ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Προσδιορισμός Λιπιδίων και Μετάλλων σε Βρώσιμα Υδρόβια

ΣΟΥΛΤΑΝΗ ΓΕΩΡΓΙΑ
MSc ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2017

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Προσδιορισμός Λιπιδίων και Μετάλλων
σε Βρώσιμα Υδρόβια

ΣΟΥΛΤΑΝΗ ΓΕΩΡΓΙΑ

Α.Μ.: 001001

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Μαρκάκη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Μαρκάκη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Κωμαΐτης Μιχαήλ, Ομότιμος Καθηγητής ΓΠΑ

Σινάνογλου Βασιλεία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΤΕΙ Αθήνας

Καλοκαιρινός Αντώνιος, Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Θωμαΐδης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Προεστός Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Καπίρης Κωνσταντίνος, Ερευνητής Α΄, ΕΛΚΕΘΕ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη των λιπιδικών βιοδραστικών συστατικών όπως και των μετάλλων και μεταλλοειδών, τριών ειδών γαρίδων (*Aristaeomorpha foliacea, Parapenaeus longirostris, Pandalus borealis*). Οι γαρίδες παρουσιάζουν μεγάλο διατροφικό ενδιαφέρον, διότι αποτελούν σημαντική πηγή λειτουργικών λιπιδικών συστατικών, όπως ω-3 λιπαρών οξέων, καροτενοειδών, φωσφολιπιδίων, κλπ. τα οποία έχουν παράλληλα χρήση στην παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων διατροφής “nutraceutical”. Η παρουσία και σύσταση αυτών των ουσιών εξαρτάται κυρίως από την ποιότητα και κατανάλωση του φυτοπλαγκτού-ζωοπλαγκτού και την περιοχή αλίευσης των γαρίδων. Επιπλέον στόχος ήταν η συγκριτική μελέτη των συστατικών αυτών στα συγκεκριμένα είδη γαρίδων. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν και συγκρίθηκαν μέταλλα και μεταλλοειδή στις γαρίδες, ώστε να δοθεί ολοκληρωμένη εικόνα της διατροφικής αξίας των εν λόγω γαρίδων.

Η εργασία αποτελείται από τέσσερα πειραματικά μέρη. Στο πρώτο πειραματικό μέρος (κεφάλαιο 6) αξιολογήθηκαν τα βιοδραστικά λιπιδικά συστατικά των μυών και των κεφαλοθωράκων των γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris.* Εφαρμόσθηκαν διαφορετικές αναλυτικές μέθοδοι με κύριες τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), την αεριοχρωματογραφία (GC) και την υγροχρωματογραφία (HPLC). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η φωσφατιδυλοχολίνη ήταν το κύριο λιπίδιο σε όλους τους ιστούς. Ως κύρια λιπαρά οξέα βρέθηκαν το παλμιτικό (C16:0), το ελαϊϊκό (C18:1 ω-9 cis), το εικοσιπεντενοϊκό (C20:5 ω-3 cis, EPA) και το εικοσιδυοεξενοϊκό (C22:6 ω-3 cis DHA) οξύ, τόσο σε μύες όσο και σε κεφαλοθώρακες. Η αναλογία ω-3/ω-6 λιπαρών οξέων των μύων των *A foliacea* και *P. longirostris* κυμάνθηκε σε τιμές >2.9, καθιστώντας τους μύες κατάλληλους για μια ισορροπημένη διατροφή. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ήταν τα κύρια λιπαρά οξέα των μυών και των δύο ειδών, ενώ στους κεφαλοθώρακες επικρατέστερα ήταν τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA). Από τα καροτενοειδή, η ασταξανθίνη (αντιοδειξωτικό) βρέθηκε ως το κυριότερο συστατικό σε όλους τους ιστούς, και ακολούθησαν η λουτεΐνη, η κανθαξανθίνη, η ζεαξανθίνη, η α- και β-κρυπτοξανθίνη. Στο δεύτερο πειραματικό μέρος (κεφάλαιο 7), μελετήθηκαν συγκριτικά οι γαρίδες *P. longirostris* από τη θάλασσα της Κυλλήνη με τις *P. borealis* από τη θάλασσα Skagerrak (Δανία). Επίσης προσδιορίσθηκαν τα στοιχεία μόλυβδος (Pb), κάδμιο (Cd), ολικό αρσενικό (tAs) με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS), το οργανικό και

