mL μαζί με 100mL υδατικού διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 0.1M, με συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 5 ώρες, όπου το διάλυμα NaOH αντικαθίσταται κάθε 2 ώρες. Η κατεργασία με NaOH γίνεται με στόχο την απομάκρυνση των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών.
3. Ύστερα, το διάλυμα NaOH απομακρύνεται, τα δείγματα ξεπλένονται με νερό μέχρι να καταστεί ουδέτερο το pH τους, διηθούνται και παραλαμβάνεται το υπόλειμμα της διήθησης.
4. Τα δείγματα Α και Γ τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως των 50mL με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.5M σε αναλογία 1:5 w/v, υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 20 ώρες.
5. Τα δείγματα Β, Δ, Ε, ΣΤ τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως των 50mL με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.5M σε αναλογία 1:5 w/v και πεψίνη σε αναλογία ενζύμου- υποστρώματος 1:40 w/w, υπό συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα για 20 ώρες.



Εικόνα 32: Κατεργασία δειγμάτων Α,Γ με τη μέθοδο ASC και των δειγμάτων Β,Δ,Ε,ΣΤ με τη μέθοδο PSC.

- Μετά το πέρας των 20 ωρών, τα δείγματα παραλαμβάνονται και φυγοκεντρώνονται για 15 min στα 3840 rpm (NÜVE NF 400 Centrifuge).



Εικόνα 33: (Φυγόκεντρος NÜVE NF 400 Centrifuge)

- Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0,72mL Διαλύματος Α με τη χρήση της αυτόματης πιπέτας 100-1000μL και 0.08mL Διαλύματος Β με τη χρήση της αυτόματης πιπέτας 10-100μL.
- Έπειτα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 0.8mL από καθένα από τα Δείγματα Α-ΣΤ. Κατασκευάζονται επίσης δύο τυφλά δείγματα, το ένα για το μηδενισμό του φωτόμετρου για τα δείγματα Α,Γ όπου ακολουθείται η μέθοδος ASC και το άλλο για τα δείγματα Β,Δ,Ε,ΣΤ όπου ακολουθείται η μέθοδος PSC. Στους δύο, αυτούς, δοκιμαστικούς σωλήνες, που αποτελούν τα τυφλά διαλύματα, προστίθενται 0,8 mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.5M με τη χρήση της αυτόματης πιπέτας 100-1000μL, ενώ στον δεύτερο προστίθεται, επίσης, και πεψίνη

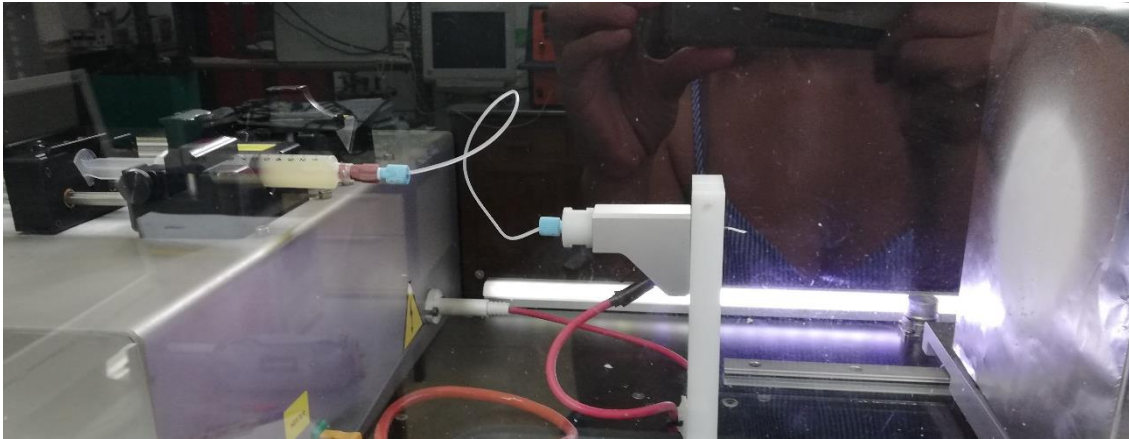
ανάλογης ποσότητας με αυτή που είχε χρησιμοποιηθεί στα αντίστοιχα δείγματα. Τα μίγματα αναδεύονται έντονα σε Vortex (VORTEX-GENIE 2).

9. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 50°C για 20min.
10. Τα δείγματα αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολούθως προστίθενται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 2.4mL αραιωμένου αντιδραστηρίου Follin-Ciocalteu.
11. Τα δείγματα αναδεύονται έντονα σε Vortex και επωάζονται στους 50°C για 10min σε υδατόλουτρο.
12. Τέλος, αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φωτομετρούνται στα 650nm (UV-VIS SPECTROPHOTOMETER, UV-M51, BEL PHOTONICS). Αρχικά γίνεται μηδενισμός του οργάνου με το τυφλό δείγμα και έπειτα ακολουθεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων Α-ΣΤ.
13. Όσα δείγματα βρέθηκε να έχουν απορρόφηση εκτός της γραμμικής περιοχής αραιώθηκαν περαιτέρω με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.5M, προκειμένου να είναι εφικτός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης τους σε κολλαγόνο. Συγκεκριμένα, στο δείγμα Α πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:10, στο δείγμα Β έγινε αραιώση 1:40, στο δείγμα Γ δεν πραγματοποιήθηκε αραιώση, στο δείγμα Δ έγινε αραιώση 1:40, στο δείγμα Ε αραιώση 1:20 και τέλος στο δείγμα ΣΤ πραγματοποιήθηκε αραιώση 1:20. Να σημειωθεί, επίσης, ότι έγινε αντίστοιχη αραιώση και στο τυφλό δείγμα που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.
14. Η απορρόφηση καταγράφεται και με βάση τη καμπύλη αναφοράς βρίσκεται η συγκέντρωση σε κολλαγόνο του κάθε δείγματος.

3.2.4 Εγκλεισμός των ω-3 λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου μέσω ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning)

Ύστερα από την παραλαβή των βιοδραστικών ουσιών από τον *L.scleratus*, επόμενο βήμα ήταν η εφαρμογή των ουσιών αυτών σε προϊόντα κοσμετολογίας. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε κολλαγόνο και ωμέγα-3 λιπαρά οξέα ψαριών ανάλογων με αυτών που απομονώθηκαν από τον *L.scleratus*, προκειμένου να μελετηθεί η συμπεριφορά τους κατά την ενσωμάτωσή τους σε καλλυντικές κρέμες. Θεωρήθηκε σκόπιμο, οι βιοδραστικές αυτές ουσίες να εγκλειστούν προκειμένου να καλυφθούν οι δυσάρεστες οσμές και να προστατευθούν από αλλοιώσεις λόγω των περιβαλλοντικών συνθηκών, έτσι ώστε να αυξηθεί η διάρκεια ζωής των καινοτόμων κρεμών.

Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες εγκλεισμού των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου σε μήτρα κυκλοδεξτρίνης. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο εγκλεισμός διαλύονται ωμέγα-3 λιπαρά οξέα και κολλαγόνο σε διάλυμα κυκλοδεξτρίνης. Έπειτα από ανάδευση στο μαγνητικό αναδευτήρα, το διάλυμα μεταφέρεται στη σύριγγα του electrospinning. Οι συνθήκες λειτουργίας που εξετάστηκαν καθώς και η αναλογία των βιοδραστικών ουσιών στο διάλυμα κυκλοδεξτρίνης παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες.



Εικόνα 34: Η διάταξη στο electrospinning (Biolnacia FLUIDNATEK LE-10) σε λειτουργία με το διάλυμα κυκλοδεξίνης



Εικόνα 35: Διάταξη electrospinning (Biolnacia FLUIDNATEK LE-10).

Διάλυση 1g ω-3 λιπαρών οξέων και 1g κολλαγόνου σε διάλυμα κυκλοδεξτρίνης τελικού όγκου 10mL.

Πίνακας 6: Συνθήκες λειτουργίας *electrospinning* για διάλυμα κυκλοδεξτρίνης στο οποίο έχουν διαλυθεί 1g ω-3 λιπαρών οξέων και 1g κολλαγόνου.

Ροή διαλύματος ($\frac{\mu L}{h}$)	Απόσταση ακροφυσίου από συλλέκτη (cm)	Τάση (kV)	Σχόλια
600	15	22.0-23.5	Αυξημένη έκκριση σταγονιδίων
600	15	24.5-28.0	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο έπειτα από 5 min
700	15	24.5-28.5	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια, ειδικά με αύξηση της τάσης), στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο έπειτα από 10 min
800	15	24.5-27.5	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο έπειτα από περίπου 10 min
900	12	24.0-28.5	Φυσιολογική ροή, μετά από έκκριση σταγονιδίων για 0.5 min, βελτίωση της ροής με αύξηση της τάσης
900	15	24.5-28.0	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο μετά τα 10 min
1000	12	25.0-28.5	Έκκριση πολυάριθμων σταγονιδίων Αρχικά έκκριση σταγονιδίων, έπειτα σταθεροποίηση ροής για 4 min, λόγω της αύξησης μήκους του ακροφυσίου
1000	15	24.5-28.0	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), όμως άμεση αύξηση μήκους και στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο
1100	12	25.0-28.1	Φυσιολογική ροή, μετά από έκκριση σταγονιδίων για 0.5 min, στερεοποίηση διαλύματος στο ακροφύσιο έπειτα από 4 min
1100	15	24.5-27.5	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), όμως άμεση αύξηση μήκους και στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο
1200	12	28.1	Αρχικά έκκριση σταγονιδίων, έπειτα σταθεροποίηση ροής για 4 min, λόγω της αύξησης μήκους του ακροφυσίου
1200	13	27.0-28.3	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), όμως άμεση αύξηση μήκους και στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο
1200	15	24.5-27.5	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), όμως άμεση αύξηση μήκους και στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο
1300	13	27.0-28.5	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), όμως άμεση αύξηση μήκους και στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο
1300	15	24.5-28.0	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), όμως άμεση αύξηση μήκους και στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο
1400	13	27.0-28.0	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), όμως άμεση αύξηση μήκους και στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο

1400	15	24.5-28.0	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), όμως άμεση αύξηση μήκους και στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο
1500	13	27.0-28.0	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), όμως άμεση αύξηση μήκους και στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο
1500	15	24.0-28.5	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), όμως άμεση (μετά από 2 min) αύξηση μήκους και στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο

Διάλυση 0.5g ω-3 λιπαρών οξέων και 0.5g κολλαγόνου σε διάλυμα κυκλοδεξτρίνης τελικού όγκου 10mL.

Πίνακας 7: Συνθήκες λειτουργίας electrospinning για διάλυμα κυκλοδεξτρίνης στο οποίο έχουν διαλυθεί 0.5 g ω-3 λιπαρών οξέων και 0.5 g κολλαγόνου.

Ροή διαλύματος ($\frac{\mu L}{h}$)	Απόσταση ακροφυσίου από συλλέκτη (cm)	Τάση (kV)	Σχόλια
700	15	28.9	Επιτυχής εξάτμιση του διαλύτη, απουσία σταγονιδίων, αλλά στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο
800	15	27.0-29.2	Έκκριση σταγονιδίων για 2 min μέχρι να σταθεροποιηθεί ο κώνος Taylor και στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο έπειτα από 7 min συνολικά
1000	10	25.0-28.6	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο έπειτα από 5 min, βελτίωση της ροής με αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης
1000	12	26.0-28.0	Αρχικά έκκριση σταγονιδίων και μετέπειτα σταθεροποίηση του κώνου Taylor για 5 min, μέχρι να στερεοποιηθεί το διάλυμα
1000	13	26.0-28.1	Αρχικά έκκριση σταγονιδίων επί 1 min και μετέπειτα σταθεροποίηση του κώνου Taylor για 3-4 min, μέχρι να στερεοποιηθεί το διάλυμα. Βέλτιστη ροή στις χαμηλότερες τάσεις
1000	14	28.5	Επιτυχής συλλογή σκόνης, με καλοσχηματισμένο κώνο Taylor
1000	15	25.5-28.5	Επιτυχής συλλογή σκόνης, με σταδιακή αύξηση του μήκους του ακροφυσίου και τελική στερεοποίησή του στα 28.5 kV
1050	15	25.5-28.5	Αρχικά έκκριση σταγονιδίων και μετέπειτα σταθεροποίηση του κώνου Taylor στα 28.5 kV
1100	13	26.0-28.2	Αρχικά έκκριση σταγονιδίων και μετέπειτα σταθεροποίηση του κώνου Taylor, με σταδιακή όμως αύξηση του μήκους του ακροφυσίου και στερεοποίηση του διαλύματος
1100	15	27.0-29.4	Αρχικά έκκριση σταγονιδίων και, έπειτα από 3 min, σταθεροποίηση του κώνου Taylor στα 29.4 kV
1150	15	28.5	Αυξημένη έκκριση σταγονιδίων
1200	13	25.0-27.0	Μειούμενη έκκριση σταγονιδίων με την αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης. Αύξηση του μήκους του ακροφυσίου

1200	15	23.5-28.5	Μειούμενη έκκριση σταγονιδίων με την αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης
1250	15	23.7-28.2	Αρχικά έκκριση σταγονιδίων και, έπειτα από 3 min, σταθεροποίηση του κώνου Taylor στα 28.2 kV
1300	13	27.0	Σταθερή ροή, χωρίς σταγονίδια επί 4 min, αλλά αύξηση μήκους του σχηματιζόμενου ακροφυσίου, με επακόλουθη στερεοποίηση του
1300	15	28.2	Αρχικά έκκριση σταγονιδίων και, έπειτα από 3 min, σταθεροποίηση του κώνου Taylor στα 28.2 kV, αλλά στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο ύστερα από 8 min συνολικά
1500	15	22.3-28	Αυξημένη έκκριση σταγονιδίων

Διάλυση 0.7g ω-3 λιπαρών οξέων και 0.3g κολλαγόνου σε διάλυμα κυκλοδεξτρίνης τελικού όγκου 10mL.

Πίνακας 8: Συνθήκες λειτουργίας electrospinning για διάλυμα κυκλοδεξτρίνης στο οποίο έχουν διαλυθεί 0.7 g ω-3 λιπαρών οξέων και 0.3 g κολλαγόνου.

Ροή διαλύματος ($\frac{\mu L}{h}$)	Απόσταση ακροφυσίου από συλλέκτη (cm)	Τάση (kV)	Σχόλια
600	13	23.5-28.0	Σταθεροποίηση του κώνου Taylor μετά τα 24.5 kV, στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο έπειτα από 4 min
700	13	26.0-28.0	Σταθεροποίηση του κώνου Taylor κοντά στα 28 kV, στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο έπειτα από 4 min
1000	10	25.0-28.0	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο έπειτα από 5 min στα 26 kV και 3 min στα 27 kV
1000	11	25.7-28.0	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια), στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο έπειτα από 5 min στα 27 kV και 4 min στα 28 kV
1000	12	25.5-28.5	Φυσιολογική ροή -χωρίς σταγονίδια και στερεοποίηση- για 5 min στα 28.5 kV
1000	13	26.5-28.0	Επιτυχής συλλογή σκόνης, με καλοσχηματισμένο κώνο Taylor που δε στερεοποιείται για 8 min στα 26.5-27.0 kV, έπειτα από αρχική έκκριση σταγονιδίων για 1 min
1000	14	24.5-28.5	Φυσιολογική ροή (χωρίς σταγονίδια μετά το 1 ^ο λεπτό), στερεοποίηση του διαλύματος στο ακροφύσιο έπειτα από 5-6 min, βελτίωση της ροής με αύξηση της εφαρμοζόμενης τάσης
1000	15	25.0-29.5	Συνεχής έκκριση σταγονιδίων, σταθεροποίηση του κώνου Taylor στα 29.5 kV ύστερα από 1 min
1200	15	25.0-28.5	Συνεχής έκκριση σταγονιδίων, μη σταθεροποίηση του κώνου Taylor και στερεοποίησή του μετά από 4 min
1300	15	25.0-28.5	Συνεχής έκκριση σταγονιδίων, μη σταθεροποίηση του κώνου Taylor και στερεοποίησή του μετά από 4 min
1300	15	24.5-28.5	Συνεχής έκκριση σταγονιδίων, μη σταθεροποίηση του κώνου Taylor και στερεοποίησή του μετά από 4 min

1500	15	24.5-28.5	Συνεχής έκκριση σταγονιδίων, μη σταθεροποίηση του κώνου Taylor και στερεοποίησή του μετά από 4 min
------	----	-----------	----------------------------------------------------------------------------------------------------

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη παραπάνω διερεύνηση, έδειξαν ότι οι καλύτερες συνθήκες λειτουργίας της συσκευής ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning) επιτυγχάνονται για **ροή ίση με 1000μL/h, τάση ίση με 27kV και απόσταση της επιφάνειας συλλογής από το ακροφύσιο ίση με 13cm, για διάλυμα κυκλοδεξτρίνης με περιεκτικότητα 7% σε ωμέγα-3 και 3% σε κολλαγόνο.**

3.2.5 Χαρακτηρισμός τελικών προϊόντων εγκλεισμού

3.2.5.1 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού

Ο προσδιορισμός της απόδοσης εγκλεισμού των παραγόμενων εγκλεισμένων λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου σε κυκλοδεξτρίνη μέσω της μεθόδου ηλεκτροστατικού ψεκασμού διενεργείται ώστε να διαπιστωθεί ο βαθμός αποτελεσματικότητας της τεχνικής για την ενθυλάκωση των συστατικών αυτών στην κυκλοδεξτρίνη.

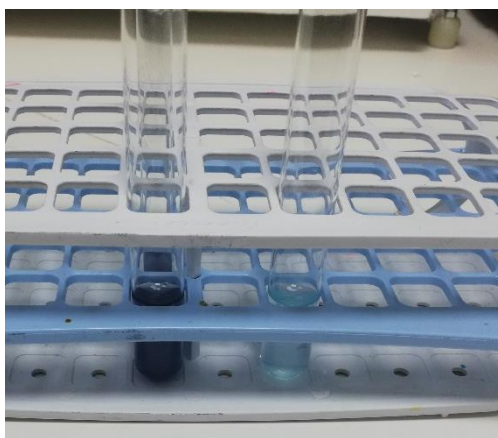
Αρχικά, προκειμένου να προσδιοριστεί το ποσοστό των λιπαρών οξέων που έχει εγκλειστεί, χρησιμοποιείται διαλύτης ο οποίος διαλύει τα λιπαρά οξέα, αλλά όχι την μήτρα, δηλαδή την κυκλοδεξτρίνη, έτσι ώστε ξεπλένοντας ορισμένη ποσότητα παραγόμενων νανοϊνών με το διαλύτη, να παρασυρθούν τα μη εγκλεισμένα λιπαρά οξέα και να προσδιορισθεί η ποσότητα αυτών. Έπειτα, με βάση την υπολογισμένη ποσότητα λιπαρών οξέων που αναμένεται να έχει εναποτεθεί στην επιφάνεια συλλογής σε ορισμένο χρόνο, προσδιορίζεται η απόδοση εγκλεισμού. Πιο συγκεκριμένα, η πειραματική διεργασία περιγράφεται ακολούθως:

1. Ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό (KERN ABS 220) 0,3g νανοϊνών ενθυλακωμένων λιπαρών οξέων και κολλαγόνου σε κυκλοδεξτρίνη που παράχθηκαν στο electrospinning στις βέλτιστες συνθήκες τάσης και ροής που αναφέρονται παραπάνω (για χρόνο $t=30$ min), τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL μαζί με 30mL εξάνιο και αναδεύονται για 5min στο μαγνητικό αναδευτήρα (SELECTA MULTIMATIC-5N).
2. Έπειτα, λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό το οποίο συλλέγεται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη, ενώ στο υπόλειμμα προστίθονται 20mL εξάνιο και αναδεύεται για 5 min σε μαγνητικό αναδευτήρα. Μετά το πέρας της ανάδευσης το υπερκείμενο υγρό προστίθεται και αυτό στη σφαιρική φιάλη, η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται ακόμα μια φορά.
3. Έπειτα, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται στον περιστρεφόμενο εξατμιστήρα (BUCHI Rotavapor R-200) στους 35°C και σε πίεση 200mbar, έως ότου εξατμιστεί πλήρως ο διαλύτης.
4. Μετά το πέρας της εξάτμισης, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται για 1ώρα στον επωαστήρα στους 42°C.
5. Το δείγμα απομακρύνεται από τον επωαστήρα, και ψύχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
6. Προστίθεται 1mL χλωροφόρμιο προκειμένου να γίνει η επαναδιάλυση των λιπαρών.
7. Ακολουθεί προσθήκη 2.5 mL διαλύματος υδροχλωρίου (HCl) σε μεθανόλη (MeOH) 8%v/v.
8. Ύστερα το δείγμα αναδεύεται έντονα σε Vortex (VORTEX-GENIE 2) και επωάζεται σε υδατόλουτρο (Selecta Agibat 20) στους 60°C για 15min, αφού πρώτα τοποθετηθεί σε πλαστικό σωλήνα (φάλκον).
9. Μετά την απομάκρυνση από το υδατόλουτρο, προστίθεται 2.5mL υδατικού διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) 5%w/v και έπειτα το δείγμα αναδεύεται στο Vortex (VORTEX-GENIE 2).
10. Προσθέτουμε 1 mL εξανίου και έπειτα από έντονη ανάδευση στο Vortex (VORTEX-GENIE 2) παρατηρούμε το σχηματισμό 2 φάσεων, παραλαμβάνουμε την επάνω φάση που περιέχει τα λιπίδια και τη μεταφέρουμε σε νέο φάλκον.
11. Έπειτα προσθέτουμε εκ νέου 1 mL εξανίου αναδεύουμε. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται άλλες τρεις φορές.
12. Τέλος, ακολουθεί ο προσδιορισμός των FAMES που πραγματοποιείται με τη χρήση συστήματος GC-MS (GAS CHROMATOGRAPH SHIMADZU GC-17A).

13. Τα αποτελέσματα που παραλαμβάνουμε αφορούν τα μη εγκλεισμένα λιπαρά οξέα, δεδομένου ότι η κυκλοδεξτρίνη δε διαλύεται στο εξάνιο, συνεπώς με βάση αυτά υπολογίζεται η απόδοση εγκλεισμού των λιπαρών οξέων στην κυκλοδεξτρίνη.

Προκειμένου να μελετηθεί η ολική ποσότητα του κολλαγόνου που πραγματικά εγκλείεται στις νανοϊνες, χρησιμοποιείται διαλύτης, ο οποίος διαλύει τη μήτρα, έτσι ώστε το εγκλεισμένο κολλαγόνο να αποδεσμευθεί και να είναι εφικτός ο προσδιορισμός της απόδοσης εγκλεισμού του κολλαγ. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιείται η παρακάτω πειραματική διαδικασία:

1. Ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό (KERN ABS 220) 0,3g νανοϊνών ενθυλακωμένων λιπαρών οξέων και κολλαγόνου σε κυκλοδεξτρίνη που παράχθηκαν στο electrospinning στις βέλτιστες συνθήκες τάσης και ροής που αναφέρονται παραπάνω (για χρόνο $t=30$ min), τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL μαζί με 30mL υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.05M και αναδεύονται για 30min στο μαγνητικό αναδευτήρα (SELECTA MULTIMATIC-5N).
2. Έπειτα παρασκευάζονται τα Διαλύματα Α και Β όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 3.2.3 και στους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0,72mL διαλύματος Α και 0,08mL διαλύματος Β στα οποία, αφού γίνει καλή ανάδευση στο Vortex, προστίθεται 0,8mL από το διάλυμα που παρασκευάστηκε στο βήμα 1. Στο τυφλό δείγμα προστίθενται 0,8mL διαλύματος οξικού οξέος 0.05M.
3. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται έντονα σε Vortex και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 50°C για 20min.
4. Έπειτα αφού ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προστίθενται 2,4mL αραιωμένου διαλύματος Folin ciocalteu (αραίωση 1:15), αναδεύονται και επανατοποθετούνται στο υδατόλουτρο στους 50°C για 10min.
5. Τα δείγματα, τέλος, ψύχονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, και φωτομετρούνται στα 650nm.
6. Με βάση τη καμπύλη αναφοράς προσδιορίζεται η συγκέντρωση του κολλαγόνου.



Εικόνα 36: Προσδιορισμός ολικού κολλαγόνου στο προϊόν εγκλεισμού.

3.2.5.2 Υπόλοιπες τεχνικές (SEM, ATR-FTIR)

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) συνιστά μια από τις πλέον σύγχρονες και ευέλικτες μεθόδους ανάλυσης της μικροδομής πολυάριθμων υλικών. Η απαίτηση υπέρβασης των περιορισμών στη μεγέθυνση και στη διακριτική ικανότητα των οπτικών μικροσκοπίων οδήγησε στην ανακάλυψη και εφαρμογή των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης ή διαπερατότητας (TEM, Transmission Electron Microscope) ήταν το πρώτο είδος ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και στη συνέχεια ακολούθησε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM, Scanning Electron Microscope).

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο προκειμένου να αναλύσει δείγματα σε λεπτομερέστερη κλίμακα από το οπτικό μικροσκόπιο, χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως. Τα ηλεκτρόνια έχουν τη δυνατότητα να εστιάζουν σε πολύ μικρότερη επιφάνεια (π.χ. σε κόκκο υλικού) συγκριτικά με τα φωτεινά κύματα, σαρώνοντας την επιφάνεια του δείγματος με το οποίο

αλληλοεπιδρά. Από την αλληλεπίδραση γνωστοποιούνται πληροφορίες σχετικά με τα άτομα των στοιχείων που περιλαμβάνονται στο προς εξέταση δείγμα. Από τα άτομα αυτά εκπέμπονται κατά βάση δευτερογενή (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) ηλεκτρόνια αλλά και ακτίνες-Χ. Η ένταση των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του δείγματος. Για το λόγο αυτό, το SEM παρέχει πληροφορίες κυρίως για τη μορφολογία και τη σύσταση της επιφάνειας.

Η βασική αρχή λειτουργίας του SEM αποτελείται από την ακτινοβολία του δείγματος και από μια καλά εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων. Ως όγκος αλληλεπίδρασης καλείται η περιοχή στην οποία ενεργητικά ηλεκτρόνια αλληλοεπιδρούν με το στερεό δείγμα, εναποθέτοντας ενέργεια και παράγοντας τις μετρούμενες μορφές δευτερεύουσας ακτινοβολίας. Η διείδυση της δέσμης στο δείγμα επηρεάζεται από τις εξής τέσσερις παραμέτρους (κυρίως από τις παραμέτρους 3. και 4.) :

1. Αριθμός ηλεκτρονίων στην δέσμη
2. Διάμετρο της δέσμης
3. Ταχύτητα/Ενέργεια των ηλεκτρονίων
4. Είδος του δείγματος (Μέσος ατομικός αριθμός του δείγματος) [39].

Προκειμένου να εξεταστεί η μορφολογία των νανοϊνών που συλλέγονται στην επιφάνεια συλλογής κατά το electrospinning τα δείγματα εξετάζονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). Για την παραλαβή των δειγμάτων, ο συλλέκτης καλύπτεται με αλουμινόχαρτο πάνω στο οποίο έχουν τοποθετηθεί δειγματοφορείς κατάλληλοι για το SEM. Έπειτα, προκειμένου τα δείγματα να γίνουν αγώγιμα, τοποθετούνται σε συσκευή επιχρύσωσης (SC7620 Mini Sputter Coater, Quorum Technologies) για 105 sec.



Εικόνα 37 :Αριστερά: Συσκευή επιχρύσωσης (SC7620 Mini Sputter Coater, Quorum Technologies), Δεξιά: Συλλογή δείγματος στο αλουμινόχαρτο πάνω στο οποίο έχουν τοποθετηθεί δειγματοφορείς.

Τέλος, τα επιχρωσμένα δείγματα τοποθετούνται για ανάλυση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (FEI Quanta 200 SEM), SEM, στα 12.5kV, με χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή LFD, άνοιγμα δέσμης ηλεκτρονίων (spot size)=4.5 και μεγέθυνση στα 5 μm.



Εικόνα 38: Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (FEI Quanta 200 SEM)

Τα φασματόμετρα *FTIR* είναι φασματόμετρα απλής δέσμης που δεν έχουν μονοχρωμάτορα φράγματος, αλλά χρησιμοποιούν ένα συμβολόμετρο τύπου Michelson, ο οποίος τοποθετείται μεταξύ της πηγής και του δείγματος. Το φως διέρχεται μέσω ενός σχάστη δέσμης, που διαχωρίζει το φως σε δύο δέσμες, από τις οποίες η μίας ανακλάται σ' ένα σταθερό κάτοπτρο και η άλλη ανακλάται σε ένα κινητό κάτοπτρο, του οποίου μεταβάλλεται η απόσταση από το διαχωριστή δέσμης. Έπειτα, οι δύο αυτές δέσμες ενώνονται, αλλά η διαφορά μήκους των διαδρομών δημιουργεί μια διάταξη παρεμβολών, το συμβολόγραμμα. Ύστερα διασχίζουν το δείγμα, το οποίο απορροφά όλα τα διαφορετικά μήκη κύματος που χαρακτηρίζουν το φάσμα και αφαιρούνται από το συμβολόγραμμα. Τέλος προσκρούουν στον ανιχνευτή, που μετράει τη διακύμανση ενέργειας ως προς το χρόνο για όλα τα μήκη κύματος ταυτόχρονα. Μια σάρωση απαιτεί μόλις λίγα δευτερόλεπτα και αποθηκεύεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή [40].

Για τη διεξαγωγή της ανάλυσης με Φασματομετρία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Τα δείγματα που αναλύονται είναι οι νανοΐνες των ενθυλακομένων λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου, νανοΐνες κυκλοδεξτρίνης, σκόνη ωμέγα-3 λιπαρών οξέων από ψάρια και σκόνη κολλαγόνου από ψάρια.
2. Πριν τη φωτομέτρηση κάθε δείγματος πραγματοποιείται μια σάρωση χωρίς δείγμα προκειμένου να μηδενιστεί ο θόρυβος.
3. Ακολούθως, εισάγεται επαρκής ποσότητα σκόνης από ένα δείγμα κάθε φορά, με σπαθίδα στο κέντρο της επιφάνειας μέτρησης του οργάνου, κλείνεται το καπάκι και πραγματοποιείται η σάρωση.



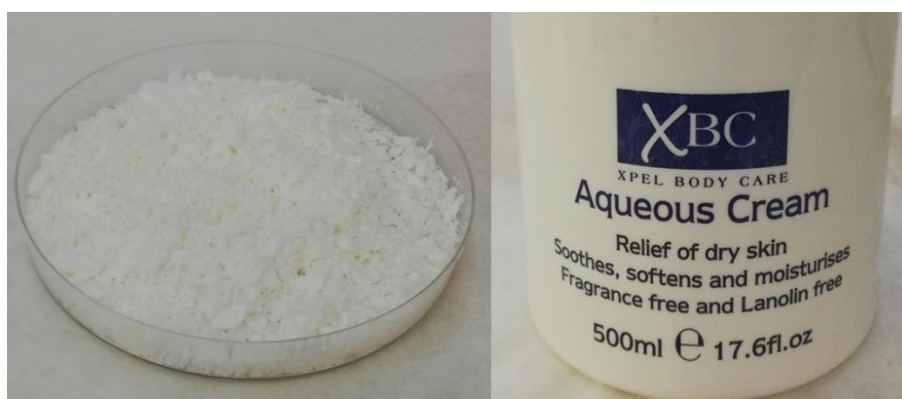
Εικόνα 39:Φασματοόμετρο υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (JASCO FT/IR-4200).

3.2.6 Ανάπτυξη καλλυντικών κρεμών και μικροβιολογική ανάλυση

3.2.6.1 Ενσωμάτωση βιοδραστικών συστατικών και προετοιμασία δειγμάτων

Οι συνθήκες τάσης, ογκομετρικής παροχής και απόστασης της επιφάνειας συλλογής από το ακροφύσιο που επιλέχθηκαν ως βέλτιστες για την παραγωγή νανοϊνών στο electrospinning, χρησιμοποιούνται για την παραγωγή επαρκούς ποσότητας νανοϊνών με σκοπό την ενσωμάτωσή τους σε καλλυντικές κρέμες.

Για το σκοπό αυτό διεξήχθησαν σειρά πειραμάτων για τη συλλογή επαρκούς ποσότητας νανοϊνών, που περιέχουν ωμέγα-3 λιπαρά οξέα και κολλαγόνο, εγκλεισμένα σε κυκλοδεξτρίνη. Δεδομένου ότι η επιθυμητή ποσότητα βιοδραστικών συστατικών (ωμέγα-3 και κολλαγόνου) στην κρέμα είναι 1% υπολογίστηκε η απαραίτητη ποσότητα νανοϊνών που πρέπει να παραχθεί. Έπειτα από τη συλλογή της απαραίτητης ποσότητας, οι ίνες θρυμματίζονται, ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό (KERN ABS 220) και εισάγονται στην κρέμα βάση.



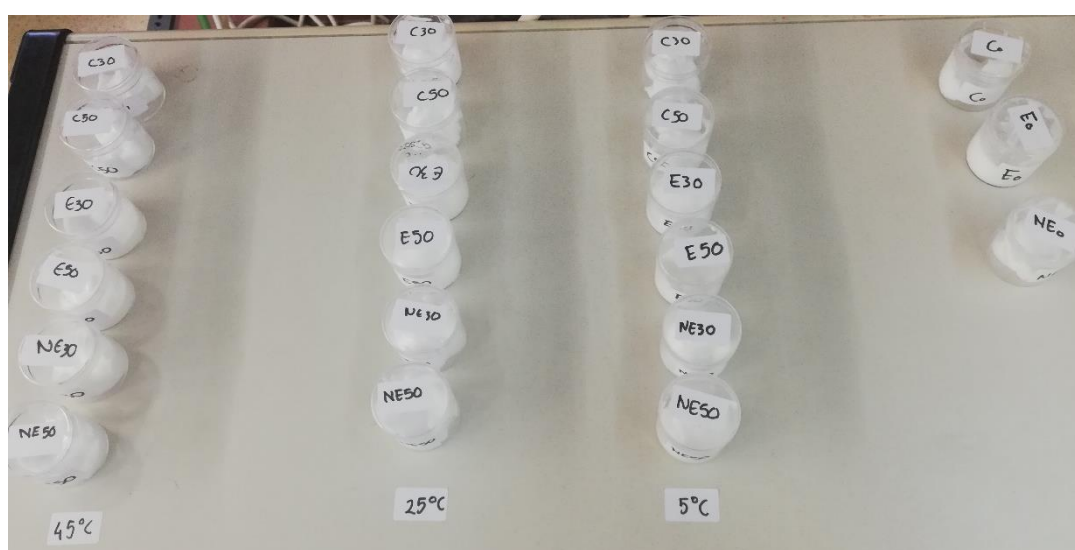
Εικόνα 40: Αριστερά: Νανοΐνες DHA και κολλαγόνου σε κυκλοδεξτρίνη Δεξιά: Χρησιμοποιούμενη κρέμα βάση.

Η κρέμα βάση, χωρίς πρόσθετο, ήταν το δείγμα control (C), η κρέμα με μη εγκλεισμένα ωμέγα-3 και κολλαγόνο, σε ποσότητα βιοδραστικών 1%, είναι το δείγμα με κωδικό NE (No Encapsulated) και η κρέμα με τα εγκλεισμένα σε κυκλοδεξτρίνη ωμέγα-3 και κολλαγόνο φέρει τον κωδικό E (Encapsulated).

Πίνακας 9: Κωδικοί δειγμάτων κρέμας.

Δείγματα	Κωδικός
Κρέμα βάση, χωρίς πρόσθετο	Control (C)
Κρέμα βάση, με μη εγκλεισμένα ωμέγα-3 και κολλαγόνο	No Encapsulated (NE)
Κρέμα βάση, με εγκλεισμένα σε κυκλοδεξτρίνη ωμέγα-3 και κολλαγόνο	Encapsulated (E)

Από τις τρεις κρέμες (Πίνακας 9) το υλικό χωρίστηκε συνολικά σε 21 δείγματα (7 για κάθε διαφορετική κρέμα), εκ των οποίων τρία δείγματα, ένα από τη κάθε κρέμα (C, NE, E) αναλύονται σε χρόνο $t=0$. Τα υπόλοιπα δείγματα τοποθετούνται σε θερμοκρασίες 5°C , 25°C και 45°C έτσι ώστε να αναλυθούν σε χρόνους $t=30\text{days}$ και $t=50\text{days}$, προκειμένου να αναλυθεί η σταθερότητα της κρέμας με τη πάροδο του χρόνου. Η θερμοκρασία 45°C επιλέχθηκε ως επιταχυνόμενη συνθήκη για τη μελέτη της διάρκειας ζωής των κρεμών.



Εικόνα 41: Παρασκευή δειγμάτων κρεμών C, NE, E για μελέτη της σταθερότητας τους με το χρόνο σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

3.2.6.2 Μικροβιολογική ανάλυση κρεμών

Προκειμένου να γίνει η μικροβιακή ανάλυση των κρεμών ακολουθείται η παρακάτω πειραματική διαδικασία:

1. Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα Ringer, διαλύοντας μια ταμπλέτα σε 500mL απιονισμένο νερό.
2. Πραγματοποιείται επάλειψη των συσκευασιών των κρεμών με αιθανόλη πριν το άνοιγμα.
3. Λαμβάνεται σε ασηπτικές συνθήκες 1g από κάθε κρέμα και τοποθετείται σε 9mL διαλύματος Ringer (αραίωση 1:10).
4. Ακολουθεί έντονη ανάδευση στο Vortex (VORTEX-GENIE 2) σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Η δειγματοληψία από τις κρέμες πραγματοποιήθηκε σε $t=0$, $t=30\text{days}$ και σε $t=50\text{days}$.



Εικόνα 42: Απαγωγός μικροβιολογίας (NÜVE MN 090 Microbiological Safety Cabinet).

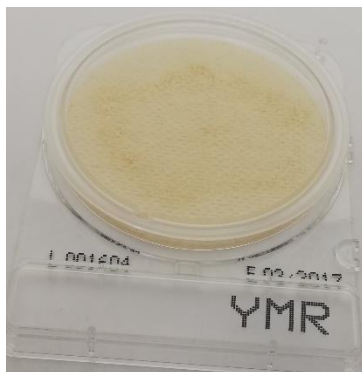
6. Προκειμένου να προσδιορισθεί η μικροβιακή σταθερότητα των κρεμών, γίνεται έλεγχος των κρεμών ως προς το ολικό μικροβιακό φορτίο (Total bacterial count), τις ζύμες και τις μούχλες (Yeasts/Moulds) και το παθογόνο βακτήριο *Escherichia coli*.
7. Για το προσδιορισμό του ολικού μικροβιακού φορτίου 1mL του αραιωμένου δείγματος που παρασκευάστηκε στο βήμα 3 τοποθετείται σε τρυβλία (Compact Dry TC, Hyserve GmbH&Co.KG, Uffing, Germany) που περιέχουν το κατάλληλο θρεπτικό υλικό και επωάζονται στους 37°C για 48ώρες. Ύστερα μετράται ο αριθμός των αποικιών του κάθε τρυβλίου. Στα δείγματα με μικρό αριθμό αποικιών η ένδειξη καταγράφεται ως <math><100\text{ cfu/g of product}</math>.



Εικόνα 43: Τρυβλίο προσδιορισμού ολικού μικροβιακού φορτίου (Compact Dry TC, Hyserve GmbH&Co.KG, Uffing, Germany).

8. Οι ζύμες και οι μούχλες είναι μύκητες που μπορούν να προκαλέσουν μολύνσεις του ανοσοκατασταλτικού συστήματος, για αυτό το λόγο θεωρείται σκόπιμος ο έλεγχος των κρεμών ως προς την ύπαρξη τέτοιων μυκήτων. Για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός τους, 1mL του αραιωμένου διαλύματος που παρασκευάστηκε στο βήμα 3 τοποθετείται σε κατάλληλο τρυβλίο για ζύμες και μύκητες (Compact Dry YM, Hyserve GmbH&Co.KG, Uffing, Germany). Ακολουθεί

επώαση στους 30°C για 3 μέρες σε σκοτάδι και έπειτα καταμέτρηση του αριθμού των αποικιών του κάθε τρυβλίου. Να σημειωθεί ότι οι αποικίες των ζυμών παρουσιάζουν ροζ χρώμα, ενώ οι μούχλες εμφανίζονται με νηματοειδής αποικίες διάφορων αποχρώσεων του ροζ.



Εικόνα 44: Τρυβλίο προσδιορισμού ζυμών και μούχλας (Compact Dry YMR, Hyserve GmbH&Co.KG, Uffing, Germany).

9. Το *E.coli* είναι ένας παθογόνος μικροοργανισμός υψηλής επικινδυνότητας. Προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός της ύπαρξης *E.coli*, 1mL του διαλύματος που παρασκευάστηκε στο βήμα 3 απλώνεται σε τρυβλίο με κατάλληλο θρεπτικό υλικό (Compact Dry EC, Hyserve GmbH&Co.KG, Uffing, Germany) για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η απαρίθμηση των αποικιών, τα τρυβλία επώαση στους 37°C για 24 ώρες.



Εικόνα 45: Τρυβλίο προσδιορισμού *Escherichia coli* (Compact Dry EC, Hyserve GmbH&Co.KG, Uffing, Germany).

3.2.6.3 Μέτρηση pH

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μέτρηση του pH των κρεμών στο χρόνο $t=0$ αλλά και των κρεμών που έχουν αποθηκευτεί σε θερμοκρασίες 5°C, 25 °C, 45 °C σε χρόνους $t=30$ days και $t=50$ days ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα Ringer διαλύοντας μια ταμπλέτα σε 500mL απιονισμένο νερό.
2. Ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό (KERN ABS 220) 1g από την κάθε κρέμα και τοποθετείται σε φάλλον όπου διαλύεται με 9mL διαλύματος Ringer (αραίωση 1:10).
3. Τέλος, πραγματοποιείται η μέτρηση του pH του κάθε δείγματος με τη χρήση ηλεκτρονικού πεχάμετρου (MARTINI Instruments 180 Bench Meter).



Εικόνα 46: Ηλεκτρονικό πεχάμετρο (MARTINI Instruments 180 Bench Meter).

3.2.6.4 Μέτρηση του χρώματος

Για τη διεξαγωγή ανάλυσης χρώματος, επαρκής ποσότητα κρέμας εναποτίθεται επάνω σε πλάκα. Το χρώμα όλων των δειγμάτων μετρήθηκε με το χρωματόμετρο (MiniScan XE Hunter Associates Laboratory Inc, Reston, Virginia). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση των κρεμών τόσο σε χρόνο $t=0$, όσο και στους χρόνους $t=30$ days και $t=50$ days για τις διάφορες θερμοκρασίες αποθήκευσης των κρεμών. Χρησιμοποιώντας το σύστημα μέτρησης χρώματος Lab, ο κεντρικός κατακόρυφος άξονας αναπαριστά τη φωτεινότητα (συμβολίζεται με L^*), η οποία λαμβάνει τιμές από 0 (μαύρο χρώμα) μέχρι 100 (άσπρο χρώμα). Οι άξονες χρώματος βασίζονται στο γεγονός ότι ένα δείγμα δεν μπορεί να έχει ταυτόχρονα κόκκινο και πράσινο χρώμα ή ταυτόχρονα μπλε και κίτρινο χρώμα, διότι τα χρώματα στα δύο αυτά ζεύγη χρωμάτων είναι αντίθετα. Σε κάθε άξονα χρώματος, οι τιμές κυμαίνονται από θετικές έως και αρνητικές. Στον άξονα $a-a'$, οι θετικές τιμές υποδεικνύουν την ύπαρξη κόκκινου χρώματος, ενώ οι αρνητικές τιμές δείχνουν την ύπαρξη πράσινου χρώματος. Στον άξονα $b-b'$, οι θετικές τιμές αντιστοιχούν στο κίτρινο ενώ οι αρνητικές τιμές στο μπλε. Πριν τη μέτρηση χρώματος, το χρωματόμετρο βαθμονομείται με τη χρήση ενός λευκού και ενός μαύρου πλακιδίου βαθμονόμησης. Οι χρωματικές αλλαγές κατά την αποθήκευση εκφράζονται με τη ποσότητα ΔE . Το χρώμα των δειγμάτων κρέμας που μετρήθηκαν κατά τη πρώτη μέρα της δειγματοληψίας χρησιμοποιείται ως δείγμα αναφοράς. Η ποσότητα ΔE εκφράζει την ολική μεταβολή χρώματος η οποία προσδιορίζεται από τον τύπο:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$



Εικόνα 47: Χρωματόμετρο (MiniScan XE Hunter Associates Laboratory Inc, Reston, Virginia).

3.2.6.5 Δυναμική μηχανική ανάλυση (Dynamic Mechanical Analysis –DMA)

Η δυναμική μηχανική ανάλυση, γνωστή ως *DMA*, είναι ένα βασικό εργαλείο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων των υλικών, ιδιαίτερα των πολυμερών. Τα ιξωδοελαστικά υλικά, όπως τα πολυμερή, εμφανίζουν τόσο ελαστικές ιδιότητες, χαρακτηριστικές των στερεών υλικών, όσο και ιξώδεις ιδιότητες, χαρακτηριστικές των υγρών. Το όργανο εφαρμόζει μια ταλαντευόμενη δύναμη στο υλικό και μετρά την απόκριση του, με τέτοιου είδους πειράματα μπορεί να υπολογιστεί η τάση και η ακαμψία του υλικού. Κατά την *DMA* εξέταση ασκείται στο υλικό μια ημιτονοειδής τάση, που παράγει μια μεταβαλλόμενη παραμόρφωση η οποία καθυστερεί ως προς την αρχική διέγερση. Η διαφορά φάσεως που εμφανίζεται σχετίζεται με τη δομή του υλικού, και εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ των ιξώδων και των ελαστικών ιδιοτήτων του υλικού. Για ιδανικά ελαστικά συστήματα η τάση και η παραμόρφωση βρίσκονται σε φάση και η γωνία φάσης (δ) είναι ίση με 0. Για ιξώδη συστήματα, η εφαρμοζόμενη τάση προηγείται κατά 90° . Ενώ η γωνία φάσης των ιξωδοελαστικών υλικών είναι ενδιάμεση των δύο αυτών τιμών. Ουσιαστικά, η γωνία φάσης μεταξύ της τάσης και της παραμόρφωσης φανερώνει την ιξωδοελαστικότητα του υλικού. Μια μικρή γωνία φάσης υποδηλώνει ότι το υλικό είναι πολύ ελαστικό, ενώ μια μεγάλη γωνία φάσης δείχνει ότι το υλικό είναι πολύ ιξώδες. Η τεχνική *DMA* παραμορφώνει μηχανικά ένα δοκίμιο και μετρά την απόκριση του. Η παραμόρφωση μπορεί να εφαρμοσθεί ημιτονοειδώς, με σταθερά βήματα ή με δεδομένο ρυθμό. Η απόκριση του δοκιμίου καταγράφεται ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ή του χρόνου. Η χρησιμότητα του *DMA* βασίζεται στην ικανότητα του να μιμείται τις συνθήκες λειτουργίας του υλικού, δίνοντας τη δυνατότητα πρόβλεψης της συμπεριφοράς του [41, 42].

Η λειτουργία του *DMA* βασίζεται σε δύο σημαντικές έννοιες της τάσης (stress) και της παραμόρφωσης (strain). Η τάση ορίζεται ως η δύναμη, F , που εφαρμόζεται σε ένα εμβαδό, A : $\sigma = F/A$. Η τάση σε ένα υλικό προκαλεί την παραμόρφωση του, γ . Η παραμόρφωση μπορεί να υπολογιστεί από τη διαίρεση της μεταβολής των διαστάσεων του δείγματος ΔY ως προς τις αρχικές διαστάσεις του δείγματος: $\gamma = \Delta Y/Y$. Το μέτρο ελαστικότητας (E), που είναι ένα μέτρο της ακαμψίας του υλικού, υπολογίζεται από τη κλίση του διαγράμματος τάσης-παραμόρφωσης. Το μέτρο ελαστικότητας, εξαρτάται τόσο από την εφαρμοζόμενη τάση όσο και από την θερμοκρασία. Η σχέση μεταξύ της τάσης της ταλάντωσης και της καταπόνησης καθίσταται σημαντική για τον προσδιορισμό των ιξωδοελαστικών ιδιοτήτων του υλικού. Η εφαρμοζόμενη τάση μπορεί να περιγραφεί από μια συνάρτηση ημιτόνου όπου σ είναι η μέγιστη τάση που εφαρμόζεται, ω είναι η συχνότητα της εφαρμοζόμενης τάσης και t είναι ο χρόνος [42]. Το *DMA* είναι ένα όργανο ιδιαίτερα χρήσιμο για τη βιομηχανία των τροφίμων και των καλλυντικών, όπου η επεξεργασία των υλικών μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την υφή, τη γεύση και την εμφάνιση του τελικού προϊόντος. Το *DMA* συμβάλλει

στην απόκτηση γνώσεων σχετικών με την ποιότητα των προϊόντων μέσω της προσομοίωσης των συνθηκών επεξεργασίας.

Τα βασικά μεγέθη που προσδιορίζονται είναι:

- Το μέτρο αποθήκευσης G' : μέγεθος υπολογισμού της ενέργεια παραμόρφωσης που αποθηκεύεται στο δείγμα κατά τη διαδικασία διάτμηση του, και φανερώνει την ελαστική συμπεριφορά του ρευστού.
- Το μέτρο απωλειών G'' : μέγεθος μέτρησης της ενέργειας παραμορφώσεως που αποθηκεύεται στο δείγμα κατά τη διαδικασία διάτμηση του, και είναι ενδεικτικό της ιξώδης συμπεριφοράς του υλικού.
- Το σύνθετο ιξώδες η^* .