ανόργανο αρσενικό με HPLC-ICPMS και ο υδραργύρος (Hg) με φασματομετρία ατομικού φθορισμού ψυχρού ατμού (CVAFS). Στη συνέχεια προσδιορίστηκε και συγκρίθηκε το προφίλ των βιοδραστικών λιπαρών οξέων του ολικού λίπους των μυών και κεφαλοθωράκων των παραπάνω ειδών γαρίδων με GC-FID ανάλυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το tAs ήταν σε υψηλές συγκεντρώσεις σε όλους τους ιστούς, και κυρίως υπό την οργανική του μορφή. Αισθητά υψηλά επίπεδα Cd, βρέθηκαν στις γαρίδες *P. borealis*. Τέλος, οι ιστοί και των δύο ειδών περιείχαν σημαντικά ποσοστά των PUFA. Στο κεφάλαιο 8 (τρίτο πειραματικό μέρος), στόχος ήταν να μελετηθούν οι ιστοί των *A. foliacea* ως προς τη συγκέντρωση των στοιχείων Pb, Hg, Cd, tAs και Se. Έμφαση δόθηκε στην ανάλυση νέων ενώσεων As, των αρσενολιπιδίων (arsenolipids) με χρήση HPLC-ICPMS. Για πρώτη φορά δόθηκε το γενικό προφίλ των αρσενολιπίδιων σε γαρίδες, χωρίς όμως να επιτευχθεί η ειδοταυτοποίηση των ενώσεων αυτών. Στο κεφάλαιο 9 (τελευταίο πειραματικό μέρος) προσδιορίστηκαν τα απαραίτητα μέταλλα Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Cr και Ni και τα λιπαρά οξέα των ολικών, ουδετέρων και πολικών λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων των γαρίδων *A. foliacea.* Υπολογίζοντας την ημερήσια πρόσληψη (EDI) των μετάλλων ανά 100 g γεύματος, οι τιμές των EDI βρέθηκαν χαμηλές στους μύες, ενώ στους κεφαλοθώρακες ήταν σε ικανοποιητικά επίπεδα. Εξαίρεση και ενδιαφέρον προκάλεσαν οι τιμές υψηλές συγκεντρώσεις του Cu, ο οποίος πιθανόν να σχηματίζει σύμπλοκα με την ασταξανθίνη προσδίδοντας έντονο κόκκινο χρώμα στις *A. foliacea.*

Εν κατακλείδι, οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των ειδών των γαρίδων οφείλονται σε ποικίλους παράγοντες, όπως στις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, τη βιοδιαθεσιμότητα των στοιχείων και των θρεπτικών συστατικών στο θαλασσινό νερό, στην έκδυση, το μέγεθος και το στάδιο ανάπτυξης των γαρίδων. Σύμφωνα όμως, με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, οι συγκεκριμένες γαρίδες καθίστανται κατάλληλες προς κατανάλωση και χρήση των λειτουργικών συστατικών τους σε συμπληρώματα διατροφής και άλλα προϊόντα.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιοδραστικά λιπιδικά συστατικά και μέταλλα-μεταλλοειδή σε γαρίδες

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: γαρίδες, μύες, κεφαλοθώρακες, λιπίδια, λιπαρά οξέα και καροτενοειδή, μέταλλα και μεταλλοειδή

ABSTRACT

The aim of the present doctoral thesis was to compare the bioactive lipid constituents as well as the metals and metalloids of three different shrimp species (*Aristaeomorpha foliacea Parapenaeus longirostris* and *Pandalus borealis).* The shrimp present a high nutritional interest, as they contain significant amounts of fuctional lipid substances such as ω-3 fatty acids, carotenoids, phospholipids etc. which are widely used in the production of pharmaceutical and nutritional products refered as “nutraceutical”. The presence and the composition of nutraceuticals depends on the quality and the consumption of phytoplankton and zooplankton, as well as the area of caught.

This work includes four experimental parts. To the first experimental part (chapter 6) the two Mediterranean shrimp species, *A. foliacea* and *P. longirostris* were assessed in respect to essential nutrients, fatty acids and carotenoids. Various analytical methods were used such as TLC, GC and HPLC. The results indicated that the ω-3/ω-6 polyunsaturated fatty acids ratio in *A. foliacea* and *P. longirostris* muscle lipids exhibited considerable values (>2.9), indicating a healthy diet. Regarding carotenoids, astaxanthin was the most prevalent, already correlated with antioxidant support to nervous and musculoskeletal systems, followed by lutein, canthaxanthin, zeaxanthin, *α*- and *β*-cryptoxanthin. Phosphatidylcholine and polyunsaturated fatty acids predominated in shrimps’ muscle lipids, while monounsaturated fatty acids in cephalothorax. Palmitic, oleic and the essential eicosapentaenoic (C20:5ω-3) and docosahexaenoic (C22:6ω-3) acids were also present fulfilling the high nutritional profile of both shrimps. To the chapter 7, the concentrations of some hazardous elements as well as and the bioactive fatty acid profiles in the muscle and cephalothorax of *P. longirostris* (Mediterranean shrimp) and of *P. borealis* (northern shrimp) were comparatively studied. The deterimation of the elements was made by using ICPMS. Total As was detected at high levels in all tissues, mainly in the organic As form (by using HPLC-ICPMS). In the muscle tissues, inorganic As was below the limit of detection, while in the cephalothorax higher levels were found for both species. Noticeably, *P. borealis* contained much higher ($P<0.05$) levels of Cd than *P. longirostris*. Pb, Hg and Cd concentrations were found to be below the EU maximum levels in all tissues, with higher ($P<0.05$) concentrations in cephalothorax than in muscle. Moreover, all tissues were determined to contain high percentages of polyunsaturated fatty acids. Palmitic (C16:0), oleic (C18:1ω-9), eicosapentaenoic