Η μέτρηση του ιξώδους των δειγμάτων των κρεμών πραγματοποιείται με χρήση της Δυναμικής Μηχανικής Ανάλυσης (*DMA*). Αρχικά, το δείγμα κάθε κρέμας (*C*, *NE*, *E*) σε χρόνο $t=0$ εισάγεται στην κάτω κυκλική πλάκα (διάταξη συσκευής plate-plate) του ροόμετρου (*Physica MCR 301 Anton Paar DMA analyzer*). Η θερμοκρασία ρυθμίζεται ίση με 25°C , και η συχνότητα γ ίση με 0.1% , η γωνιακή συχνότητα ω μεταβαλλόταν σε εύρος 10^2 και 10^{-1} rad/s. Όμοια, εξετάζονται και τα δείγματα *C*, *NE*, *E* σε χρόνο $t=30\text{days}$ και $t=50\text{days}$ που είχαν αποθηκευτεί σε θερμοκρασίες 5°C , 25°C και 45°C .



Εικόνα 48: Μηχανική Δυναμική Ανάλυση, *DMA* (*Physica MCR 301 Anton Paar DMA analyzer*)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Προσδιορισμός Τετραδοτοξίνης (ΤΤΧ) στα δείγματα *L. Sceleratus*

Η παραλαβή της ΤΤΧ από τον *L. Sceleratus* γίνεται τόσο από την σάρκα, όσο και από τα εσωτερικά όργανα του ψαριού, με τη χρήση είτε υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 0.1% v/v, είτε διαλύματος οξικού οξέος 1% σε μεθανόλη. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν κωδικοποιήθηκαν ως εξής:

Δείγμα 1: εκχύλιση ΤΤΧ από σάρκα λαγοκέφαλου με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.1%.

Δείγμα 2: εκχύλιση ΤΤΧ από σάρκα λαγοκέφαλου με διάλυμα οξικού οξέος 1% σε μεθανόλη.

Δείγμα 3: εκχύλιση ΤΤΧ από εσωτερικά όργανα λαγοκέφαλου με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.1%.

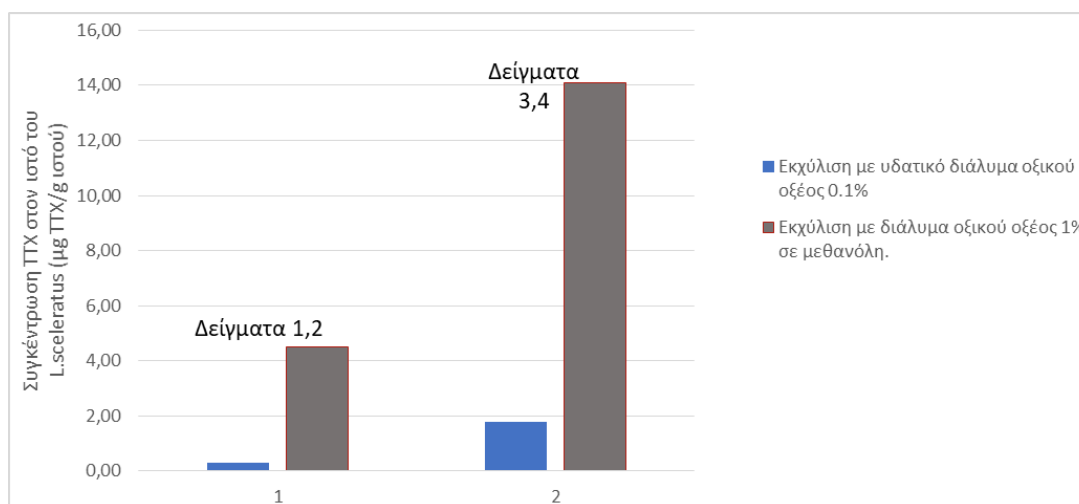
Δείγμα 4: εκχύλιση ΤΤΧ από εσωτερικά όργανα λαγοκέφαλου με διάλυμα οξικού οξέος 1% σε μεθανόλη.

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από την ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων με LC-MS/MS παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

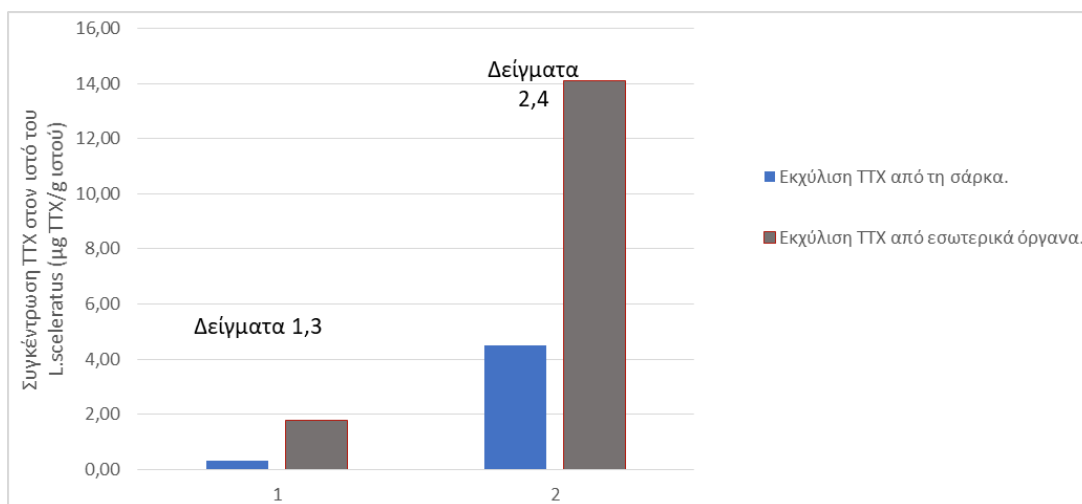
Πίνακας 10: Συγκέντρωση ΤΤΧ στα εξεταζόμενα δείγματα λαγοκέφαλου.

A/A	Συγκέντρωση ΤΤΧ στο διάλυμα εκχύλισης (μg ΤΤΧ/mL διαλύματος)	Ποσότητα ΤΤΧ στον ιστό του λαγοκέφαλου (μg ΤΤΧ)	Συγκέντρωση ΤΤΧ στον ιστό του λαγοκέφαλου (μg ΤΤΧ/g ιστού)
Δείγμα 1	0.09	9	0.3
Δείγμα 2	0.53	53	1.77
Δείγμα 3	1.35	135	4.5
Δείγμα 4	4.22	422	14.1

Από τον Πίνακα 10, συγκρίνοντας κατά ζεύγη τα Δείγματα 1,2 και 3,4 αποδεικνύεται ότι αποδοτικότερη εκχύλιση έχει επιτευχθεί με το διάλυμα οξικού οξέος 1% σε μεθανόλη, συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0.1%. Επίσης, παρατηρείται ότι τα εσωτερικά όργανα περιέχουν αυξημένη συγκέντρωση ΤΤΧ σε σύγκριση με τη σάρκα, όπως προκύπτει από τη σύγκριση των Δειγμάτων 1,3 και 2,4.



Διάγραμμα 1: Σύγκριση διαλυτών εκχύλισης της ΤΤΧ από τη σάρκα και τα όργανα του ψαριού.



Διάγραμμα 2: Σύγκριση της συγκέντρωσης της TTX μεταξύ της σάρκας και των εσωτερικών οργάνων του λαγοκέφαλου με χρήση των δύο διαλυτών.

4.2 Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων από τον *L. Sceleratus* και το σολομό.

Αρχικά, ονομάζονται τα δείγματα των ψαριών από τα οποία έγινε η παραλαβή των λιπαρών οξέων με χρήση δύο διαφορετικών διαλυτών:

Δείγμα 1: Εκχύλιση των λιπαρών οξέων από τη σάρκα του σολομού με μίγμα εξανίου-ισοπροπανόλης.

Δείγμα 2: Εκχύλιση των λιπαρών οξέων από τη σάρκα του λαγοκέφαλου με μίγμα εξανίου-ισοπροπανόλης.

Δείγμα 3: Εκχύλιση των λιπαρών οξέων από τη σάρκα του λαγοκέφαλου με μίγμα χλωροφορμίου μεθανόλης.

Δείγμα 4: Εκχύλιση των λιπαρών οξέων από το δέρμα του λαγοκέφαλου με μίγμα χλωροφορμίου μεθανόλης.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες προκειμένου να γίνει η εξάτμιση των διαλυτών, μετά το πέρας της εκχύλισης των λιπαρών. Προκειμένου να προσδιοριστεί η μάζα των εξαγόμενων λιπαρών που παρέμειναν στην σφαιρική φιάλη μετά την εξάτμιση του διαλύτη πραγματοποιείται εκ νέου ζύγιση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 11: Ποσότητα παραγόμενων ελαίων από τα Δείγματα 1-4.

A/A	Βάρος κενής σφαιρικής φιάλης (g)	Μικτό βάρος σφαιρικής φιάλης με ιχθυέλαιο (g)	Καθαρό βάρος παραγόμενου ιχθυελαίου (g)	Βάρος ιστού προς εκχύλιση (g)	Παραγόμενη ποσότητα ελαίου ανά μονάδα μάζας ιστού (g ελαίου/g ιστού)
Δείγμα 1	80,401	80.465	0.064	5.0	0.0128
Δείγμα 2	134.642	134.645	0.031	5.0	0.0062
Δείγμα 3	124.985	125.127	0.142	18.5	0.0076
Δείγμα 4	140.936	141.123	0.187	22.4	0.0083

Παρατηρώντας τη τελευταία στήλη του Πίνακας 11, συμπεραίνεται ότι:

- Μεταξύ των Δειγμάτων 1,2 και δεδομένου ότι τα δύο είδη έχουν εκχυλιστεί με τον ίδιο διαλύτη στις ίδιες συνθήκες, ο σολομός παράγει μεγαλύτερη ποσότητα ελαίου συγκριτικά με το λαγοκέφαλο.
- Από τα Δείγματα 2 και 3, εξάγεται το συμπέρασμα ότι πιο αποτελεσματικός διαλύτης είναι το μίγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης συγκριτικά με το μίγμα εξανίου-ισοπροπανόλης.

- Τέλος, από τα Δείγματα 3 και 4, συνάγεται ότι ο *L.scleratus* περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα λιπαρών στο δέρμα σε σχέση με τη σάρκα.

Έπειτα από την επαναδιάλυση των λιπαρών σε χλωροφόρμιο και την παρασκευή μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAMES) ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων σε σύστημα GC-MS για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 12: Αποτελέσματα GC-MS για τα εκχυλίσματα λιπαρών που εξήχθησαν από τη σάρκα και το δέρμα του *L.scleratus* και από τη σάρκα του σολομού με τους δύο διαλύτες.

Λιπαρά οξέα	Ονοματολογία Λιπαρού οξέος	Χρόνος έκλυσης, t (min)	Εμβασό			
			Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4
C14:0	Μυριστικό οξύ	11.865	7782	1095	8785	4979
C16:0	Παλμιτικό οξύ	15.790	32974	25283	263849	120645
C18:0	Στεατικό οξύ	19.523	8950	15431	136509	101150
C18:1	Ελαϊκό οξύ	19.120	88673	8146	103985	71650
C22:6	Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA)	25.717	18221	25834	308517	139887

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) ταυτοποιούνται μέσω σύγκρισης με εξωτερικά πρότυπα και ποσοτικοποιούνται με χρήση καμπύλης αναφοράς που σχηματίστηκε χρησιμοποιώντας διαλύματα καθαρών PUFAs αραιωμένων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι καμπύλες αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Για το μυριστικό οξύ (C14:0) η καμπύλη αναφοράς είναι: $y=0.0034 \cdot x$.
- Για το παλμιτικό οξύ (C16:0) η καμπύλη αναφοράς είναι: $y=0.0042 \cdot x$.
- Για το στεατικό οξύ (C18:0) η καμπύλη αναφοράς είναι: $y=0.0047 \cdot x$.
- Για το ελαϊκό οξύ (C18:1) η καμπύλη αναφοράς είναι: $y=0.0029 \cdot x$.
- Για το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA) (C22:6) η καμπύλη αναφοράς είναι: $y=0.0053 \cdot x$.

όπου y : συγκέντρωση και x : εμβασό του χωρίου που περικλείει η καμπύλη διαγράμματος χρόνου (t)- συγκέντρωσης (C).

Με βάση τις πρότυπες καμπύλες, λοιπόν, προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων στα εξαγόμενα λιπαρά των δειγμάτων 1-4, και προκύπτουν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις και ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) στα δείγματα του σολομού και του *L.scleratus* που εκχυλίστηκαν με τα δύο είδη διαλυτών.

Λιπαρά οξέα	Δείγμα 1		Δείγμα 2		Δείγμα 3		Δείγμα 4	
	C (μg/mL)	m (μg)	C (μg/mL)	m (μg)	C (μg/mL)	m (μg)	C (μg/mL)	m (μg)
C14:0	26.5	132.3	3.7	18.6	29.9	149.3	16.9	84.6
C16:0	138.5	692.5	106.2	530.9	1108.2	5540.8	506.7	2533.5
C18:0	42.1	210.3	72.5	362.6	641.6	3208.0	475.4	2377.0
C18:1	257.2	1285.8	23.6	118.1	301.6	1507.8	207.8	1038.9
C22:6	96.6	482.9	136.9	684.6	1635.1	8175.7	741.4	3707.0
Συνολικά		2803.7		1714.9		18581.6		9741.1

Από τον Πίνακα 13 υπολογίζεται η συνολική ποσότητα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ανά μονάδα μάζας ιχθυελαίου για κάθε δείγμα.

Πίνακας 14: Συνολική ποσότητα PUFAs ανά μονάδα μάζας ιχθυελαίου για κάθε δείγμα.

A/A	Συνολική ποσότητα PUFAs (μg)	Μάζα ιχθυελαίου (g)	Συνολική ποσότητα PUFAs ανά μονάδα μάζας ιχθυελαίου (μg/g)
Δείγμα 1	2803.7	0.064	43807.8
Δείγμα 2	1714.9	0.031	55319.4
Δείγμα 3	18581.6	0.142	130856.3
Δείγμα 4	9741.1	0.184	52940.8

Με βάση τον Πίνακα 14: Συνολική ποσότητα PUFAs ανά μονάδα μάζας ιχθυελαίου για κάθε δείγμα. παρατηρείται ότι:

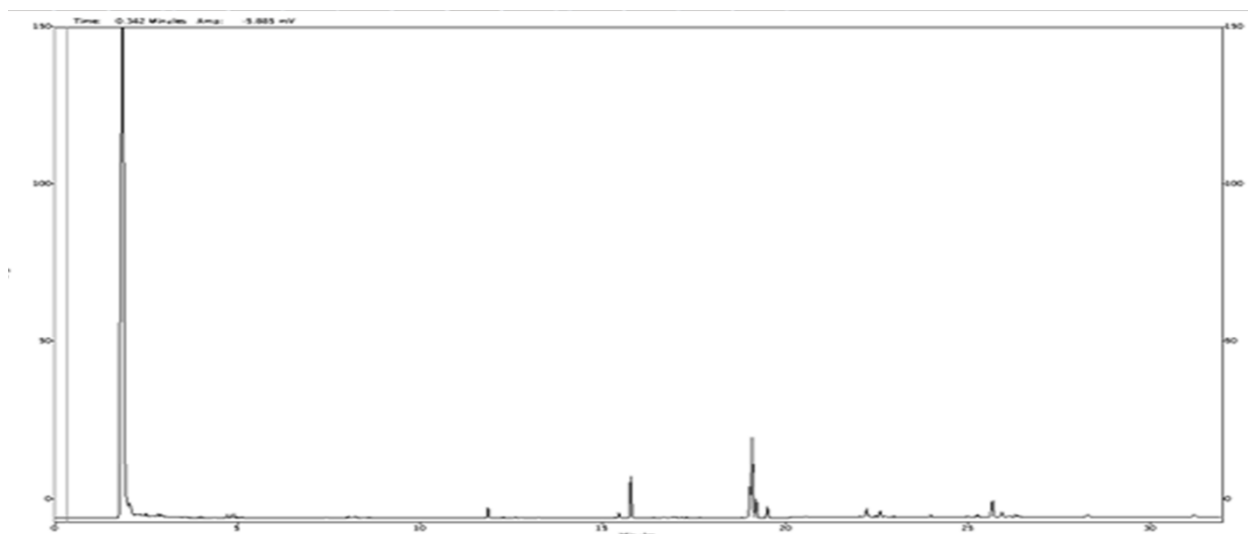
- Παρόλο που ο σολομός παράγει μεγαλύτερη ποσότητα ιχθυελαίου κατά την εκχύλιση του με μίγμα εξανίου-ισοπροπανόλης, περιέχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ανά μονάδα μάζας ελαίου, σε σχέση με τον *L. Sceleratus*.
- Επιπλέον, ενώ από το δέρμα του *L. Sceleratus* παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα ιχθυελαίου συγκριτικά με τη σάρκα, φαίνεται να περιέχει μικρότερη συγκέντρωση PUFAs.

Υπολογίζεται η ποσοστιαία αναλογία λιπαρών οξέων στα παραγόμενα ιχθυέλαια:

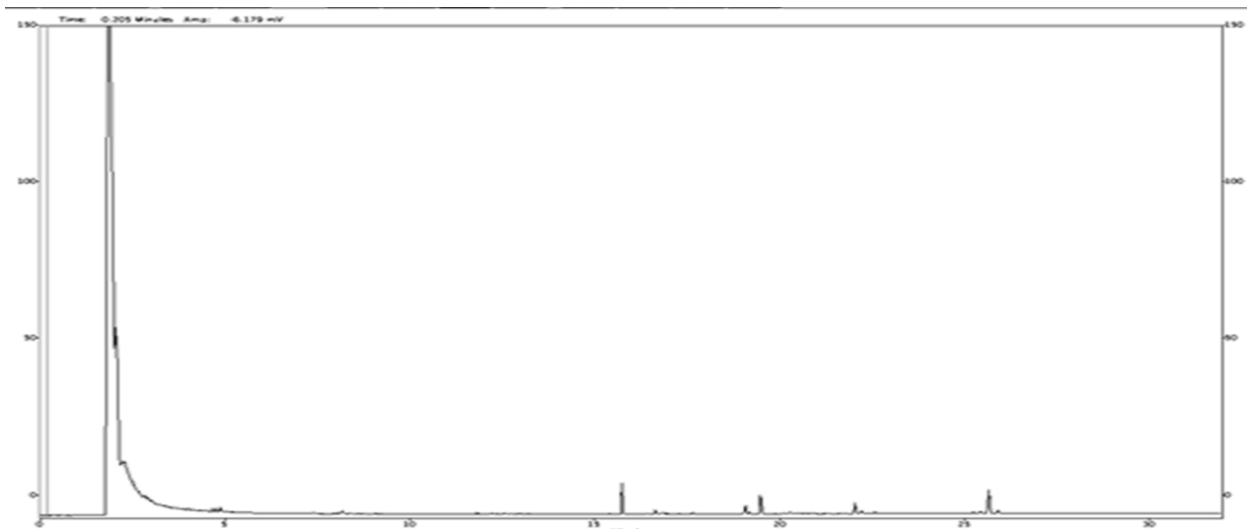
Πίνακας 15: Ποσοστιαία αναλογία λιπαρών οξέων στα παραγόμενα ιχθυέλαια από το σολομό και τον *L. sceleratus* που εκχυλίστηκαν με τα δύο είδη διαλυτών.

Λιπαρά οξέα	Δείγμα 1 (%)	Δείγμα 2 (%)	Δείγμα 3 (%)	Δείγμα 4 (%)
C14:0	4.72	1.09	0.80	0.87
C16:0	24.70	30.96	29.82	26.01
C18:0	7.50	21.15	17.26	24.40
C18:1	45.86	6.89	8.11	10.67
C22:6	17.22	39.92	44.00	38.06

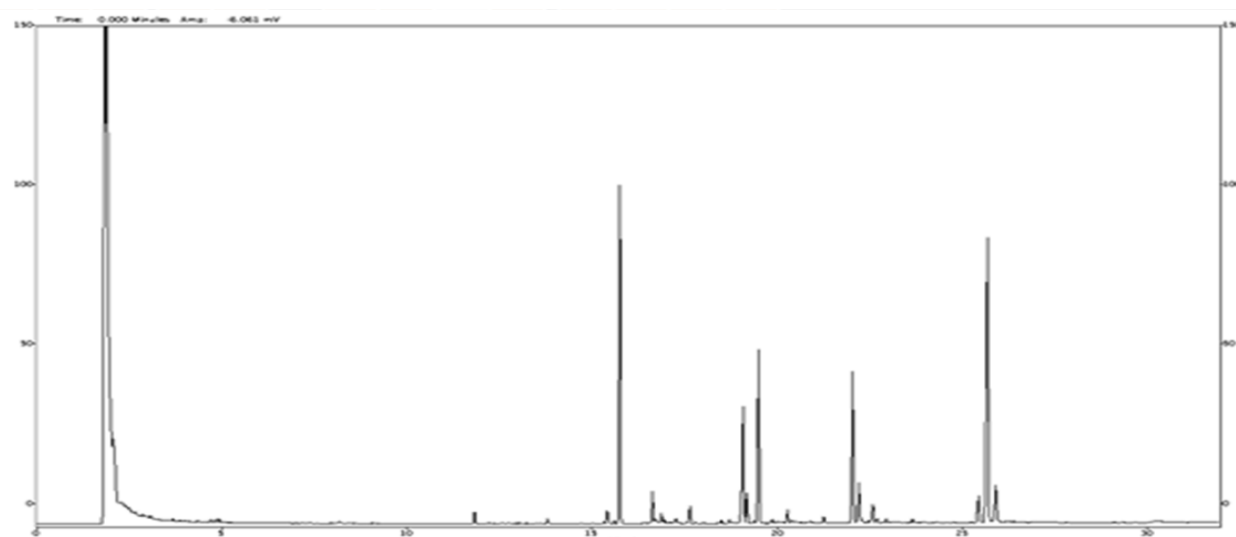
Από τον παραπάνω πίνακα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο σολομός είναι πιο πλούσιος σε ελαϊκό οξύ (C18:1), ενώ ο λαγοκέφαλος σε DHA (C22:6). Όπως, είναι φανερό η ποσότητα του λαγοκέφαλου σε DHA είναι ιδιαίτερα σημαντική, γεγονός που καθιστά το ψάρι μια ενδιαφέρουσα πηγή για την παραγωγή ιχθυελαίων, καθώς το DHA είναι το κυρίαρχο λιπαρό οξύ που χρησιμοποιείται τόσο στη καλλυντική βιομηχανία όσο και σε συμπληρώματα διατροφής και φάρμακα.



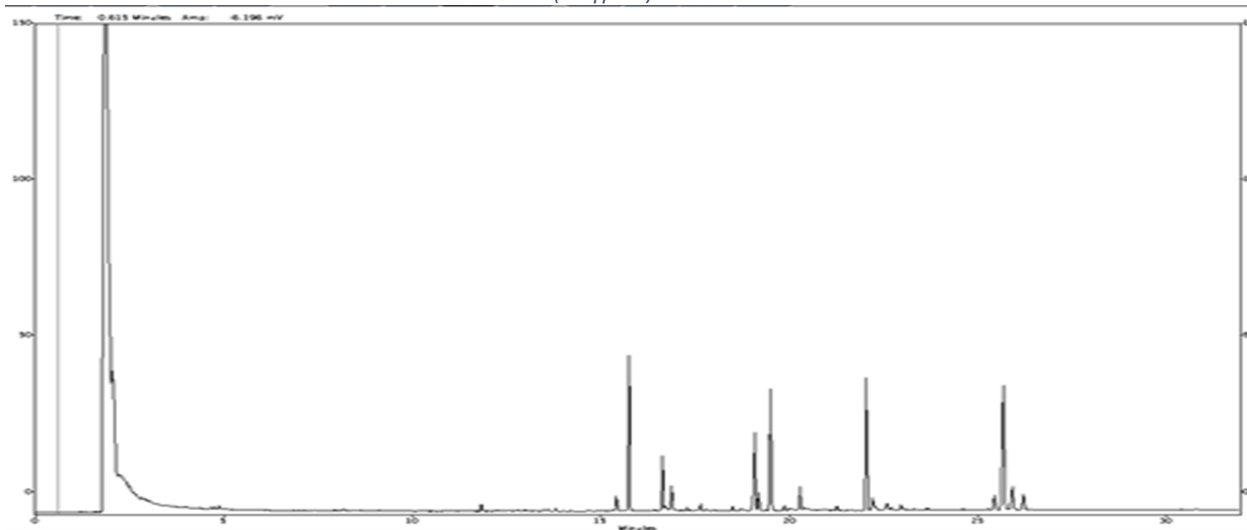
Διάγραμμα 3: Αποτελέσματα GC-MS για την εκχύλιση της σάρκας του σολομού με διάλυμα εξανίου-ισοπροπανόλης (Δείγμα 1).



Διάγραμμα 4: Αποτελέσματα GC-MS για την εκχύλιση της σάρκας του *L.scleratus* με διάλυμα εξανίου-ισοπροπανόλης (Δείγμα 2).



Διάγραμμα 5: Αποτελέσματα GC-MS για την εκχύλιση της σάρκας του *L.scleratus* με διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης (Δείγμα 3).



Διάγραμμα 6: Αποτελέσματα GC-MS για την εκχύλιση του δέρματος του *L.scleratus* με διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης (Δείγμα 4).

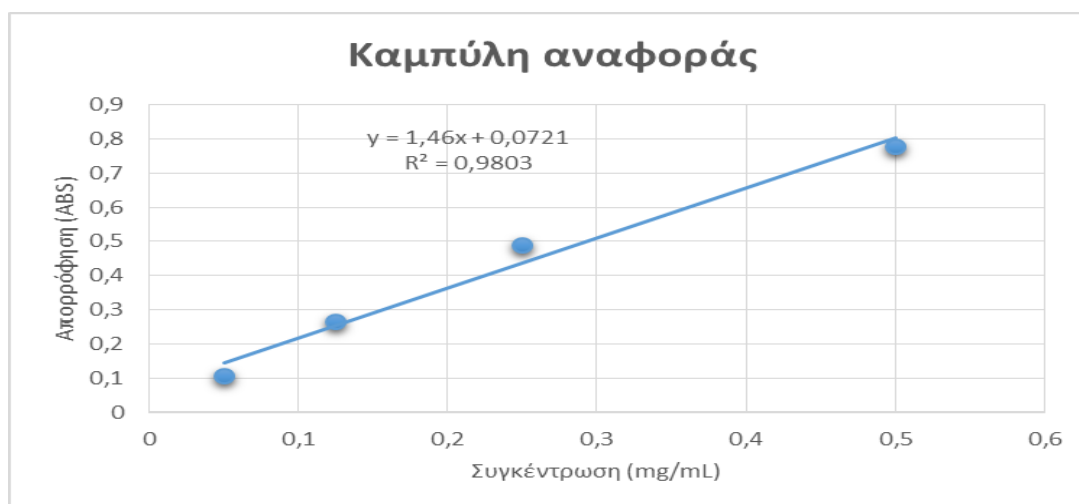
4.3 Προσδιορισμός της ποσότητας κολλαγόνου του *L.scleratus* και του σολομού.

Προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός της ποσότητας κολλαγόνου που περιέχει τόσο ο λαγοκέφαλος όσο και ο σολομός, κατασκευάζεται αρχικά η καμπύλη αναφοράς με τη χρήση πρότυπου διαλύματος κολλαγόνου σε διάφορες αραιώσεις, και μετράται η απορρόφηση τους στο φωτόμετρο, τα αποτελέσματα που προκύπτουν φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 16: Δεδομένα απορρόφησης για τις διάφορες αραιώσεις του διαλύματος πρότυπου κολλαγόνου .

Συγκέντρωση (mg/mL)	Απορρόφηση (ABS)
0.05	0.106
0.1	0.262
0.125	0.267
0.25	0.489
0.5	0.777
1	1.328

Να σημειωθεί ότι η μέτρηση στο πιο πυκνό διάλυμα (1mg/mL), όπου η τιμή της απορρόφησης είναι μεγαλύτερη από 1, δεν λαμβάνεται υπόψιν για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς, διότι θεωρείται ότι βρίσκεται εκτός της γραμμικής περιοχής. Επιπλέον, δεν λαμβάνεται υπόψιν για τη χάραξη της καμπύλης αναφοράς και η μέτρηση για συγκέντρωση 0,1mg/mL, καθώς αποκλίνει από τις άλλες τιμές, πιθανώς λόγω κάποιου τυχαίου σφάλματος.



Διάγραμμα 7: Καμπύλη αναφοράς για το κολλαγόνο.

Ακολούθως, παρουσιάζεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων προς ανάλυση:

Δείγμα Α: δέρμα *L.scleratus* για επεξεργασία με τη μέθοδο ASC

Δείγμα Β: δέρμα *L.scleratus* για επεξεργασία με τη μέθοδο PSC

Δείγμα Γ: δέρμα σολομού για επεξεργασία με τη μέθοδο ASC

Δείγμα Δ: δέρμα σολομού για επεξεργασία με τη μέθοδο PSC

Δείγμα Ε: κόκκαλα *L.scleratus* για επεξεργασία με τη μέθοδο PSC

Δείγμα ΣΤ: κόκκαλα σολομού για επεξεργασία με τη μέθοδο PSC

Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 17: Μετρήσεις φωτομέτρησης για τα Δείγματα Α-ΣΤ.

Δείγμα	Μέτρηση Απορρόφησης (ABS)	Μέτρηση Απορρόφησης (ABS)	Μέσος όρος μετρήσεων απορρόφησης (ABS)
A (αραίωση 1:20)	0.728	0.753	0.7405
B (αραίωση 1:40)	0.652	0.710	0.681
Γ	0.637	0.617	0.627
Δ (αραίωση 1:10)	0.125	0.171	0.148
E (αραίωση 1:20)	0.946	0.876	0.911
ΣΤ (αραίωση 1:20)	0.664	0.691	0.6775

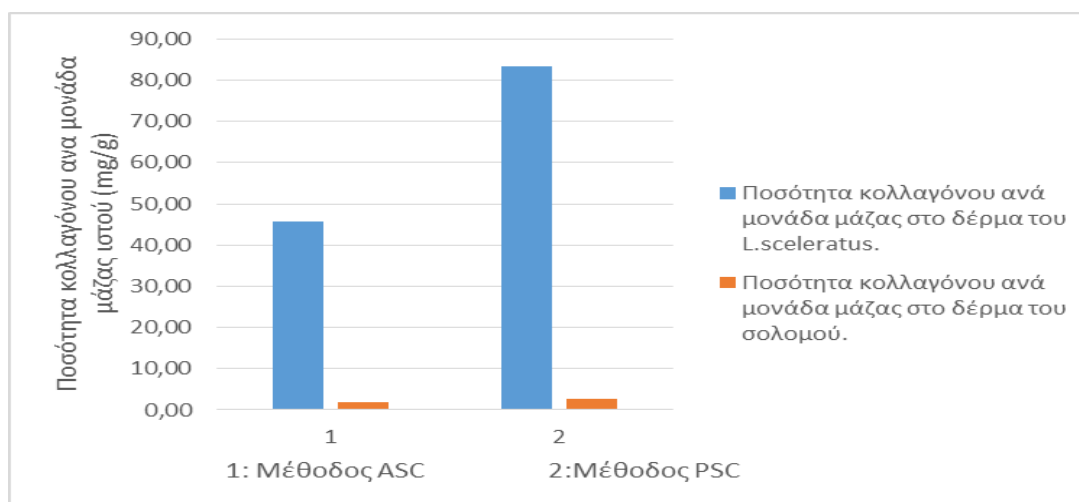
Με βάση την εξίσωση της καμπύλης αναφορά του κολλαγόνου και λαμβάνοντας υπόψιν τις αραιώσεις υπολογίζεται η αρχική ποσότητα κολλαγόνου στο κάθε δείγμα.

Πίνακας 18: Προσδιορισμός της ποσότητας του κολλαγόνου στα εξεταζόμενα δείγματα.

Δείγμα	Συγκέντρωση (mg/mL)	Μάζα δείγματος (g)	Όγκος διαλύτη εκχύλισης (mL)	Ποσότητα κολλαγόνου (mg)	Ποσότητα κολλαγόνου ανά μάζα ιστού (mg/g)
A	9.16	5.1792	25.9	237.14	45.79
B	16.68	5.7430	28.7	478.78	83.37
Γ	0.380	4.7575	23.8	9.05	1.90
Δ	0.520	5.0429	25.2	13.10	2.60
E	11.49	6.0976	30.5	350.50	57.48
ΣΤ	8.29	7.2035	36	298.55	41.45

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα κυρίως της τελευταίας στήλης του Πίνακα 18 συμπεραίνεται ότι:

- Τα δείγματα Γ,Δ που αντιστοιχούν στο δέρμα του σολομού εμφανίζονται να έχουν πολύ μικρότερη ποσότητα κολλαγόνου συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα Α,Β του *L.scleratus*.



Διάγραμμα 8: Σύγκριση ποσότητας κολλαγόνου ανά μονάδα μάζας ιστού για τα δύο είδη ψαριών, *L.scleratus*-σολομό.

- Από την σύγκριση των δύο μεθόδων (ASC-PSC), διαπιστώνουμε ότι η μέθοδος PSC υπερτερεί της μεθόδου ASC, το συμπέρασμα αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό συγκρίνοντας τα Δείγματα Α και Β μεταξύ τους, όπου με τη μέθοδο PSC εκχυλίστηκε 45% μεγαλύτερη ποσότητα κολλαγόνου σε σχέση με την ASC. Όμοιο συμπέρασμα προκύπτει και από την σύγκριση των Δειγμάτων Γ και Δ, που σε αυτή τη περίπτωση εκχυλίστηκε 27% μεγαλύτερη ποσότητα. Το συμπέρασμα αυτό αποτυπώνεται και στο Διάγραμμα 8.

- Όσον αφορά στα δείγματα από τα κόκκαλα των ψαριών, η ποσότητα κολλαγόνου στον *L. sceleratus* (Δείγμα Ε) φαίνεται να είναι υψηλότερη από ότι στο σολομό (Δείγμα ΣΤ). Ωστόσο, η απόκλιση των δειγμάτων είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με αυτήν που προέκυπτε από τη σύγκριση του περιεχόμενου κολλαγόνου στο δέρμα των δύο ειδών ψαριών.
- Από τη σύγκριση των Δειγμάτων Β και Ε εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο *L. Sceleratus* έχει μεγαλύτερη ποσότητα κολλαγόνου στο δέρμα σε σχέση με τα κόκκαλα. Ενώ από τα Δείγματα Δ και ΣΤ προκύπτει ότι ο σολομός έχει πολύ μεγαλύτερη ποσότητα κολλαγόνου στα κόκκαλα από ότι στο δέρμα.

4.4 Χαρακτηρισμός τελικών προϊόντων εγκλεισμού.

Αφού πραγματοποιήθηκε η επιτυχής παραλαβή των βιοδραστικών ουσιών από τον *L. Sceleratus*, επόμενο βήμα ήταν η εφαρμογή των ουσιών αυτών σε προϊόντα κοσμετολογίας. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε κολλαγόνο και ωμέγα-3 λιπαρά οξέα ψαριών ανάλογων με αυτών που απομονώθηκαν από τον *L. Sceleratus*, προκειμένου να μελετηθεί η συμπεριφορά τους κατά την ενσωμάτωσή τους σε κρέμες.

Αρχικά, προκειμένου να καλυφθεί η δυσάρεστη οσμή των δραστικών αυτών ουσιών, αλλά και για να αυξηθεί η σταθερότητα τους, προστατεύοντας τις ουσίες αυτές από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, κρίθηκε σκόπιμος ο εγκλεισμός τους σε μήτρα κυκλοδεξτρίνης με τη μέθοδο της ηλεκτροστατικής ινοποίησης (electrospinning) [43].

4.4.1 Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού

Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού Κολλαγόνου

Για να πραγματοποιηθεί αυτή η μέτρηση 0,32g νανοϊνών διαλύονται σε διάλυμα οξικού οξέος 0.05M τελικού όγκου 30mL.

Με βάση την καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 7) για απορρόφηση 0,875 (ABS) υπολογίζεται η συγκέντρωση των 0.32g νανοϊνών σε κολλαγόνο ίση με 15,62 mg.

Πίνακας 19: Ποσότητα κολλαγόνου των παραγόμενων στο electrospinning νανοϊνών.

Δείγμα	Απορρόφηση (ABS)	Συγκέντρωση (mg/mL)	Μάζα (mg)
Δείγμα προσδιορισμού ποσότητας κολλαγόνου παραγόμενων νανοϊνών	0.875	0.550	15.62

Δεδομένου ότι η ροή λειτουργίας ήταν ρυθμισμένη στα 1000 $\mu\text{L}/\text{h}$, αναμένεται σε μια ώρα να έχει περάσει 1mL διαλύματος (περιεκτικότητας 7% σε ωμέγα-3 λιπαρά οξέα και 3% σε κολλαγόνο), το οποίο παράγει ποσότητα νανοϊνών 0,55g. Συνεπώς, στα 0,32g νανοϊνών αναμένεται θεωρητικά να υπάρχουν 17.55mg κολλαγόνο.

Οπότε η απόκλιση της πραγματικής από τη θεωρητική τιμή είναι:

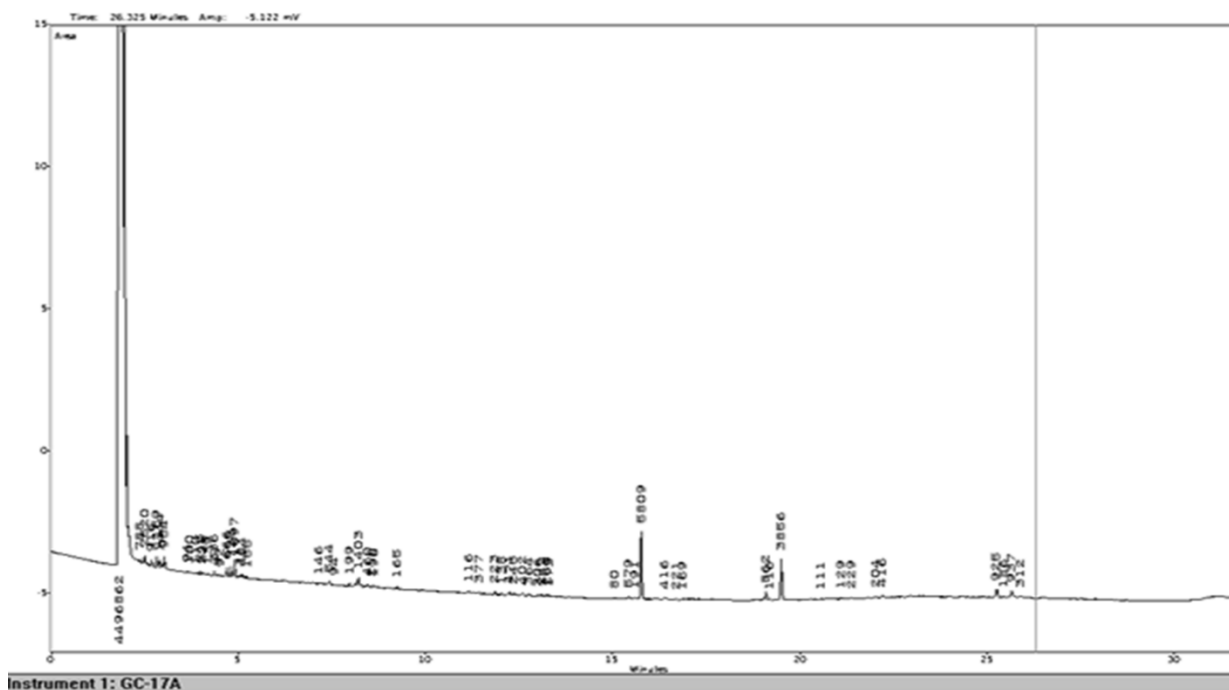
$$\text{Απόδοση εγκλεισμού (\%)} = \frac{\text{Ποσότητα εγκλεισμένου κολλαγόνου}}{\text{Θεωρητική ποσότητα κολλαγόνου}} \% = 89\%$$

Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού ωμέγα-3 λιπαρών οξέων

Προκειμένου να αξιολογηθεί η απόδοση του εγκλεισμού 0,3g νανοϊνών ξεπλύθηκαν με εξάνιο έτσι ώστε να συμπαρασυρθούν τα λιπαρά οξέα που δεν είχαν διαλυθεί. Και έπειτα από το σχηματισμό μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAMES) τα δείγματα εξετάστηκαν σε GC-MS. Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης:

Πίνακας 20: Αποτελέσματα GC-MS για τον υπολογισμό της απόδοσης εγκλεισμού των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων.

Λιπαρά οξέα	Χρόνος έκλουσης, t (min)	Εμβαδό	Συγκέντρωση (μg/mL)	Μάζα (μg)
C14:0	-	-	-	-
C16:0	15.807	6809	28.60	171.59
C18:0	19.540	3856	18.12	108.74
C18:1	19.134	772	2.24	13.43
C22:6	25.707	937	4.97	29.80
Συνολικά PUFAs				323.56



Διάγραμμα 9: Αποτελέσματα GC-MS για τη μέτρηση της απόδοσης εγκλεισμού των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων.

Δεδομένου ότι η ροή λειτουργίας ήταν ρυθμισμένη στα 1000 $\mu\text{L}/\text{h}$, αναμένεται σε μια ώρα να έχει περάσει 1mL διαλύματος (περιεκτικότητας 7% σε ωμέγα-3 λιπαρά οξέα και 3% σε κολλαγόνο), το οποίο παράγει ποσότητα ναοινίων 0,55g. Συνεπώς, στα 0,3g ναοινίων αναμένεται θεωρητικά να υπάρχουν 38mg ωμέγα-3 λιπαρών οξέων (εγκλεισμένα και μη). Έτσι, η ποσότητα των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων στην επιφάνεια συλλογής ίση με 35,7mg. Οπότε, ακολούθως υπολογίζεται η απόδοση του εγκλεισμού:

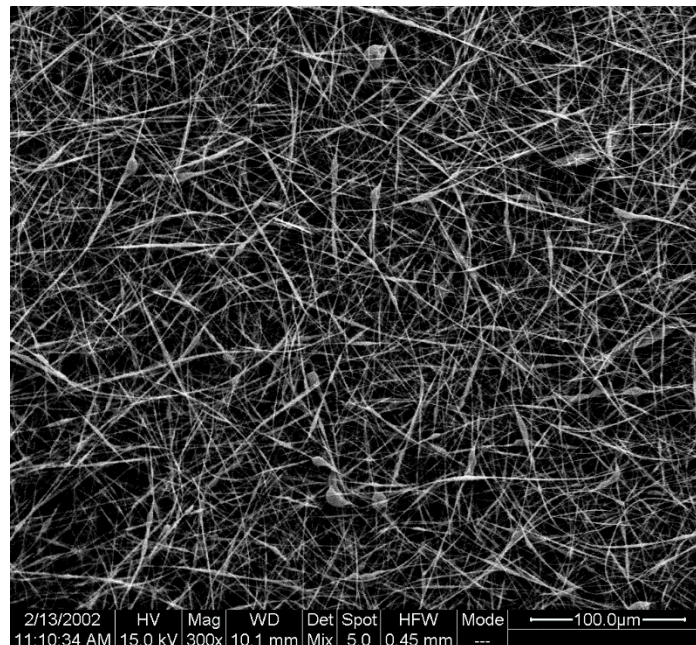
$$\text{Απόδοση εγκλεισμού} = \frac{\text{Ποσότητα εγκλεισμένων } \omega - 3}{\text{Συνολική ποσότητα } \omega - 3} = 91\%$$

Η απόδοση εγκλεισμού των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων είναι πολύ υψηλή. Το γεγονός αυτό εξηγείται από την εσωτερική υδροφοβική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, η οποία επιτρέπει το σχηματισμό συμπλόκων εγκλεισμού με υδροφοβικές ενώσεις, όπως είναι τα λιπαρά οξέα [27].

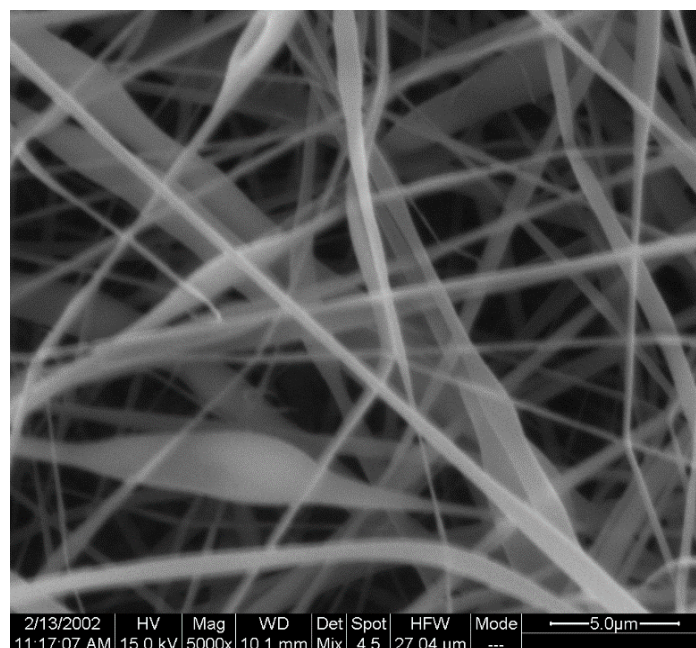
4.4.2 Υπόλοιπες τεχνικές (SEM, ATR-FTIR)

4.4.2.1 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscopy-SEM)

Προκειμένου να αξιολογηθεί η δομή των παραγόμενων νανοϊνών, εξετάστηκαν στο SEM δείγματα που είχαν προκύψει από τη διάλυση των διαφορετικών ποσοτήτων βιοδραστικών ουσιών στο διάλυμα της κυκλοδεξτρίνης σε διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας του electrospinning. Με βάση την απεικόνιση των διαφορετικών δειγμάτων κρίθηκε ως βέλτιστη η λειτουργία του οργάνου σε ροή=1000μL/h, τάση=27kV και απόσταση ακροφυσίου από επιφάνεια συλλογής= 13cm, για διάλυμα κυκλοδεξτρίνης με 7% σε ω-3 λιπαρά οξέα και 3% κολλαγόνο. Οι νανοΐνες που προέκυψαν από τις βέλτιστες συνθήκες παρουσιάζονται ακολούθως.



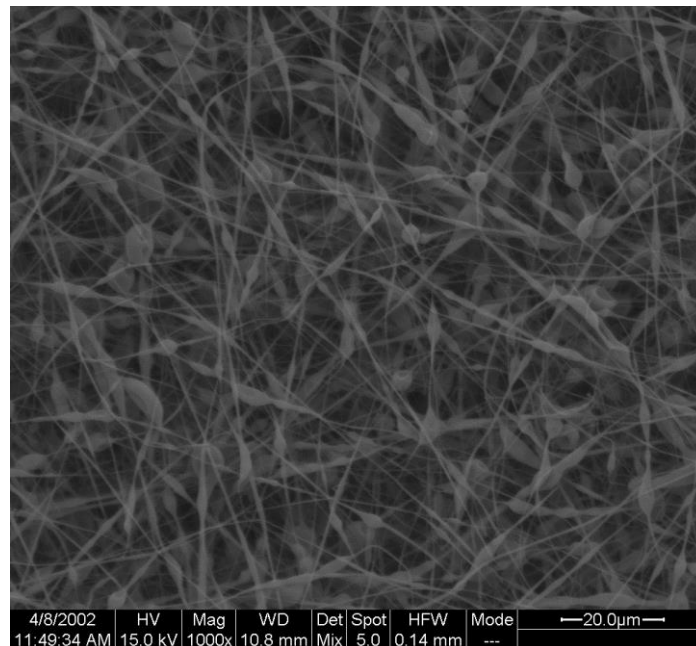
Εικόνα 49: Απεικόνιση από ανάλυση SEM για νανοΐνες κυκλοδεξτρίνης με 7% ω-3 λιπαρά οξέα και 3% κολλαγόνο, με επιβαλλόμενη τάση 27kV, ροή 1000μL/h και απόσταση ακροφυσίου-επιφάνειας συλλογής=13cm (x300).



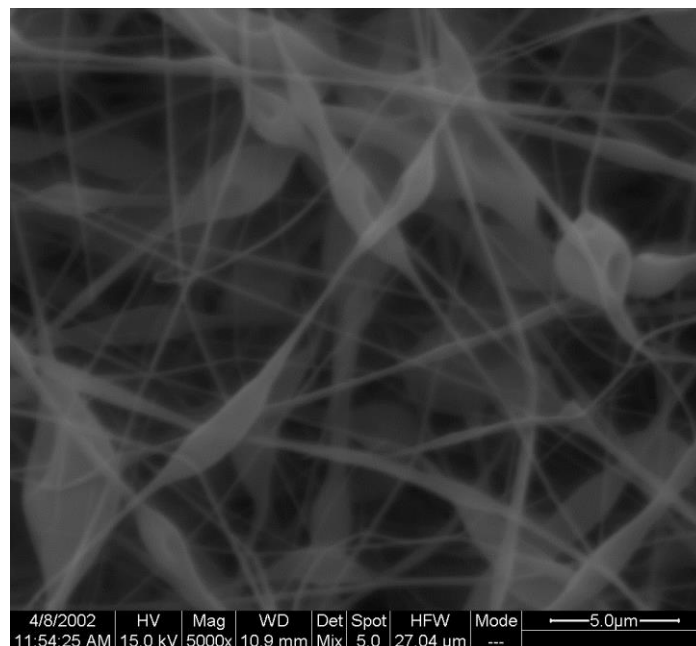
Εικόνα 50: Απεικόνιση από ανάλυση SEM για νανοΐνες κυκλοδεξτρίνης με 7% ω-3 λιπαρά οξέα και 3% κολλαγόνο, με επιβαλλόμενη τάση 27kV, ροή 1000μL/h και απόσταση ακροφυσίου-επιφάνειας συλλογής=13cm (x5000).