(C20:5ω-3) and docosahexaenoic (C22:6ω-3) acids were the principal fatty acids in all tissues and significant differences were observed between the two species. The highest ω-3/ω-6 ratio and the lowest thrombogenic index were found in *P. borealis*. To the chapter 8, the main goal was to determin the elements Pb, Hg, Cd, tAs and Se in the tissues of *A. foliacea.* Moreover, a new group of lipids was studied refered as "arsenolipids". Finally, to the chapter 9, the essential metals Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Cr and Ni were determined as well as fatty acids of the total, neutral and polar lipids in *A. foliacea.* Concering the metals, the estimated daily intake per meal size (EDIm) was calculated, showing that in no case the muscle tissues could be considered as a full meal, while the cephalothorax tissues may provide high amounts of essential elements in human. Interesting were the results of Cu, which may create complexes with astaxanthin contributing to the tense red colour.

The significant differences observed between the species may be attributed to various factors such as geographical differences, bioavailability of elements and nutrients in seawater, sediments, seasonal effects, breeding conditions, molting, body size and development stage of shrimps. However, the results of the present thesis showed that the abovementioned shrimp species could be considered as suitable for human consumption and production of medicines and food supplements.

SUBJECT AREA: Functional lipid constituents and metals-metalloids in shrimps

KEYWORDS: shrimps, muscle, cephalothorax, lipids, fatty acids and carotenoids, metals and metalloids

Στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ……...7

ABSTRACT……..9

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ……19

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ……21

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ……23

ΠΡΟΛΟΓΟΣ……25

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: *Aristaeomorpha foliacea, Parapenaeus longirostris, Pandalus borealis*: γαρίδες……...….29

1.1 Εισαγωγή……....29

1.2 *Aristaemorpha foliacea* (Risso, 1827)……....31

1.3 *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846)……....33

1.4 *Pandalus borealis* (Krøyer, 1838)……...34

2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Λιπίδια……....37

2.1 Εισαγωγή……....37

2.2 Κατηγορίες λιπιδίων……..37

2.2.1 Ουδέτερα λιπίδια: λιπαρά οξέα, χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, καροτενοειδή……..38

2.2.2 Πολικά λιπίδια……..42

2.2.2.1 Φωσφολιπίδια……...42

2.2.2.1.1 Γλυκεροφωσφολιπίδια: φωσφατιδυλοχολίνη (PC), φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη(PE), φωσφατιδυλοσερίνη (PS), φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI)……42

2.2.2.1.2 Σφιγγολιπίδια: σφιγγομυελίνη (SM)……...45

2.3 Πρόσφατες μελέτες λιπιδίων στις γαρίδες….....…….....46

2.4 Λιπίδια και ανθρώπινη υγεία……48

2.5 Ανάλυση λιπιδίων……..……49

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μέταλλα και μεταλλοειδή……..53

3.1 Εισαγωγή……53

3.2 Ανόργανα συστατικά……53

3.3 Κατηγορίες ανόργανων συστατικών……...54

3.3.1 Φωσφόρος (P)……55

3.3.2 Μαγνήσιο (Mg)…….....55
3.3.3 Σίδηρος (Fe)…….56
3.3.4 Ψευδάργυρος (Zn)……..56
3.3.5 Μαγγάνιο (Mn)…….57
3.3.6 Χαλκός (Cu)……57
3.3.7 Σελήνιο (Se)…….....58
3.3.8 Χρώμιο (Cr)……..58
3.3.9 Νικέλιο (Ni)……...59
3.4 Τοξικά μέταλλα…….....59
3.4.1 Κάδμιο (Cd)…….....59
3.4.2 Μόλυβδος (Pb)…….....60
3.4.3 Υδράργυρος (Hg)…….....60
3.5 Πρόσφατες μελέτες μετάλλων και μεταλλοειδών στις γαρίδες……...61
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αρσενικό: Ένα ιδιαίτερο στοιχείο……..63
4.1 Εισαγωγή……63
4.2 Αρσενικό (As)……64
4.3 Δομές αρσενικού (iAs και org-As)……...64
4.3.1 Ανόργανο αρσενικό (iAs)……65
4.3.2 Οργανικό αρσενικό (org-As)……..65
4.3.2.1 Υδατοδιαλυτές ενώσεις org-As……...65
4.3.2.2 Λιποδιαλυτές ενώσεις org-As……66
4.4 Πρόσφατες μελέτες αρσενικού στις γαρίδες……..68
4.5 Αρσενικό και ανθρώπινη υγεία: Τοξικό ή όχι τελικά;……...69
4.6 Ανάλυση αρσενικού……..70
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Υλικά και μέθοδοι……..75
5.1 Δειγματοληψία……...75
5.2 Λυοφιλίωση……76
5.3 Προσδιορισμός υγρασίας……76
5.4 Προσδιορισμός τέφρας……76
5.5 Προσδιορισμός ολικού αζώτου-πρωτεϊνών με μέθοδο Kjeldahl……77
5.6 Προσδιορισμός μετάλλων και μεταλλοειδών……78
5.6.1 Προσδιορισμός Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Se, Cr, Ni, As, Pb, Hg και Cd με ICP-MS……..78