Συμπεραίνουμε, ότι στις συνθήκες αυτές παράγονται νανοΐνες με μέση διάμετρο 150nm. Στις υπόλοιπες συνθήκες, εκτός από την αστάθεια ροής και τον μη ιδανικό σχηματισμό του κώνου Taylor, η διαμόρφωση του τελικού προϊόντος ήταν ένα συνδυασμός ινών και σωματιδίων.

Στην απεικόνιση νανοΐνων που παράχθηκαν με διάλυμα σκέτης κυκλοδεξτρίνης στις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του electrospinning, φαίνεται ότι το παραγόμενο προϊόν ήταν συνδυασμός ινών και σωματιδίων, το γεγονός αυτό δικαιολογείται από την περιεκτικότητα του υδατικού διαλύματος σε κυκλοδεξτρίνης (60%). Όταν το διάλυμα κυκλοδεξτρίνης είναι πολύ αραιό τότε δημιουργούνται μικρο- ή νανο- σφαιρίδια αντί για μικρο- ή νανο- ίνες λόγω του χαμηλού ιξώδους και της υψηλής επιφανειακής τάση του διαλύματος [43].



Εικόνα 51: Απεικόνιση από ανάλυση SEM για τελικό προϊόν διαλύματος κυκλοδεξτρίνης 60% (x1000).

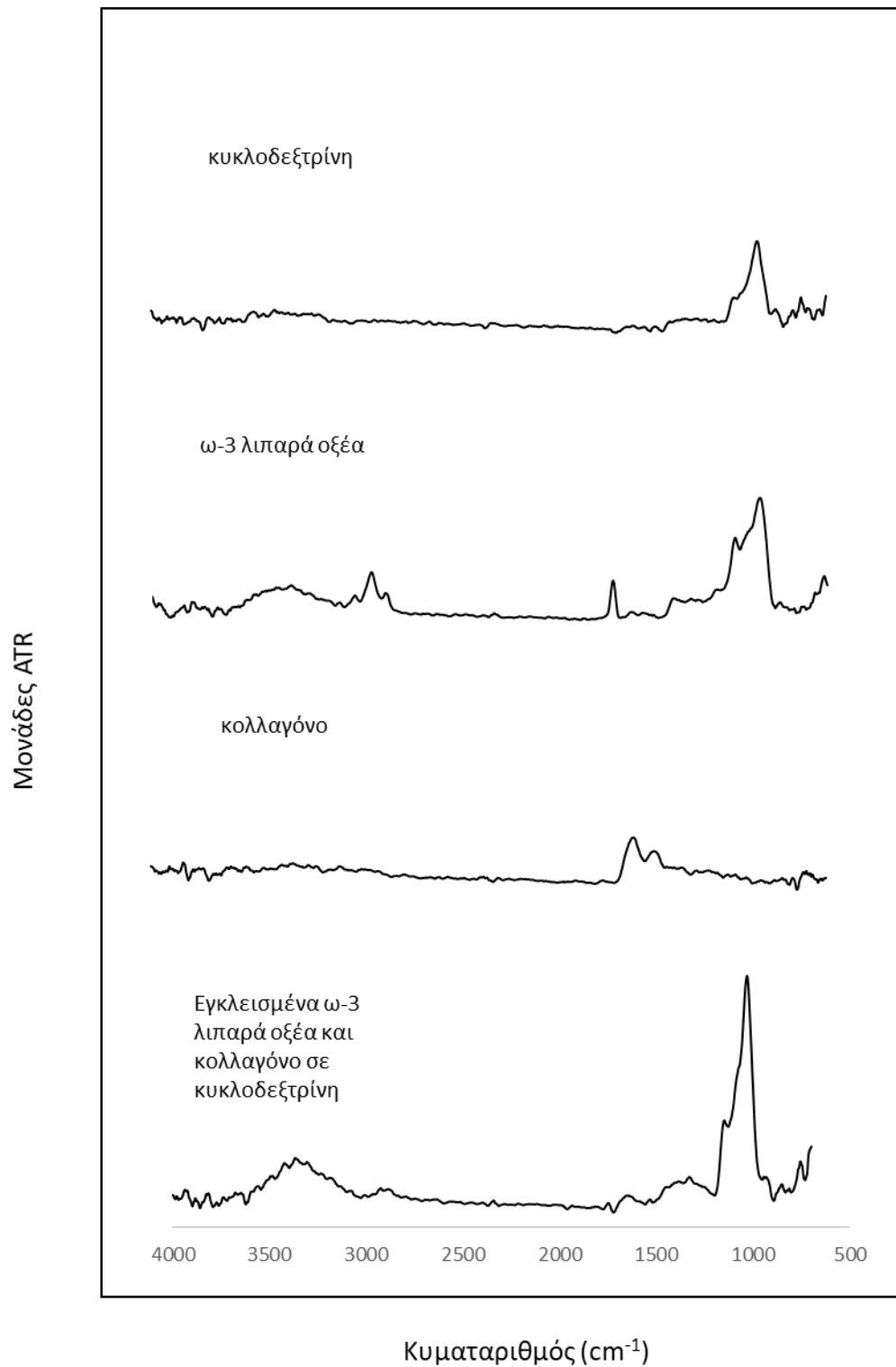


Εικόνα 52: Απεικόνιση από ανάλυση SEM για τελικό προϊόν διαλύματος κυκλοδεξτρίνης 60% (x5000).

Συμπερασματικά, η εισαγωγή των ωμέγα-3 και του κολλαγόνου στο διάλυμα κυκλοδεξτρίνης είχε ως αποτέλεσμα τον αποκλειστικό σχηματισμό νανοϊνών, ενώ το σκέτο διάλυμα κυκλοδεξτρίνης

παρήγαγε ίνες και σωματίδια. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανώς στην αύξηση του ιξώδους λόγω της παρουσία του κολλαγόνου και στην αλλαγή των ηλεκτρικών ιδιοτήτων του διαλύματος.

4.4.2.2. Φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy- FTIR)



Διάγραμμα 10: Φασματογράφημα ATR-FTIR για την ταυτοποίηση του εγκλεισμού των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου σε διάλυμα κυκλοδεξτρίνης μέσω της ηλεκτροστατικής ινοποίησης.

Η χαρακτηριστικές κορυφές των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων εντοπίζονται στα 1000 cm⁻¹ και στα 3500 cm⁻¹, η κορυφή της κυκλοδεξτρίνης εντοπίζεται στα 1000 cm⁻¹ συνεπώς συμπίπτει με μια από τις κορυφές των ω-3, στο διάγραμμα των εγκλεισμένων ω-3 λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου σε κυκλοδεξτρίνη βλέπουμε ότι η κορυφή στα 1000 cm⁻¹ παρουσιάζεται ιδιαίτερα ενισχυμένη ενώ παρουσιάζεται και κορυφή στα 3500 που φανερώνει τον επιτυχημένο εγκλεισμό των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων.

Όμοια το κολλαγόνο παρουσιάζει κορυφή στα 1500 cm⁻¹, κορυφή που δεν υπάρχει στο διάγραμμα της σκέτης κυκλοδεξτρίνης, και εμφανίζεται στο διάγραμμα των εγκλεισμένων ω-3 λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου σε κυκλοδεξτρίνη, γεγονός που επιβεβαιώνει τον εγκλεισμό του κολλαγόνου.

4.5 Χαρακτηρισμός καλλυντικών κρεμών

4.5.1 Μικροβιολογική ανάλυση κρεμών

Μετά την ανάπτυξη των κρεμών ενσωματώνοντας τα εγκλεισμένα προϊόντα, έτσι ώστε η περιεκτικότητα των κρεμών σε βιοδραστικές ουσίες να είναι 1%, οι κρέμες αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες 5°C, 25°C και 45°C. Στα δείγματα αυτά, λοιπόν, πραγματοποιείται μικροβιακή ανάλυση σε χρόνους t=0, t=30 days και t=50days στις διάφορες θερμοκρασίες.

Τα αποτελέσματα τις μικροβιακής ανάλυσης παρουσιάζονται ακολούθως:

✓ t=0

Στον χρόνο t=0 κανένα από τα δείγματα C, NE, E δεν παρουσιάζει αποικίες, συνεπώς τα δείγματα δεν έχουν μικροβιακό φορτίο.

✓ t=30 days

Πίνακας 21: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης κρεμών αποθηκευμένων στους 5°C, στους 25°C και στους 45°C για διάστημα t=30days.

Θερμοκρασία T (°C)	Δείγμα	Ολικό μικροβιακό φορτίο	Ζύμες/ Μούχλες	E.coli
5 °C	C	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
	NE	<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
	NE	<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
	NE	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
	E	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g

✓ t=50 days

Πίνακας 22: Αποτελέσματα μικροβιολογικής ανάλυσης κρεμών αποθηκευμένων στους 5°C, στους 25°C και στους 45°C για διάστημα t=50days.

Θερμοκρασία T (°C)	Δείγμα	Ολικό μικροβιακό φορτίο	Ζύμες/ Μούχλες	E.coli
5 °C	C	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
	NE	<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
	NE	<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
	NE	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g
	E	<2 log cfu/g	<1 log cfu/g	Absence/ g

Παρατηρώντας τους παραπάνω πίνακες (Πίνακας 21 και Πίνακας 22) συμπεραίνουμε ότι το μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων παρέμεινε μικροβιολογικά σταθερό τόσο στους διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης όσο και στις διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης. Επιπλέον, γίνεται φανερό ότι η προσθήκη των ναοϊνών δεν επηρέασε το μικροβιακό φορτίο των κρεμών.

Σύμφωνα με τα πρότυπα ασφαλείας, συνθηκών υγιεινής και ποιότητας των καλλυντικών προϊόντων τα προϊόντα που προορίζονται για μωρά ή για την περιοχή των ματιών πρέπει να περιέχουν λιγότερα από 100 cfu/g ή mL προϊόντος, όλα τα υπόλοιπα προϊόντα πρέπει να περιέχουν λιγότερο από 1000 cfu/g ή mL προϊόντος, ενώ μικρόβια που είναι παθογόνα όπως το *Esherochia coli* δεν πρέπει να περιέχονται καθόλου στο προϊόν. Συνεπώς, και τα τρία δείγματα συνάδουν με τα πρότυπα ασφαλείας και συνθηκών υγιεινής και ποιότητας των καλλυντικών προϊόντων κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση τους [44].

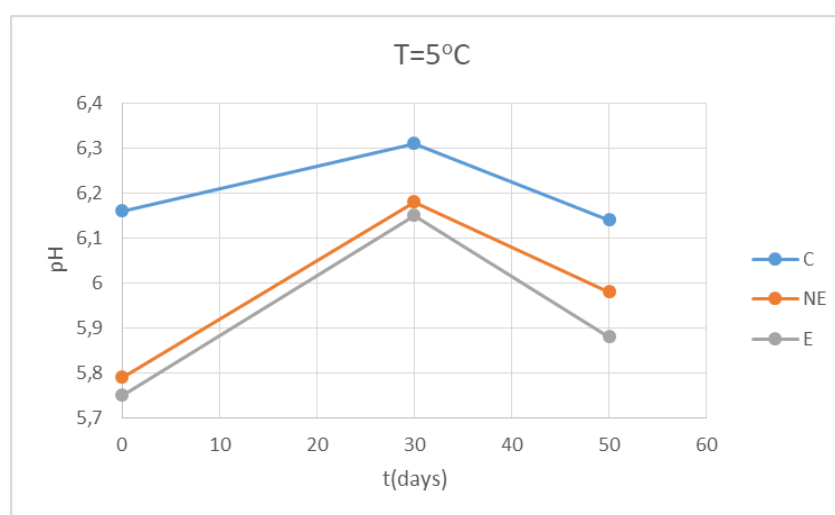
4.5.2 Μέτρηση pH

Οι μετρήσεις του pH που πραγματοποιήθηκαν στις κρέμες στους χρόνους t=0, t=30days και t=50days στις θερμοκρασίες 5°C, 25°C και 45°C παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

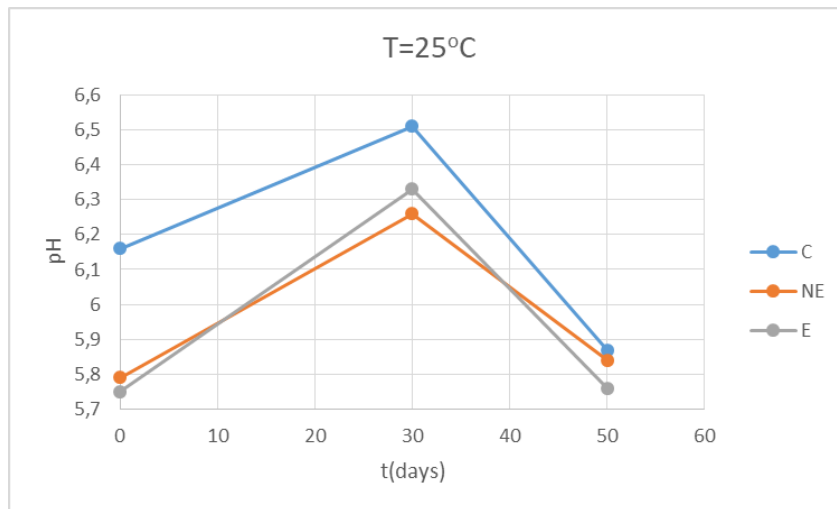
Πίνακας 23: Μετρήσεις pH σε χρόνους t=0, t=30days και t=50days και θερμοκρασίες 5°C, 25°C και 45°C.

Θερμοκρασία T (°C)	Δείγμα	pH (t=0)	pH (t=30days)	pH (t=50days)
5°C	C	6.16	6.31	6.14
	NE	5.79	6.18	5.98
	E	5.75	6.15	5.88
25°C	C	6.16	6.51	5.87
	NE	5.79	6.26	5.84
	E	5.75	6.33	5.76
45°C	C	6.16	6.14	5.75
	NE	5.79	5.85	5.60
	E	5.75	6.11	5.66

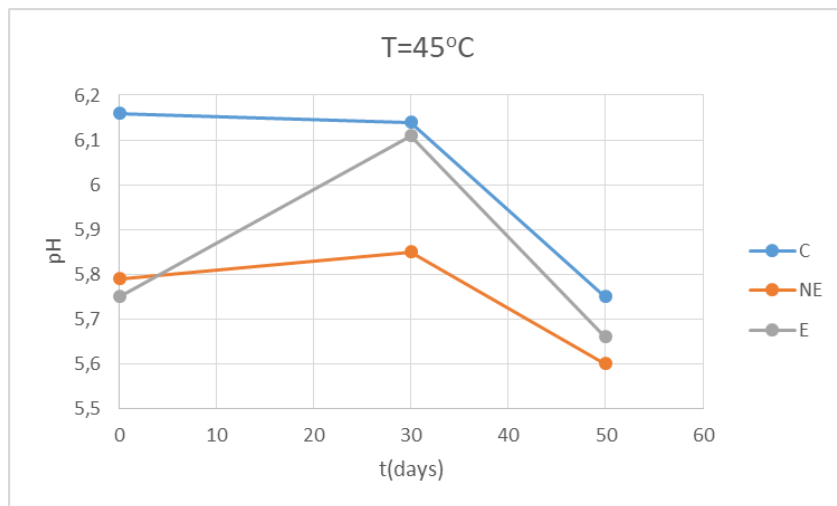
Με βάση τα δεδομένα του Πίνακας 23 κατασκευάζονται τα παρακάτω διαγράμματα pH-χρόνου (t).



Διάγραμμα 11: pH των τριών δειγμάτων C, NE, E συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης στους 5°C.



Διάγραμμα 12: pH των τριών δειγμάτων C, NE, E συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης στους 25°C.



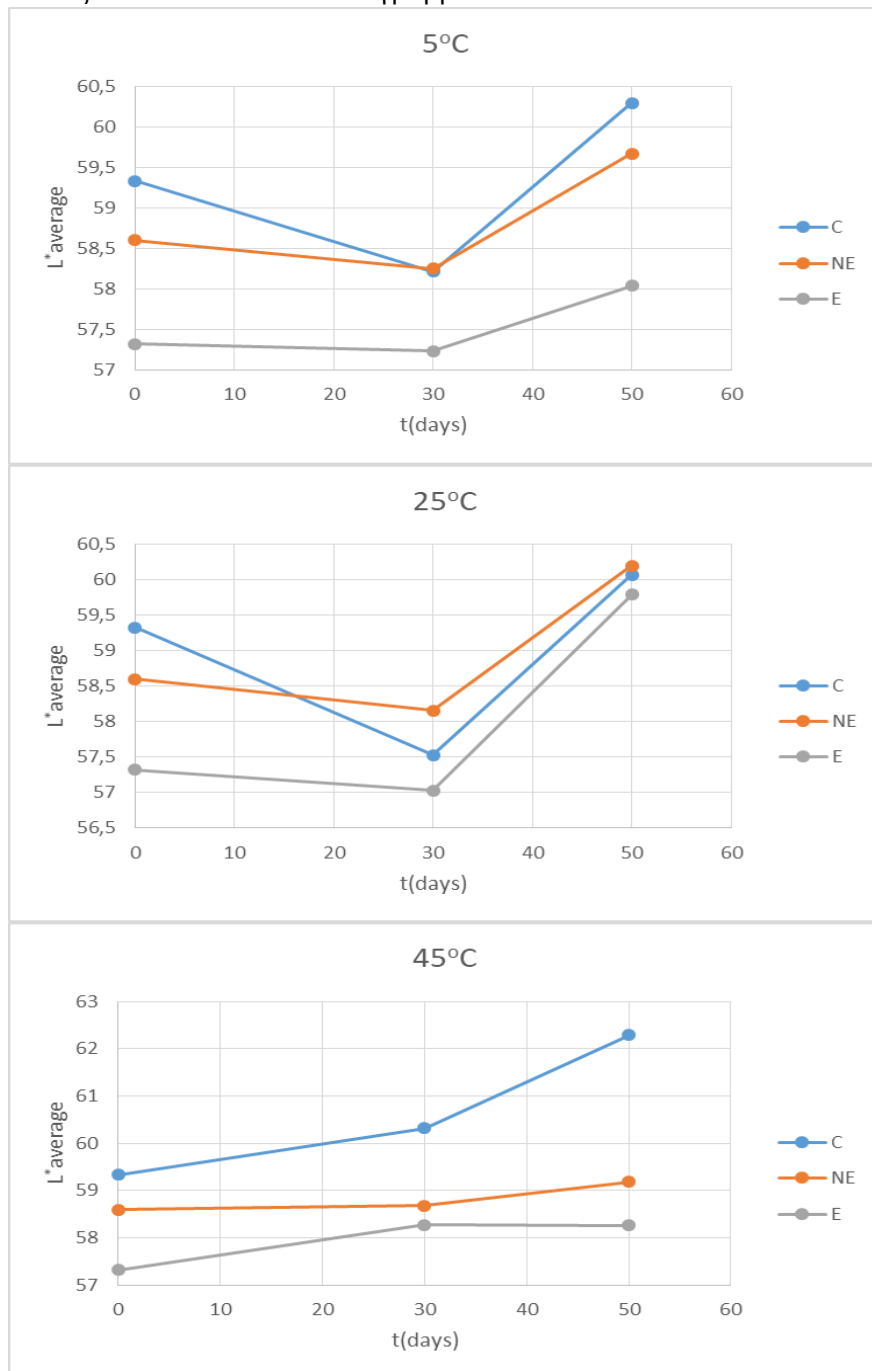
Διάγραμμα 13: pH των τριών δειγμάτων C, NE, E συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης στους 45°C.

Το pH των καλλυντικών προϊόντων αποτελεί σημαντική παράμετρο της αποτελεσματικότητάς τους. Η επιδερμίδα παρουσιάζει όξινες τιμές pH, οι οποίες, παράλληλα με τη κλιμάκωση του pH μέχρι την κεράτινη στοιβάδα, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση υγιούς δέρματος. Χάρη στην ύπαρξη κατάλληλου pH στην επιδερμίδα ρυθμίζεται η σύσταση της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του δέρματος και υποστηρίζονται σημαντικές διεργασίες όπως ο σχηματισμός της βέλτιστης δομής του λιπώδους φραγμού του δέρματος. Η τιμή pH στο δέρμα κυμαίνεται από 5,4 έως 5,9 που αναφέρεται ως το ουδέτερο pH δέρματος. Η τιμή του pH, ωστόσο, μεταβάλλεται με την ηλικία (σε μικρές και μεγάλες ηλικίες οι τιμές του pH είναι υψηλότερες), με το φύλο (η αντρική επιδερμίδα έχει συνήθως χαμηλότερο pH), με τη φυλή (η μαύρη φυλή παρουσιάζει πιο όξινο pH από τη λευκή) και με τον μεταβολικό ρυθμό (π.χ. χαμηλότερες τιμές pH κατά τις νυχτερινές ώρες και κατά την καλοκαιρινή περίοδο). Συνεπώς, οι καλλυντικές κρέμες είναι επιθυμητό να έχουν ουδέτερο pH ανάλογο με αυτό του δέρματος [45].

Παρατηρούμε ότι όλες οι τιμές pH των δειγμάτων που αναλύθηκαν κυμαίνονται από 5,75 έως 6,51, τιμές οι οποίες δεν απέχουν πολύ από το φυσιολογικό εύρος pH του δέρματος. Επιπλέον, και για τα τρία δείγματα C, NE, E βλέπουμε ότι σε όλες τις θερμοκρασίες υπήρχε σταδιακή αύξηση του pH από το χρόνο $t=0$ έως το χρόνο $t=30$ days, ενώ από το χρόνο $t=30$ days έως το χρόνο $t=50$ days σημειώθηκε ελάττωση του pH.

4.5.3 Μέτρηση χρώματος

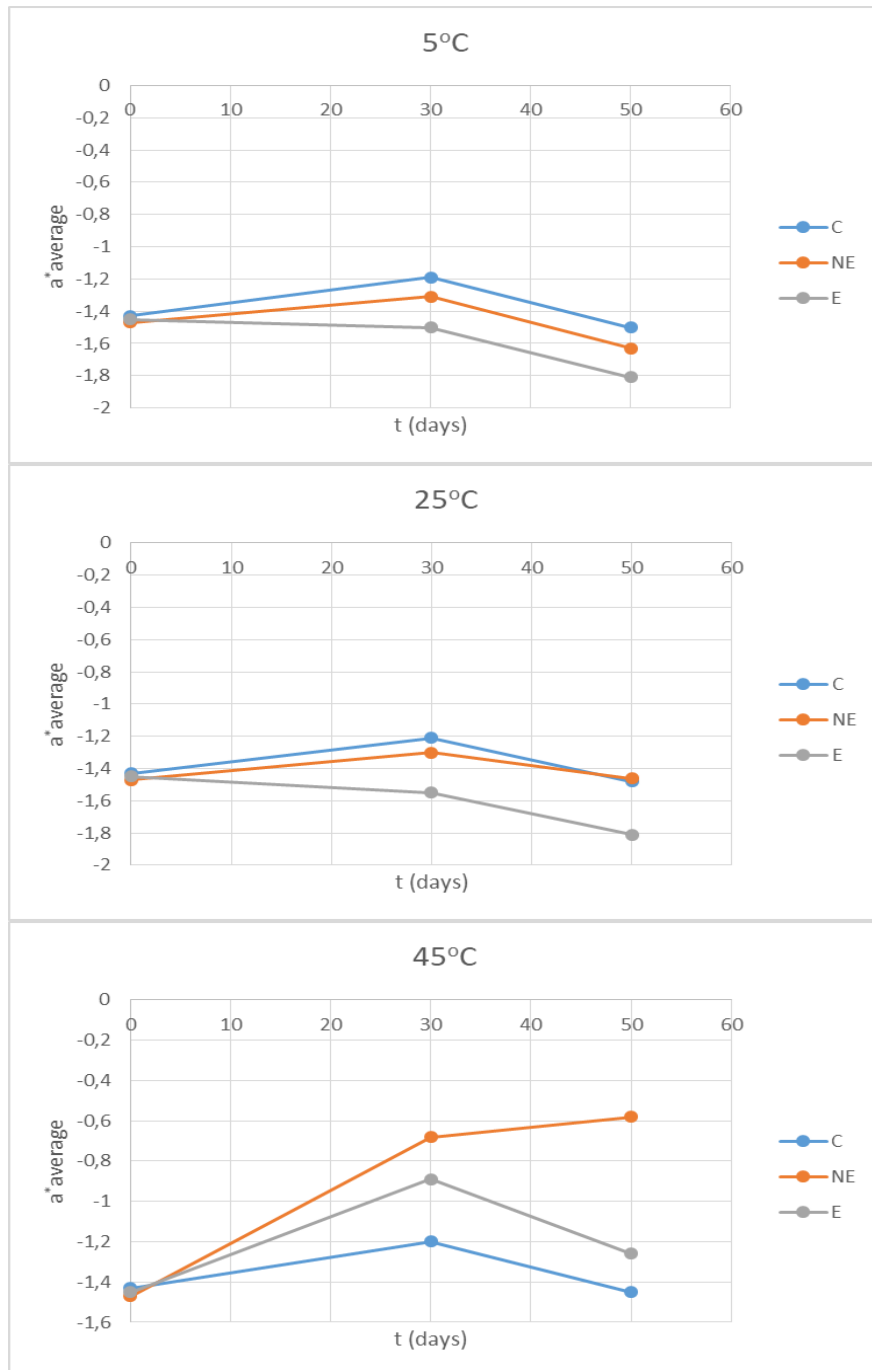
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του χρώματος L^* (φωτεινότητα), a^* (μεταβολή κόκκινου-πράσινου χρώματος), b^* (μεταβολή μπλε-κίτρινου χρώματος) και ΔE (συνολική μεταβολή χρώματος) στα δείγματα C, NE, E στις διάφορες θερμοκρασίες (5°C, 25°C, 45 °C) για τους χρόνους $t=30$ days και $t=50$ days παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα.



Διάγραμμα 14: Μεταβολή της παραμέτρου L^* σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5°C, 25°C και 45°C.

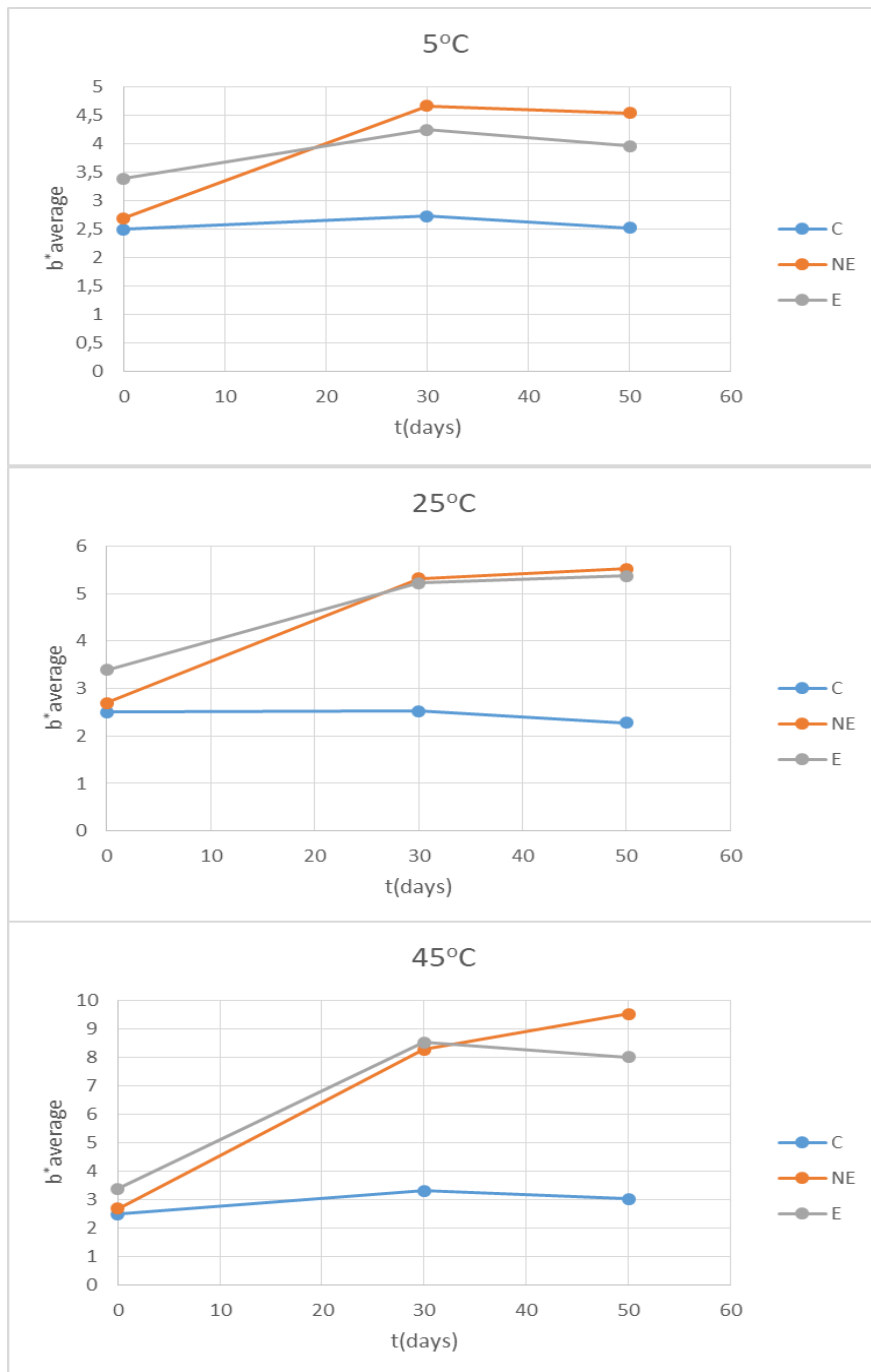
Όσον αφορά στον παράγοντα L^* , που εκφράζει τη φωτεινότητα του δείγματος, φαίνεται ότι στις θερμοκρασίες 5°C και 25°C η κρέμα με τα εγκλεισμένα προϊόντα (E) διατηρεί περίπου σταθερή τη φωτεινότητα τις πρώτες 30 ημέρες, ενώ μετά το πέρασμα των 30 ημερών παρατηρείται να μεταβάλλεται αρκετά η φωτεινότητα της. Ανάλογα είναι τα αποτελέσματα και για την κρέμα με μη εγκλεισμένα προϊόντα (NE), ωστόσο παρατηρείται ότι η φωτεινότητα της είναι σε κάθε χρονική στιγμή μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της E. Αντιθέτως, στις ίδιες θερμοκρασίες η κρέμα βάση (C)

μειώνει τη φωτεινότητα της τις πρώτες 30 μέρες, ενώ μετέπειτα η φωτεινότητα αυξάνεται. Στους 45°C η φωτεινότητα της κρέμας C αυξάνεται διαρκώς με το πέρασμα του χρόνου, ενώ στο δείγμα NE διατηρείται σταθερή και στο δείγμα E παρουσιάζει μικρή αύξηση τις πρώτες 30 μέρες και έπειτα παραμένει σταθερή. Γενικά, στο διάστημα των 50 ημερών πιο φωτεινή παρέμενε η κρέμα βάσης, ακολούθως η κρέμα με τα μη εγκλεισμένα συστατικά και τέλος η κρέμα με τα εγκλεισμένα προϊόντα.



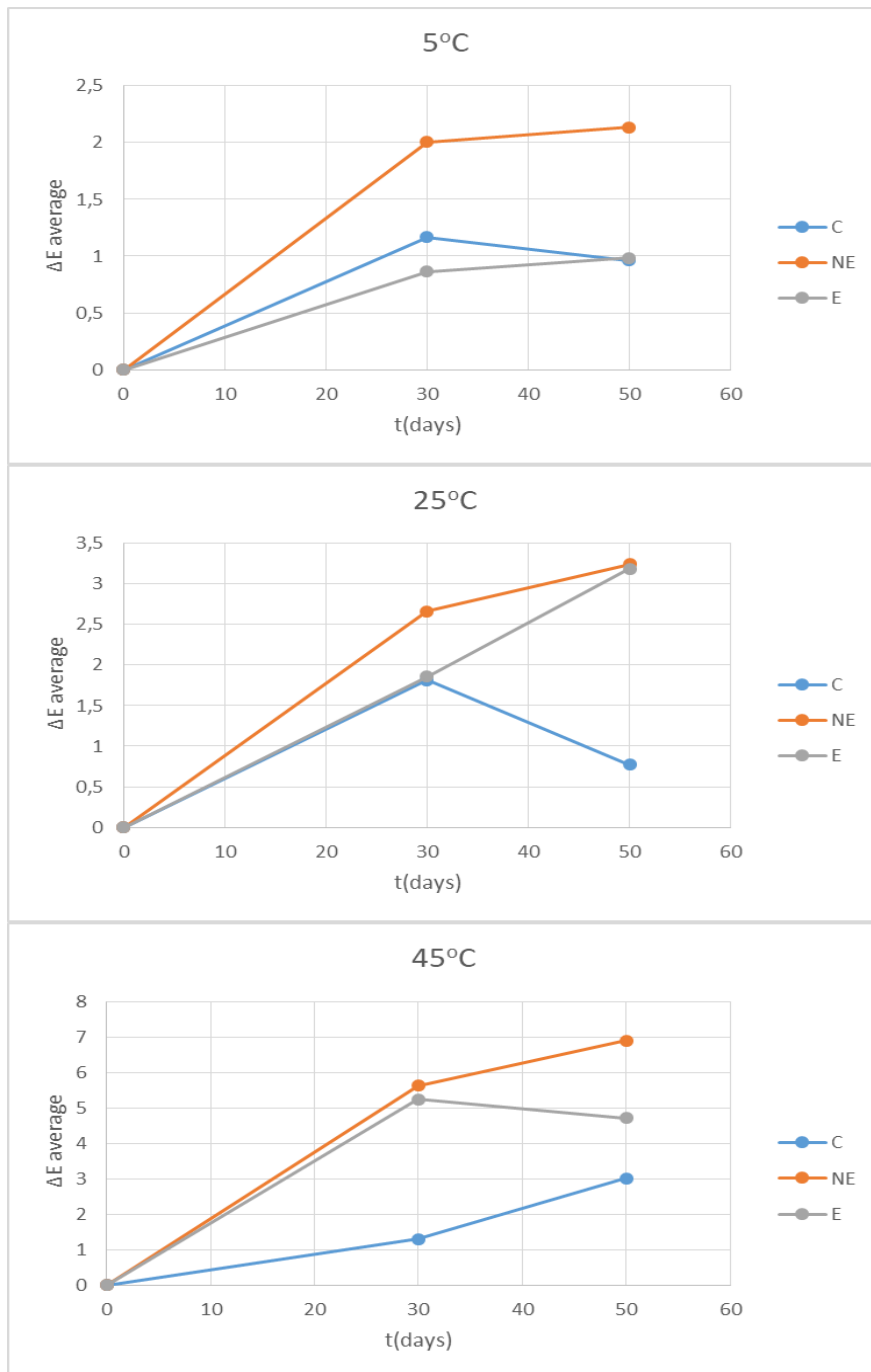
Διάγραμμα 15: Μεταβολή της παραμέτρου a^* σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5°C, 25°C και 45°C.

Το a^* εκφράζει τις αποχρώσεις του κόκκινου και του πράσινου στο δείγμα. Παρατηρείται ότι το a^* παίρνει αρνητικές τιμές σε όλα τα δείγματα που αντιπροσωπεύουν τις αποχρώσεις του πράσινου. Στους 5°C και στους 25°C το πιο πράσινο χρώμα εμφανίζεται στην κρέμα με τα εγκλεισμένα προϊόντα, ενώ στους 45°C στην κρέμα βάσης.



Διάγραμμα 16: Μεταβολή της παραμέτρου b^* σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5°C, 25°C και 45°C.

Ο παράγοντας b^* εκφράζει τις αποχρώσεις του κίτρινου και του μπλε στο δείγμα. Από τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτει ότι όλα τα δείγματα παρουσιάζουν θετικές τιμές, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι κρέμες διέθεταν αποχρώσεις του κίτρινου. Οι μεγαλύτερες τιμές b^* για τα δείγματα NE, E παρουσιάζονται στους 45°C. Σε όλες τις θερμοκρασίες, τα δείγματα NE και E παρουσιάζουν παραπλήσιες τιμές b^* , οι οποίες διατηρούνται διαρκώς μεγαλύτερες από τις σταθερές ανεξαρτήτως θερμοκρασίας τιμές της κρέμας C.



Διάγραμμα 17: Συνολική μεταβολή χρώματος ΔE σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5°C, 25°C και 45°C.

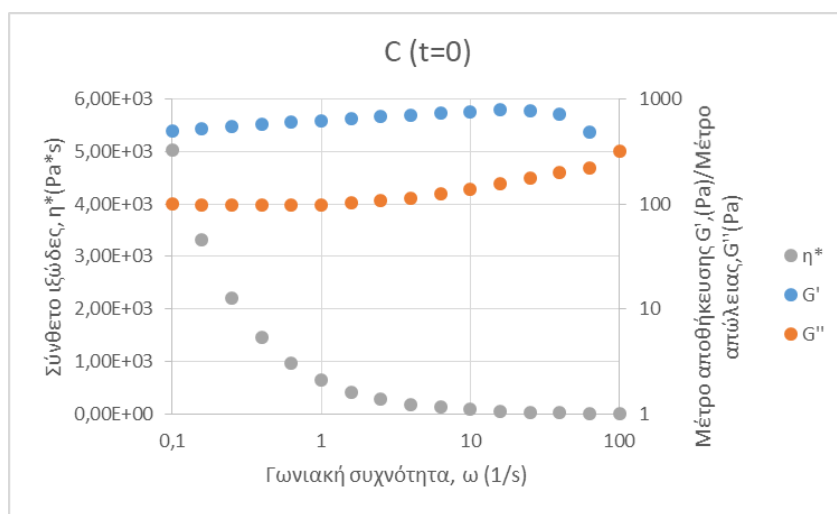
Από το Διάγραμμα 17 συμπεραίνεται ότι στις θερμοκρασίες των 5°C και 25°C η συνολική μεταβολή χρώματος της κρέμας με τα εγκλεισμένα προϊόντα (E) παρουσιάζει μικρή απόκλιση από τη κρέμα βάση (C), ενώ αντιθέτως η κρέμα με τις μη εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες εμφανίζει τη μεγαλύτερη μεταβολή χρώματος. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο εγκλεισμός έχει προστατέψει τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα και το κολλαγόνο από τις ανεπιθύμητες αλλοιώσεις του περιβάλλοντος στις θερμοκρασίες αυτές. Στους 45°C, ωστόσο, παρατηρείται ότι η συνολική αλλοίωση του χρώματος του δείγματος με το εγκλεισμένο προϊόν (E) σχεδόν ταυτίζεται με αυτή του δείγματος με το μη εγκλεισμένο προϊόν (NE), πιθανώς στη θερμοκρασία αυτή η μήτρα του εγκλεισμένου προϊόντος (E) αποικοδομείται με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των βιοδραστικών ουσιών.

4.5.4 Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (Dynamic Mechanical Analysis-DMA)

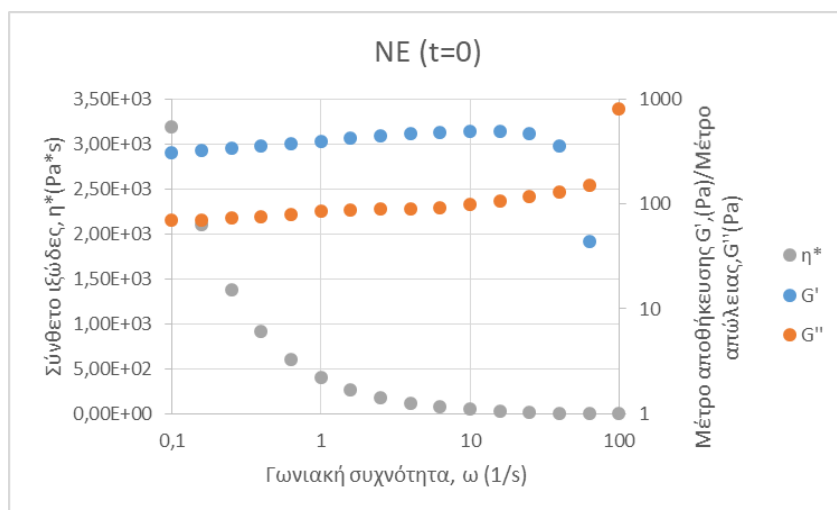
Με τη μέθοδο της Δυναμικής Μηχανικής Ανάλυσης αναλύθηκαν τα ρεολογικά και ιξωδοελαστικά χαρακτηριστικά, που σχετίζονται με τις εξής παραμέτρους:

- σύνθετο ιξώδες η^* (Pa·s)
- μέτρο αποθήκευσης G' (Pa)
- μέτρο απωλειών G'' (Pa)

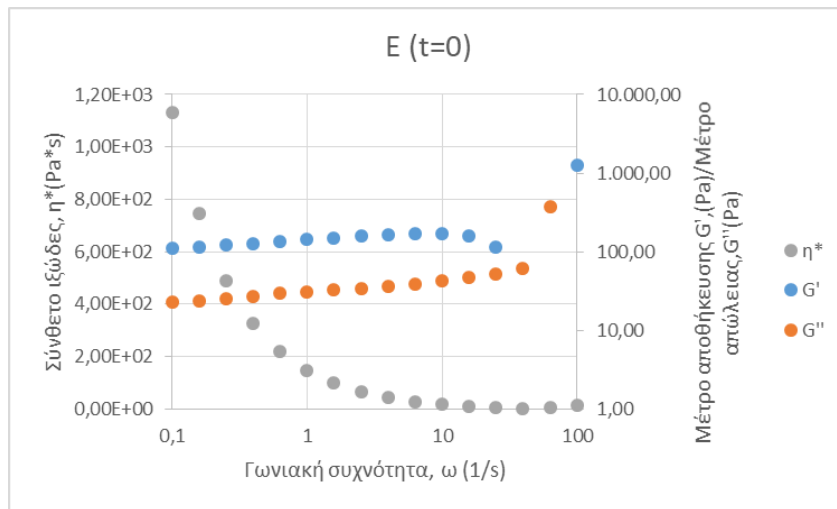
Από τις δοκιμές ταλάντωσης, κατά τις οποίες μεταβάλλεται η γωνιακή συχνότητα (ω), προκύπτουν αποτελέσματα που σχετίζονται με τη συμπεριφορά του στερεού και τις ιξωδοελαστικές ιδιότητες των κρεμών. Σε όλο το πεδίο τιμών της εφαρμοζόμενης συχνότητας, το μέτρο αποθήκευσης G' , πρέπει να παρουσιάζει τιμή μεγαλύτερη από αυτήν του μέτρου απώλειας G'' . Στα διαγράμματα που ακολουθούν (Διάγραμμα 18- Διάγραμμα 20), απεικονίζεται η συσχέτιση των παραμέτρων G' , G'' , η^* με τη γωνιακή συχνότητα (ω), σε σταθερή συχνότητα $\gamma=0.1\%$ για τα δείγματα κρεμών C, NE, E τη χρονική στιγμή $t=0$ days.



Διάγραμμα 18: Μέτρο αποθήκευσης (G'), Μέτρο απώλειας (G'') και σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της γωνιακής συχνότητας, για την κρέμα βάσης (C) τη χρονική στιγμή $t=0$.



Διάγραμμα 19: Μέτρο αποθήκευσης (G'), Μέτρο απώλειας (G'') και σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της γωνιακής συχνότητας, για την κρέμα με τις μη εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες (NE) τη χρονική στιγμή $t=0$.



Διάγραμμα 20: Μέτρο αποθήκευσης (G'), Μέτρο απώλειας (G'') και σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της γωνιακής συχνότητας, για την κρέμα με τις εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες (E) τη χρονική στιγμή $t=0$.

Τα γαλακτώματα παρουσιάζουν μέτρο αποθήκευσης μεγαλύτερο από το μέτρο απώλειας για όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας, δηλαδή υπάρχει συμπεριφορά γέλης και η δοκιμή γίνεται σε ιξωδοελαστική περιοχή. Από τα Διάγραμμα 18 Διάγραμμα 20 παρατηρείται ότι όλα τα δείγματα που αναλύονται παρουσιάζουν $G' > G''$. Επιπλέον, στο μεγαλύτερο εύρος γωνιακής συχνότητας, οι καμπύλες $G' - G''$ είναι σχεδόν παράλληλες. Ωστόσο σε μεγάλες τιμές της γωνιακής συχνότητα παρατηρείται αλλαγή της κλίσης.

Η καμπύλη του μέτρου αποθήκευσης είναι επιθυμητό να παρουσιάζει μια πολύ μικρή κλίση, όπως συμβαίνει και στα εξεταζόμενα δείγματα. Η τιμή του μέτρου αποθήκευσης G' σε χαμηλές τιμές γωνιακής συχνότητα ($\omega \leq 0,1 \text{ rad/s}$), είναι ενδεικτική της συμπεριφοράς των καλλυντικών κρεμών σε ηρεμία (G'_0). Γενικά, για τις περισσότερες διασπορές και τα γαλακτώματα, δεδομένου ότι ισχύει $G' > G''$, ισχύει ότι:

- Εάν $G' \geq 10 \text{ Pa}$, τότε το δείγμα παρουσιάζει σχετική συνεκτικότητα.
- Εάν $G' \leq 1 \text{ Pa}$, τότε το δείγμα δεν παρουσιάζει την κατάλληλη συνεκτικότητα για πρακτική εφαρμογή.
- Τέλος, εάν $1 \text{ Pa} < G' < 10 \text{ Pa}$, τότε απαιτούνται περισσότερες δοκιμές προκειμένου να αξιολογηθεί η συνεκτικότητα του δείγματος [46].

Τόσο η κρέμα βάση (C), όσο και οι κρέμες με τα μη εγκλεισμένα (NE) και τα εγκλεισμένα (E) προϊόντα παρουσιάζουν $G' > 10 \text{ Pa}$, οπότε και τα τρία δείγματα είναι κατάλληλα για πρακτική εφαρμογή δεδομένου ότι έχουν κατάλληλη συνεκτικότητα.

Η ρεολογία αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση της συμπεριφοράς μια κρέμας, κατά την εφαρμογή στο ανθρώπινο δέρμα. Όσο μικρότερη είναι η τάση που απαιτείται για να σπάσει η δομή, τόσο πιο εύκολη είναι η επάλειψη της κρέμας, αλλά και η απορρόφηση της από το δέρμα. Αντίθετα, όσο υψηλότερη είναι η επί της εκατό τάση, τόσο πιο συνεκτική είναι η κρέμα, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη μηχανική σταθερότητα. Η μεγάλη τάση είναι απαραίτητη για να προκύψει αποτελεσματική επαλειψιμότητα. Οι χαμηλές τιμές G' και G'' είναι ενδεικτικές της λείας υφής. Οι σκληρές κρέμες (υψηλές τιμές G' και G'') χρειάζονται λιγότερη δύναμη και απλώνονται πιο εύκολα στο δέρμα, ωστόσο έχουν πιο σκληρή υφή. Ενώ οι κρέμες σε μορφή γέλης παρουσιάζουν ευχάριστη υφή, σταθερή δομή και ικανοποιητική επάλειψη στο δέρμα [47].

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές του μέτρου αποθήκευσης και του μέτρου απώλειας (G'_0 και G''_0 αντίστοιχα) για γωνιακή συχνότητα $\omega=0.1 \text{ rad/s}$:

Πίνακας 24: Τιμές του Μέτρου Αποθήκευσης και του Μέτρου Απώλειας των δειγμάτων C, NE, E για γωνιακή συχνότητα $\omega=0.1\text{rad/s}$, σε χρόνους $t=0$, $t=30\text{days}$, $t=50\text{days}$ και θερμοκρασίες 5°C , 25°C , 45°C .

Δείγμα		Θερμοκρασία Αποθήκευσης T ($^\circ\text{C}$)	Χρόνος αποθήκευσης t (days)	Μέτρο αποθήκευσης G_0' (Pa)	Μέτρο απώλειας G_0'' (Pa)
C	C_0		0	4.93E+02	9.98E+01
	C30_5 $^\circ\text{C}$	5	30	5.90E+02	1.55E+02
	C30_25 $^\circ\text{C}$	25	30	6.57E+02	1.69E+02
	C30_45 $^\circ\text{C}$	45	30	1.01E+03	3.33E+02
	C50_5 $^\circ\text{C}$	5	50	6.63E+02	1.73E+02
	C50_25 $^\circ\text{C}$	25	50	6.70E+02	1.65E+02
	C50_45 $^\circ\text{C}$	45	50	2.18E+03	1.32E+03
NE	NE_0		0	3.11E+02	7.05E+01
	NE30_5 $^\circ\text{C}$	5	30	1.66E+02	6.99E+01
	NE30_25 $^\circ\text{C}$	25	30	1.38E+02	6.98E+01
	NE30_45 $^\circ\text{C}$	45	30	2.50E+02	1.29E+02
	NE50_5 $^\circ\text{C}$	5	50	1.58E+02	6.60E+01
	NE50_25 $^\circ\text{C}$	25	50	1.08E+02	5.53E+01
	NE50_45 $^\circ\text{C}$	45	50	7.36E+02	4.53E+02
E	E_0		0	1.10E+02	2.26E+01
	E30_5 $^\circ\text{C}$	5	30	8.86E+01	2.26E+01
	E30_25 $^\circ\text{C}$	25	30	2.47E+01	8.87E+00
	E30_45 $^\circ\text{C}$	45	30	2.21E+02	1.30E+02
	E50_5 $^\circ\text{C}$	5	50	9.19E+01	2.52E+01
	E50_25 $^\circ\text{C}$	25	50	2.80E+01	1.03E+01
	E50_45 $^\circ\text{C}$	45	50	3.67E+02	2.90E+02

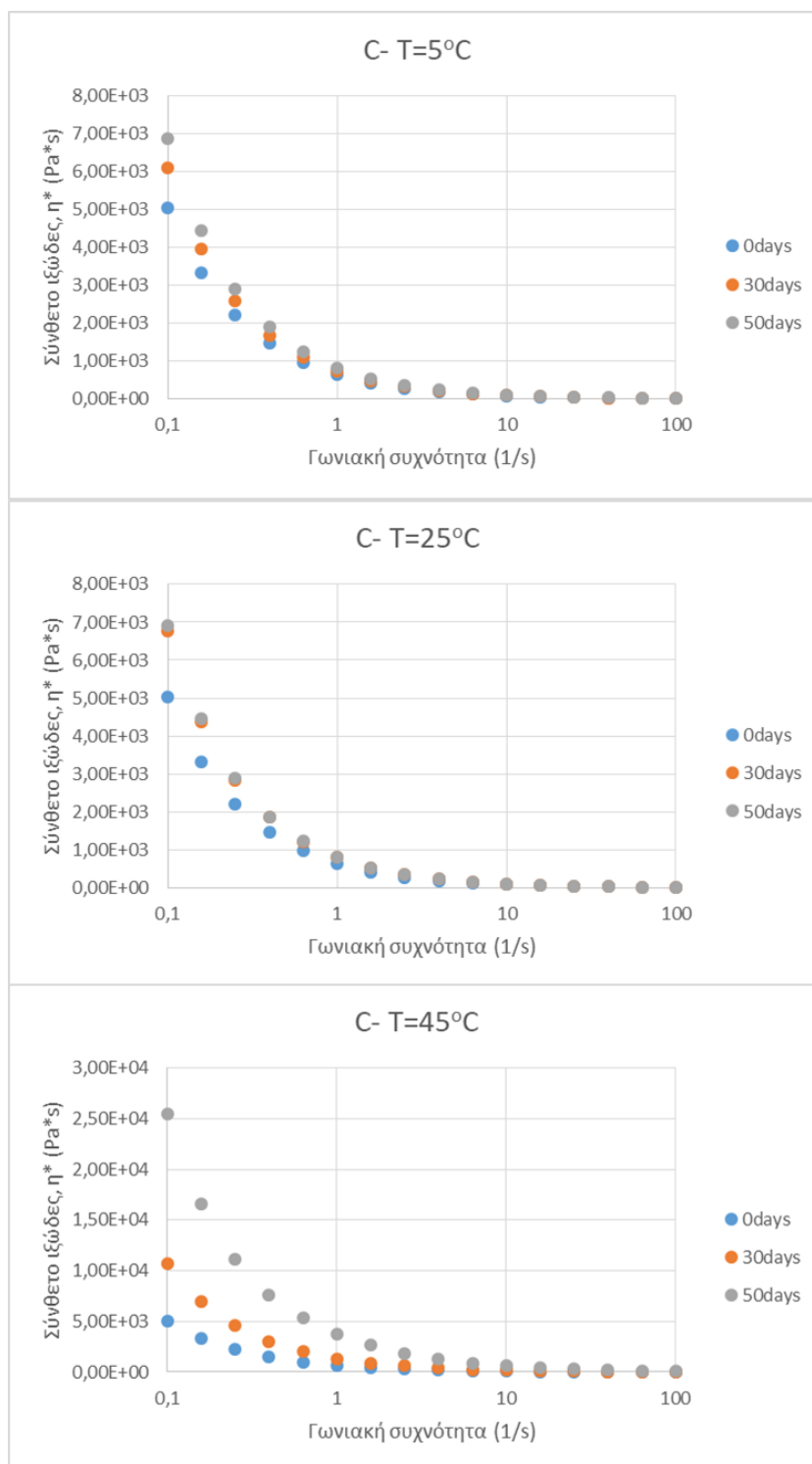
Από τα αποτελέσματα του

Πίνακας 24 συμπεραίνεται ότι η κρέμα βάση (C), παρουσιάζει τις μεγαλύτερες τιμές μέτρου αποθήκευσης (G_o') και του μέτρου απώλειας (G_o''), και ακολουθεί η κρέμα με τις μη εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες (NE). Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι οι κρέμες C, NE είναι πιο σκληρές από τη κρέμα με τα εγκλεισμένα προϊόντα. Επιπλέον, παρατηρείται ότι η κρέμα βάση διατηρεί περίπου σταθερές τιμές G_o' και G_o'' στις θερμοκρασίες των 5°C, 25°C ενώ τα άλλα δύο δείγματα (NE, E) μειώνουν τις τιμές των παραμέτρων αυτών, με πιο αισθητή μείωση στο δείγμα με τα εγκλεισμένα προϊόντα. Τέλος, και τα τρία δείγματα αυξάνουν τις τιμές των G_o' και G_o'' στους 45°C, συνεπώς οι κρέμες γίνονται πιο σκληρές, γεγονός που πιθανώς να οφείλεται κυρίως στην απώλεια υγρασίας.

Επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στο σύνθετο ιξώδες για τις θερμοκρασίες 5°C, 25°C και 45°C

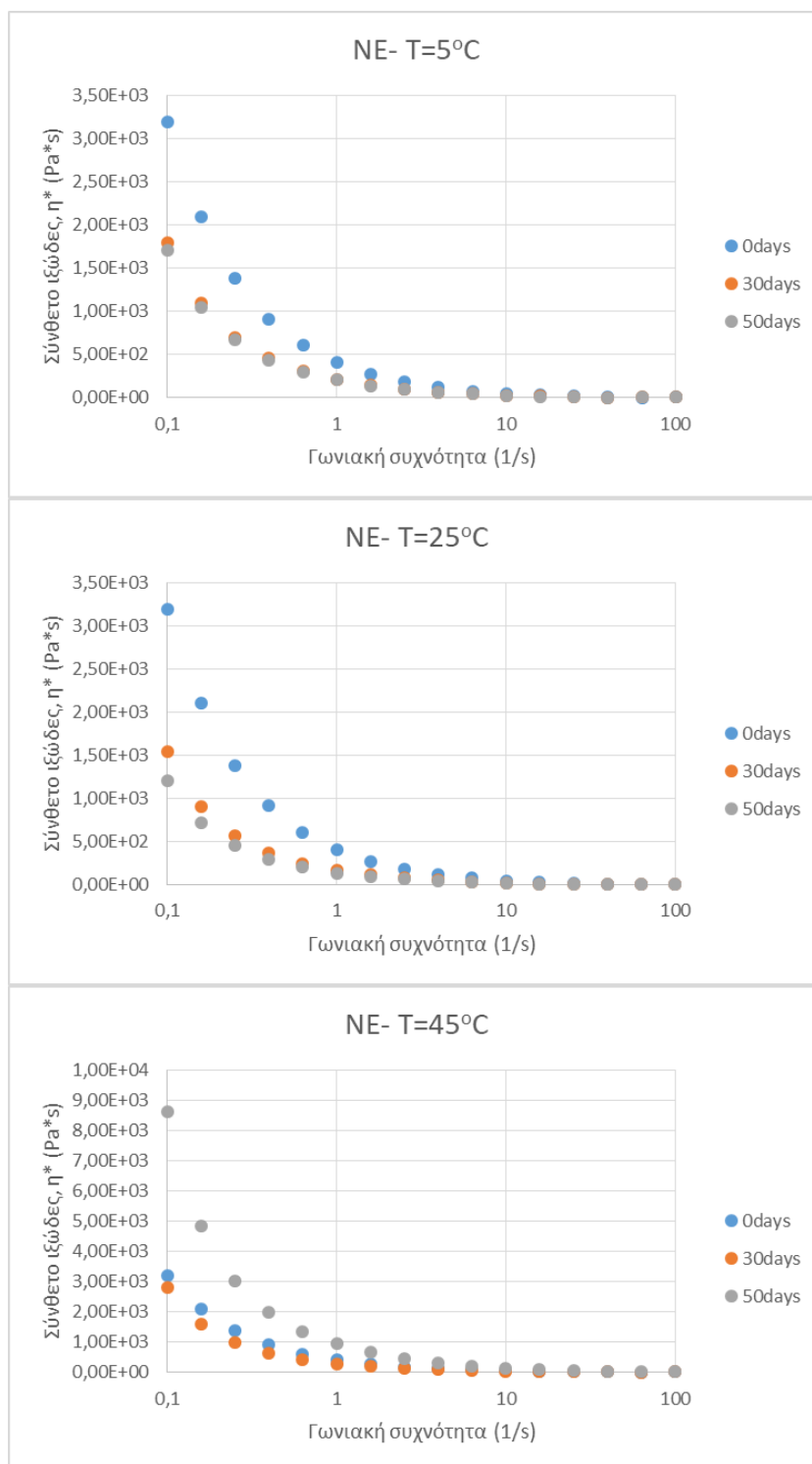
Οι μετρήσεις του ιξώδους είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τη ποσοτικοποίηση των αλλαγών στα υλικά. Οι κρέμες αποτελούν σύνθετα συστήματα γαλακτωμάτων, των οποίων οι μεταβολές στη δομή αντικατοπτρίζονται στις αλλαγές του ιξώδους. Συνήθως, το ιξώδες αυξάνεται, καθώς οι δομές του γαλακτώματος αναπτύσσονται και σταθεροποιούνται. Ωστόσο, σε άλλες περιπτώσεις για μεγάλους χρόνους αποθήκευσης, το ιξώδες μπορεί να παρουσιάσει σημαντική μείωση λόγω της αποικοδόμησης του προϊόντος.

Στα παρακάτω διαγράμματα μελετάται η επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στο σύνθετο ιξώδες για διάφορες θερμοκρασίες αποθήκευσης.



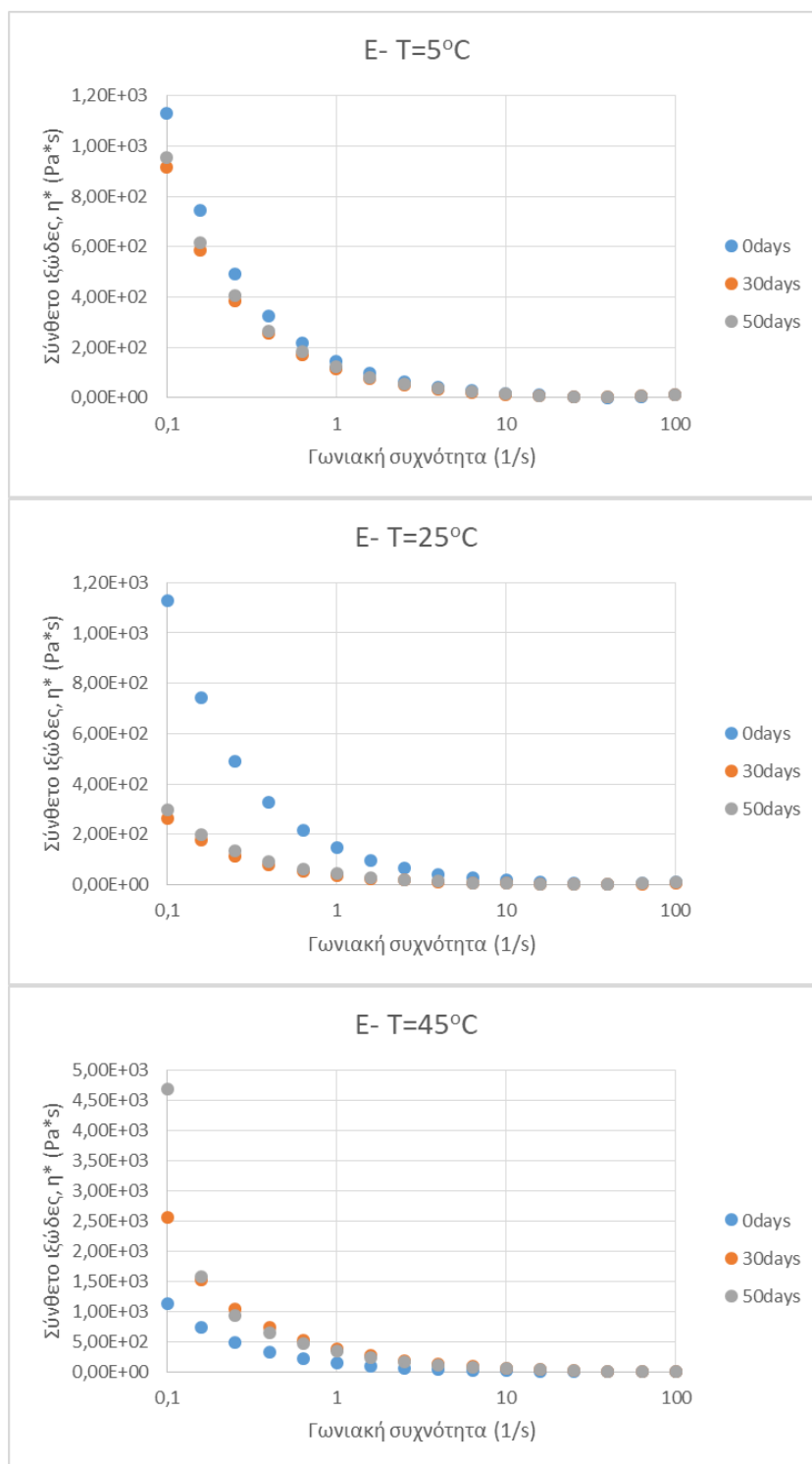
Διάγραμμα 21: Σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για την κρέμα βάση (C) σε διάφορους χρόνους και θερμοκρασίες.

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι η κρέμα βάση (C) διατηρεί περίπου σταθερό σύνθετο ιξώδες στους 5°C και στους 25°C στους διάφορους χρόνους. Αντίθετα, στους 45°C η κρέμα βάση αυξάνει το ιξώδες με το πέρασμα του χρόνου.



Διάγραμμα 22: Σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για την κρέμα με τις μη εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες (NE) σε διάφορους χρόνους και θερμοκρασίες.

Η κρέμα με τα μη εγκλεισμένα προϊόντα παρουσιάζει σχεδόν ίδια συμπεριφορά στους 5°C και στους 25°C μειώνοντας το σύνθετο ιξώδες με το πέρασμα του χρόνου. Στους 45°C, ωστόσο, η κρέμα μειώνει το σύνθετο ιξώδες τις τις πρώτες 30 ημέρες ενώ μετέπειτα παρουσιάζεται μεγάλη αύξηση του ιξώδους στις 50 ημέρες.

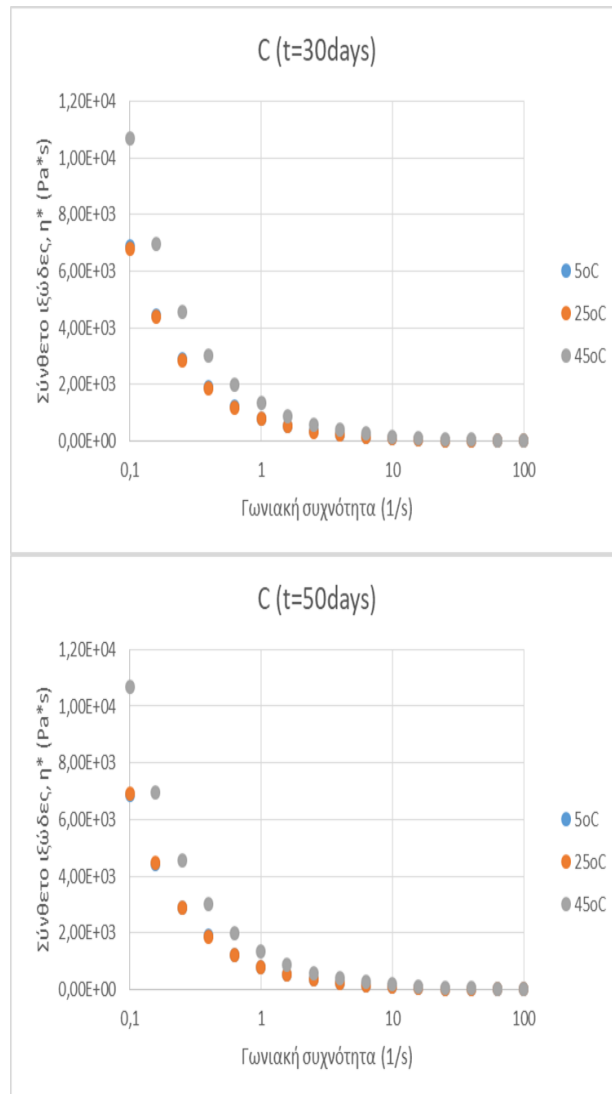


Διάγραμμα 23: Σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για την κρέμα με τις εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες(E) σε διάφορους χρόνους και θερμοκρασίες.

Η κρέμα με τις εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες στους 5°C μειώνει ελάχιστα το σύνθετο ιξώδες με το πέρασμα του χρόνου, στους 25°C υπάρχει μια μεγάλη μείωση του ιξώδους στους χρόνους $t=30\text{days}$ και $t=50\text{days}$ σε σχέση με την αρχική τιμή. Τέλος, στους 45°C το ιξώδες αυξάνεται σταδιακά με το χρόνο.

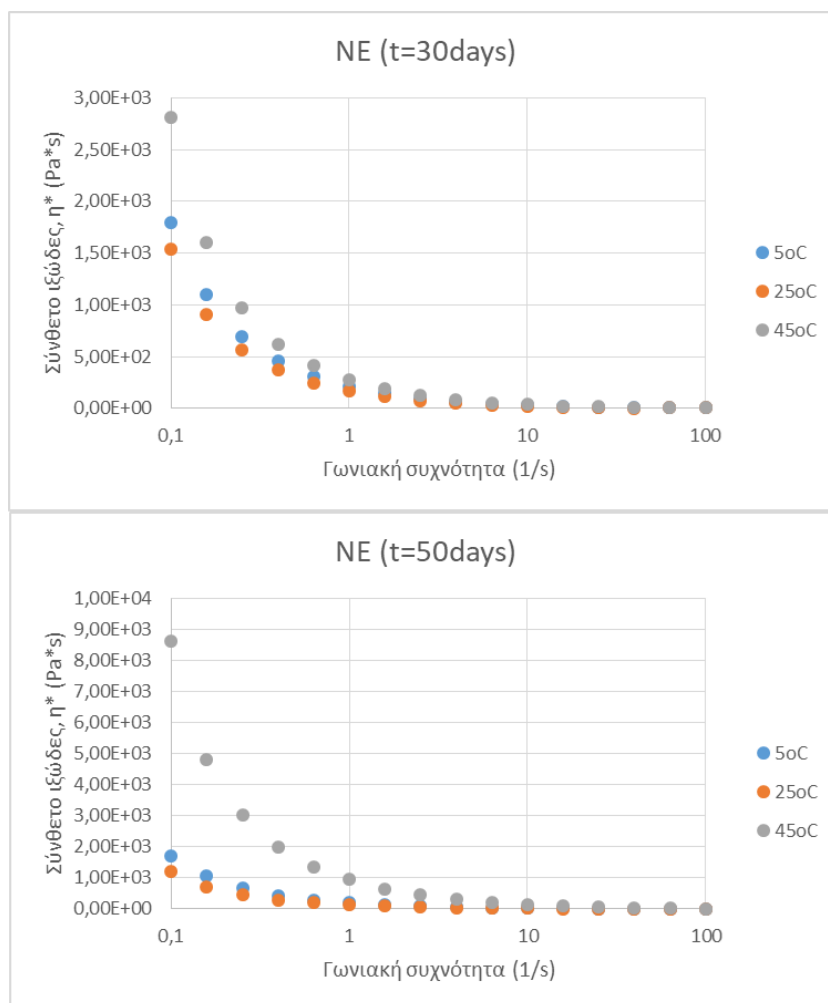
Επίδραση των διαφορετικών θερμοκρασιών αποθήκευσης στο σύνθετο ιξώδες για διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης

Στα Διάγραμμα 24 Διάγραμμα 26 παρουσιάζονται οι διαφορές στο σύνθετο ιξώδες για όλο το εύρος τιμών της γωνιακής συχνότητας και εξετάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης στο ιξώδες για τους διάφορους χρόνους αποθήκευσης.



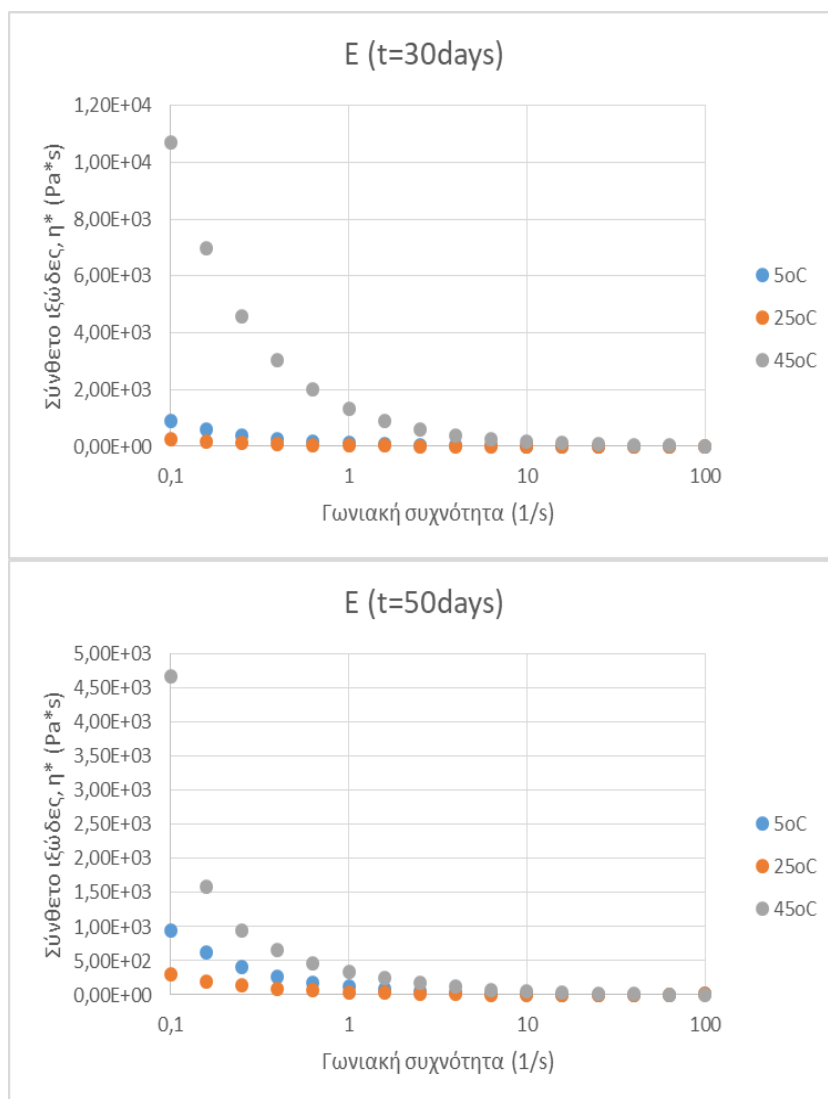
Διάγραμμα 24: Σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για την κρέμα βάση (C) σε χρόνο αποθήκευσης 30 ημερών (πάνω) και 50 ημερών (κάτω) στις διαφορετικές θερμοκρασίες.

Από το παραπάνω διάγραμμα εξαγεται το συμπέρασμα ότι η κρέμα βάση (C), δεν μεταβάλλει το σύνθετο ιξώδες στις 50 ημέρες αποθήκευσης. Το σύνθετο ιξώδες μεταβάλλεται σε αυτή τη περίπτωση μόνο στη θερμοκρασία των 45°C ανεξαρτήτως του χρόνου.



Διάγραμμα 25:Σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για την κρέμα με τις μη εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες(NE) σε χρόνο αποθήκευσης 30 ημερών (πάνω) και 50 ημερών (κάτω) στις διαφορετικές θερμοκρασίες.

Η κρέμα με τις μη εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες (NE) στους 5°C και στους 25°C δε μεταβάλλει αισθητά το ιξώδες με το χρόνο. Αντίθετα, στους 45°C παρατηρείται μεγάλη αύξηση του ιξώδους στις 50 ημέρες συγκριτικά με τις 30 ημέρες.



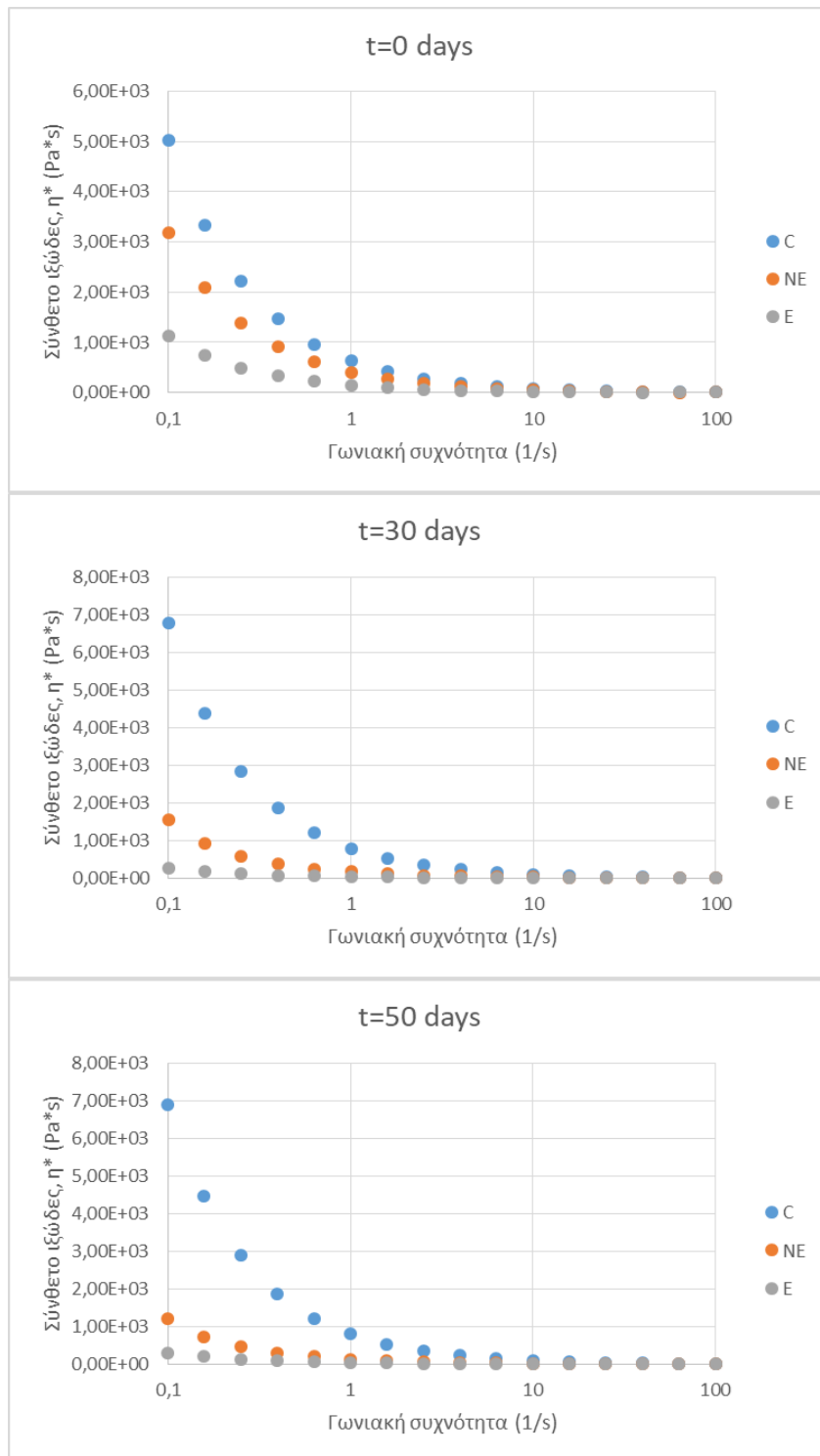
Διάγραμμα 26:Σύνθετο ιξώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για την κρέμα με τις εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες (E) σε χρόνο αποθήκευσης 30 ημερών (πάνω) και 50 ημερών (κάτω) στις διαφορετικές θερμοκρασίες.

Η κρέμα με τις εγκλεισμένες βιοδραστικές ουσίες (E) στους 5°C και στους 25°C δε μεταβάλει αισθητά το ιξώδες με το χρόνο. Στους 45°C παρατηρείται μείωση του ιξώδους στις 50 ημέρες συγκριτικά με τις 30 ημέρες.

Συμπερασματικά, η κρέμα με τα εγκλεισμένα προϊόντα (E) φαίνεται να έχει παρόμοια συμπεριφορά με τη κρέμα με τη μη εγκλεισμένα προϊόντα (NE) στις θερμοκρασίες 5°C και 25°C. Σε μεγαλύτερες όμως θερμοκρασίες φαίνεται να διαφοροποιούνται σημαντικά.

Επίδραση της εγκλεισμένης ουσίας στο σύνθετο ιξώδες για χρόνους αποθήκευσης $t=0$, $t=30\text{days}$ και $t=50\text{days}$ στους 25°C

Ακολούθως εξετάζεται η επίδραση των εγκλεισμένων συστατικών (ωμέγα-3 λιπαρών οξέων και κολλαγόνου) στο σύνθετο ιξώδες του δείγματος. Να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία αποθήκευσης που εξετάζεται είναι οι 25°C που είναι η συνήθης θερμοκρασία φύλαξης των καλλυντικών.



Διάγραμμα 27: Σύνθετο ιώδες (η^*) σε όλο το εύρος της επιβαλλόμενης γωνιακής συχνότητας για τα τρία δείγματα C, NE, E στους 25°C για χρόνος $t=0$, $t=30days$ και $t=50days$.

Από το Διάγραμμα 27 προκύπτει ότι το σύνθετο ιώδες της κρέμα με το εγκλεισμένο προϊόν (E), στους 25°C, έχει σε κάθε χρονική στιγμή τη χαμηλότερη τιμή ιώδους συγκριτικά με τα άλλα δείγματα. Την υψηλότερη τιμή ιώδους σε κάθε θερμοκρασία παρουσιάζει η κρέμα βάση. Συνεπώς, η εισαγωγή των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου, είτε σε εγκλεισμένη είτε σε ελεύθερη μορφή, στη κρέμα βάση είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ιώδους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την αξιοποίηση του *L. Sceleratus* είναι απόρροια της μη ελεγχόμενης αύξησης του πληθυσμού του στη Μεσόγειο θάλασσα που διαταράσσει το οικοσύστημα και την οικονομία των παράκτιων περιοχών, αλλά και της δυνατότητας απομόνωσης προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Οι αρνητικές επιπτώσεις του λαγοκέφαλου οφείλονται στην ύπαρξη μιας θανατηφόρας τοξίνης, της τετραδοτοξίνης, η οποία το καθιστά απαγορευμένο είδος κατανάλωσης υψηλού κινδύνου. Επιπλέον, δεδομένα σχετικά με την παρουσία του λαγοκέφαλου στις ακτές έδειξαν ότι επηρεάζει την παρουσία γηγενών, εμπορικά αξιοποιήσιμων ειδών (ψαριών και κεφαλόποδων) έχοντας δυσμενείς επιπτώσεις στα αλιεύματα των ψαράδων. Η συνήθης αντιμετώπιση είναι η μίσθωση ψαράδων για τη συλλογή του ψαριού αυτού, και η μετέπειτα απόρριψη του ως τοξικό απόβλητο. Ωστόσο, ο λαγοκέφαλος αποτελεί βιοδιυλιστήριο, καθώς περιέχει συστατικά όπως είναι η τετραδοτοξίνη, τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα και το κολλαγόνο τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών.

Μια τέτοια εφαρμογή θα μπορούσε να αποτελεί ο κλάδος της κοσμετολογίας που αναπτύσσεται ραγδαία τα τελευταία χρόνια, και οι σύγχρονες τάσεις στη βιομηχανία των καλλυντικών επιβάλλουν τη δημιουργία ολοένα και πιο καινοτόμων προϊόντων. Τέτοια είναι και αυτά, στα οποία προστίθενται βιοδραστικές ουσίες από φυσικές πηγές και παρουσιάζουν πληθώρα βελτιωμένων και ευεργετικών για το ανθρώπινο δέρμα ιδιοτήτων, συγκριτικά με τα χημικής φύσεως συντηρητικά.

Από τις βιοδραστικές ουσίες που απομονώνονται από τον *L. sceleratus*, η *TTX* έχει ήδη βρει εφαρμογή σαν φάρμακο στον ιατρικό τομέα, ωστόσο πιθανές εφαρμογές επεκτείνονται στη βιομηχανία των καλλυντικών, και συγκεκριμένα στη χρήση της ως ενέσιμο προϊόν, εναλλακτικό του Botox. Τα αποτελέσματα της απομόνωσης της *TTX* στην παρούσα διπλωματική εργασία, έδειξαν ότι αποτελεσματικότερος διαλύτης για την απομόνωσή της είναι το διάλυμα οξικού οξέος 1% σε μεθανόλη συγκριτικά το υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1%, ενώ μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε *TTX* βρέθηκε, και με τους δύο διαλύτες, στα εσωτερικά όργανα του λαγοκέφαλου, συγκεκριμένα 14,1μg *TTX*/g ιστού (εκχύλιση με τον αποτελεσματικότερο διαλύτη) έναντι της σάρκας που περιείχε 1,77μg *TTX*/g ιστού (εκχύλιση με τον αποτελεσματικότερο διαλύτη). Συνεπώς, ο λαγοκέφαλος αποτελεί μια πλούσια πηγή *TTX*, δεδομένου ότι οι ποσότητες αλλαντικής τοξίνης που χρησιμοποιούνται στις ενέσεις τύπου Botox είναι λιγότερο από 0.4 ng [22] ανά ένεση, ενώ η τιμή της είναι 430\$/ng [48], συνεπώς μια τέτοια εφαρμογή θα ήταν ιδιαίτερα επικερδής με αμελητέο κόστος παραγωγής. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι αν και το διάλυμα 1% οξικού οξέος σε μεθανόλη είναι πιο αποδοτικός διαλύτης, ο άλλος συνδυασμός συνιστά μια πιο πράσινη επιλογή.

Επιπρόσθετα, ο λαγοκέφαλος αποτελεί πηγή ιχθυελαίου, με μεγάλη περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία παρέχουν σημαντικά οφέλη σε προϊόντα περιποίησης του δέρματος και των μαλλιών. Η παραλαβή των ω-3 λιπαρών οξέων από τον *L. Sceleratus*, τόσο από τη σάρκα όσο και από το δέρμα με χρήση διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης μέσω της μεθόδου *Bligh and Dyer* και μέσω των εναλλακτικών διαλυτών εξανίου-ισοπροπανόλης, έδειξε ότι αποτελεσματικότερος διαλύτης εκχύλισης για τον *L. Sceleratus* είναι το μίγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης, καθώς παράχθηκαν 7,6 mg ελαίου/g ιστού, έναντι 6,2 mg ελαίου/g ιστού με τους εναλλακτικούς διαλύτες. Επίσης βρέθηκε ότι από το δέρμα εκχυλίζεται μεγαλύτερη ποσότητα ιχθυελαίου σε σχέση με τη σάρκα. Αν και οι διαλύτες αυτοί δεν ιδιαίτερα φιλικόι προς το περιβάλλον, η ανακύκλωση τους είναι μια απλή διαδικασία. Έγινε, επίσης σύγκριση των παραγόμενων ιχθυελαίων, από τον *L. Sceleratus* και από ένα λιπαρό ψάρι, το σολομό. Βρέθηκε ότι ο σολομός αν και παράγει μεγαλύτερη ποσότητα ιχθυελαίου, η συγκέντρωση του σε *DHA* είναι πάνω από δύο φορές μικρότερη από ότι στον *L. Sceleratus*. Το γεγονός αυτό καθιστά των λαγοκέφαλο μια αξιόπιστη πηγή λιπαρών οξέων.

Τέλος, το κολλαγόνο που παραλαμβάνεται από το δέρμα και τα κόκκαλα του λαγοκέφαλου έχει την ικανότητα να επιβραδύνει τη δημιουργία των ελεύθερων ριζών προστατεύοντας από τη γήρανση του δέρματος, καθώς και να ενισχύει την επιδιόρθωση και την αναγέννηση του δέρματος. Η απομόνωση του κολλαγόνου πραγματοποιήθηκε με τις μεθόδους *PSC* και *ASC*, η μέθοδος *PSC* βρέθηκε πιο αποτελεσματική δεδομένου ότι απομονώθηκε 45% μεγαλύτερη ποσότητα κολλαγόνου. Σύγκριση,

της ποσότητας κολλαγόνου των οστών και του δέρματος του λαγοκέφαλου, φανέρωσε μεγαλύτερη ποσότητα κολλαγόνου στο δέρμα. Τέλος, ο λαγοκέφαλος εμφάνιζε μεγαλύτερη ποσότητα κολλαγόνου σε σχέση με το σολομό, τόσο στο δέρμα όσο και στα κόκαλα.

Προκειμένου να εξετασθεί η συμπεριφορά των ουσιών αυτών σε καλλυντικά σκευάσματα θεωρήθηκε σκόπιμος ο εγκλεισμός τους με την τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης, τόσο για να καλυφθούν οι δυσάρεστες οσμές αυτών όσο και για να προστατευθούν από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η ηλεκτροστατική ινοποίηση είναι μια καινοτόμα μέθοδος που αναμένεται να εξελιχθεί ακόμα περισσότερο μελλοντικά, καθώς παρουσιάζει αυξημένη αποτελεσματικότητα εγκλεισμού και δεν περιλαμβάνει ακραίες συνθήκες που πιθανώς να αλλοιώνουν το τελικό προϊόν.

Τα δείγματα κρεμών σε όλες τις θερμοκρασίες και τους χρόνους εξέτασης, βρέθηκαν μικροβιολογικά σταθερά ως προς το ολικό μικροβιακό φορτίο, τις ζύμες/μούχλες και το *E.coli*. Επιπλέον, το *pH* στα εξεταζόμενα δείγματα έλαβε τιμές από 5.75 έως 6.51, τιμές ουδέτερες για το *pH* του δέρματος. Όσον αφορά στο χρώμα, η εξέταση των δειγμάτων με το χρωματογράφο, έδειξε ότι, σε θερμοκρασίες 5°C και 25°C, η συνολική μεταβολή του χρώματος του δείγματος για το εγκλεισμένο προϊόν δεν έχει μεγάλη απόκλιση από αυτήν της κρέμας βάσης, αντίθετα από την κρέμα με τα μη εγκλεισμένα προϊόντα. Συνεπώς, με τον εγκλεισμό των συστατικών επιτυγχάνεται μειωμένη αλλοίωση της κρέμας. Τέλος, η Δυναμική Μηχανική Ανάλυση (DMA) έδειξε ότι τα δείγματα παρουσιάζουν κατάλληλη συνεκτικότητα για πρακτική εφαρμογή.

Στο μέλλον, σκόπιμο είναι να αναπτυχθούν πράσινες μέθοδοι εκχύλισης λιπαρών οξέων, ώστε να είναι ακόμη πιο ασφαλής η εφαρμογή των απομονωμένων ουσιών σε εμπορικά προϊόντα. Επίσης, πρέπει να εξερευνηθεί η χρήση της τετραδοτοξίνης εναλλακτικά της αλλαντικής τοξίνης, η οποία παράγεται από τον *Clostridium botulinum* και να πραγματοποιηθούν κλινικές μελέτες.

Συνοψίζοντας τα συμπεράσματα της παρούσας διπλωματικής επεξεργασίας είναι τα εξής:

- Ο *L. Sceleratus* περιέχει επαρκή ποσότητα τετραδοτοξίνης, κυρίως στα εσωτερικά του όργανα.
- Αποτελεί πηγή ιχθυελαίου με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και κυρίως σε *DHA* και πηγή κολλαγόνου.
- Η κυκλοδεξτρίνη αποδείχτηκε ως ιδανική μήτρα για τον εγκλεισμό των ω -3 λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου.
- Ο εγκλεισμός των ω -3 λιπαρών οξέων και του κολλαγόνου προερχόμενα από ψάρια είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τη κάλυψη της οσμής τους και τη προστασία από τις περιβαλλοντικές συνθήκες.
- Οι αναπτυσσόμενες κρέμες παρέμειναν μικροβιολογικά σταθερές στις διάφορες θερμοκρασίες και χρόνους εξέτασης. Το *pH* τους ήταν ουδέτερο συγκριτικά με το *pH* του δέρματος. Επιπλέον, σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5°C και 25°C, η συνολική μεταβολή του χρώματος των δειγμάτων δεν παρουσίασε μεγάλη απόκλιση σε σύγκριση με τη κρέμα βάση σε διάρκεια 50 ημερών. Ενώ τέλος όλα τα δείγματα με ενσωματωμένα εγκλεισμένα βιοδραστικά συστατικά παρουσίαζαν συνεκτικότητα κατάλληλη για πρακτική εφαρμογή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Acar, C., S. Ishizaki, and Y. Nagashima, *Toxicity of the Lessepsian pufferfish Lagocephalus sceleratus from eastern Mediterranean coasts of Turkey and species identification by rapid PCR amplification*. European Food Research and Technology, 2017. **243**(1): p. 49-57.
2. Katikou, P., et al., *First report on toxicity assessment of the Lessepsian migrant pufferfish Lagocephalus sceleratus (Gmelin, 1789) from European waters (Aegean Sea, Greece)*. Toxicon, 2009. **54**(1): p. 50-55.
3. Guardone, L., et al., *Toxic invasive pufferfish (Tetraodontidae family) along Italian coasts: Assessment of an emerging public health risk*. Food Control, 2018. **91**: p. 330-338.
4. EastMed, *The puffer fish Lagocephalus sceleratus (GMELIN, 1789) in the eastern mediterranean*. GCP/INT/041/EC-GRE-ITA, 2012.
5. Τμήμα αλιείας και θαλάσσιων ερευνών *Σχέδιο για τον έλεγχο του πληθυσμού του λαγοκέφαλου (Lagocephalus sceleratus) στα παράκτια νερά της Κύπρου*. Κυπριακή δημοκρατία, Υπουργείο Γεωργίας-Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, 2011.
6. Jal, S. and S.S. Khora, *An overview on the origin and production of tetrodotoxin, a potent neurotoxin*. Journal of Applied Microbiology, 2015. **119**(4): p. 907-916.
7. Williams, C., *Malignant hyperthermia: A runaway thermogenic futile cycle at the sodium channel level*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2014. **05**: p. 197-200.
8. Noguchi, T. and J.S.M. Ebesu, *PUFFER POISONING: EPIDEMIOLOGY AND TREATMENT*. Journal of Toxicology : Toxin Reviews, 2001.
9. National Center for Biotechnology Information, *TETRODOTOXIN, COMPOUND SUMMARY*. PubChem.
10. Belitz, H.D., W. Grosch, and P. Schieberle, *"Χημεία τροφίμων"*. 4η έκδοση ed. 2011: ΤΖΙΟΛΑ.
11. Τζιά, Κ., Π. Ταούκης, and Β. Ωραιπούλου, *ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ*. 2009, ΑΘΗΝΑ: Ε.Μ. ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ.
12. ΜΠΟΣΚΟΥ, Δ., *"Χημεία τροφίμων"*. 5η Έκδοση ed. 2004, Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Γαρταγάνη. 123-161.
13. Bronz, I., *Fatty Acids*, in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. 2016, Elsevier.
14. NURULLAHOĞLU, Z.U. and E. ULUSOY, *Fatty Acid Composition of Lagocephalus sceleratus (Gmelin, 1789) (Osteichthyes: Tetraodontidae)*. Fen Bilimleri Dergisi, 2013.
15. Taşbozan, O. and M.A. Gökçe, *Fatty Acids in Fish*, in *Fatty Acids*. 2017.
16. Huang, T.-H., et al., *Cosmetic and Therapeutic Applications of Fish Oil's Fatty Acids on the Skin*. Marine Drugs, 2018. **16**(8).
17. Parvizi, J. and G.K. Kim, *Chapter 53 - Collagen*, in *High Yield Orthopaedics*, J. Parvizi and G.K. Kim, Editors. 2010, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 107-109.
18. Gelse, K., E. Pöschl, and T. Aigner, *Collagens—structure, function, and biosynthesis*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003. **55**(12): p. 1531-1546.
19. Gómez-Guillén, M.C., et al., *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*. Food Hydrocolloids, 2011. **25**(8): p. 1813-1827.
20. Rodríguez, M.I.A., L.G.R. Barroso, and M.L. Sánchez, *Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications*. JOURNAL OF COSMETIC DERMATOLOGY, 2018.
21. Venkatesan, J., et al., *Marine Fish Proteins and Peptides for Cosmeceuticals: A Review*. 2017. **15**(5): p. 143.
22. Dhaked, R.K., et al., *Botulinum toxin: bioweapon & magic drug*. The Indian journal of medical research, 2010. **132**(5): p. 489-503.
23. Đorđević, V., et al., *Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds*. Food Engineering Reviews, 2015. **7**(4): p. 452-490.
24. Ozturk, E. and U. Temiz, *Encapsulation Methods and Use in Animal Nutrition*. Selcuk Journal of Agricultural and Food Sciences, 2018. **32**: p. 624-631.

25. Bastos, F. and L. Santos, *Encapsulation of cosmetic active ingredients for topical application – a review*. Journal of Microencapsulation, 2015. **33**: p. 1-17.
26. Silva, P.T.d., et al., *Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology*. Ciência Rural, 2014. **44**: p. 1304-1311.
27. Szente, L. and É. Fenyvesi, *Cyclodextrin-Enabled Polymer Composites for Packaging*. 2018. **23**(7): p. 1556.
28. Crini, G., et al., *Fundamentals and Applications of Cyclodextrins*, in *Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis*, S. Fourmentin, G. Crini, and E. Lichtfouse, Editors. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 1-55.
29. Agnihotri, N., et al., *Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery: A Review*. Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012: p. 1-20.
30. Ying, L. and P. Kinam, *Microencapsulation: Methods and Pharmaceutical Applications*, in *Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology*. 2012.
31. Paredes, A., et al., *Nanoencapsulation in the food industry: manufacture, applications and characterization*. Journal of Food Bioengineering and Nanoprocessing, 2016. **1**: p. 56-79.
32. Kermasha, S., I. Alli, and C.N. Mulligan, *Encapsulation in the food industry: a review*. International journal of food sciences and nutrition, 1999: p. 213-224.
33. Mohammad, R., et al., *Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters* Trends in Food Science & Technology, 2018: p. 34-60.
34. Rostami, M., et al., *Application of different biopolymers for nanoencapsulation of antioxidants via electrohydrodynamic processes*. Food Hydrocolloids, 2019. **97**: p. 105170.
35. Bhardwaj, N. and S.C. Kundu, *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology Advances, 2010. **28**(3): p. 325-347.
36. Shi, X., et al., *Review Article Electrospinning of Nanofibers and Their Applications for Energy Devices*. Journal of Nanomaterials, 2015. **2015**.
37. Lopaciuk, A. and M. Loboda, *GLOBAL BEAUTY INDUSTRY TRENDS IN THE 21st CENTURY*, in *Management, Knowledge and Learning International Conference 2013*. 2013: Croatia.
38. Datta, H.S. and R. Paramesh, *Trends in aging and skin care: Ayurvedic concepts*. Journal of Ayurveda and integrative medicine, 2010. **1**(2): p. 110-113.
39. SKOOG, HOLLER, and CROUCH, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*. 6 ed. 2007.
40. Όξενκιουν- Πετροπούλου, Μ., *Φασματομετρικές μέθοδοι* 3ed. 2012, Αθήνα: Εκδόσεις Συμμετρία.
41. Jones, D.S., *Dynamic mechanical analysis of polymeric systems of pharmaceutical and biomedical significance*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **179**(2): p. 167-178.
42. Raja, P.M.V. and A.R. Barron, *Physical Methods in Chemistry and Nano Science* 2016.
43. Yang, Q., et al., *Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 2004.
44. United States Pharmacopeial Convention, *The United States Pharmacopeial 2011: USP34; The national formulary : NF29*. 2011: Rockville,MD.
45. Lambers, H., et al., *Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora*. International Journal of Cosmetic Science, 2006.
46. IBĂNESCU, C., et al., *STABILITY OF DISPERSE SYSTEMS ESTIMATED USING RHEOLOGICAL OSCILLATORY SHEAR TESTS* ACADEMIA ROMÂNĂ 2010: p. 933-940.
47. G., H., *RHEOLOGICAL PROPERTIES OF COSMETICS AND TOILETRIES*. Flavour and Fragrance Journal, 1994.
48. American College of Rheumatology. [cited 2019 16/9]; Available from: <https://www.rheumatology.org/Portals/0/Files/Medicare-Drug-Fee-Schedule-Table3-2019.pdf>.