5.6.1.1 Περιγραφή και χρήση του ICP-MS……80
5.6.2 Προσδιορισμός ανόργανου αρσενικού (iAs) με HPLC-ICMPS……81
5.6.2.1 Περιγραφή και χρήση της HPLC-ICPMS……..……83
5.6.3 Προσδιορισμός Hg με CVAFS……..84
5.6.3.1 Περιγραφή και χρήση της CVAFS……85
5.7 Ανάλυση λιπιδίων ……86
5.7.1 Εκχύλιση λιπιδίων με Bligh-Dyer……..……86
5.7.2 Προσδιορισμός ολικού λίπους……87
5.7.3 Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου……...88
5.7.4 Προσδιορισμός λιπιδίων……...89
5.7.4.1 Μέθοδοι διαχωρισμού λιπιδίων……89
5.7.4.1.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC……90
5.7.4.1.1.1 Διαχωρισμός λιπιδίων με HPTLC……..90
5.7.4.1.1.2 Διαχωρισμός λιπιδίων με PLTC……..93
5.7.4.1.1.3 Διαχωρισμός λιπιδίων με Iatroscan TLC-FID……..94
5.7.4.1.1.3.1 Περιγραφή και χρήση του Iatroscan TLC-FID……96
5.7.4.1.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)……97
5.7.4.1.2.1 Περιγραφή και χρήση της SPE……99
5.7.5 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων με GC-FID……99
5.7.5.1 Περιγραφή και χρήση της GC-FID……103
5.7.6 Προσδιορισμός καροτενοειδών με HPLC-DAD……104
5.7.6.1 Περιγραφή και χρήση της HPLC-DAD……...105
5.7.7 Ανάλυση αρσενολιπιδίων με HPLC-ICPMS……106
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αξιολόγηση των βιοδραστικών λιπιδικών συστατικών των μυών και κεφαλοθωράκων των κόκκινων και ροζ γαρίδων (*A. foliacea* και *P. longirostris*)……..109
6.1 Εισαγωγή……..109
6.2 Πειραματική πορεία……111
6.2.1 Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια……111
6.2.2 Στάδια πειραματικής πορείας……..111
6.2.3 Στατιστική ανάλυση……...112
6.3 Αποτελέσματα……112
6.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά……..112

6.3.2 Προσδιορισμός υγρασίας, πρωτεϊνών, τέφρας και ολικού λίπους…113
6.3.3 Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου……116
6.3.4 Ποιοτικός προσδιορισμός των επιμέρους τάξεων των ολικών λιπιδίων με HPTLC σε ουδέτερο και πολικό σύστημα ανάπτυξης……117
6.3.5 Ποιοτικός προσδιορισμός των επιμέρους τάξεων των ολικών λιπιδίων με PTLC σε ουδέτερο και πολικό σύστημα ανάπτυξης. Απομόνωση της ζώνης των τριγλυκεριδίων και πολικών λιπιδίων……...121
6.3.6 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους τάξεων των ολικών λιπιδίων με TLC/FID (Iatroscan) σε ουδέτερο και πολικό σύστημα ανάπτυξης……123
6.3.7 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων του ολικού λίπους (TL) με χρήση GC-FID……128
6.3.8 Υπολογισμός διατροφικών δεικτών……135
6.3.9 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων (TG) με GC-FID……136
6.3.10 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των πολικών λιπιδίων (PL) με χρήση GC-FID……...140
6.3.11 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός καροτενοειδών στο ολικό λίπος……142
6.4 Συμπεράσματα……144
7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Προσδιορισμός Pb, Hg, Cd, As και λιπαρών οξέων *P. longirostris* (Μεσόγειος θάλασσα-Κυλλήνη) και *P. borealis* (Βόρεια θάλασσα- Skagerrak): Συγκριτική μελέτη των δυο ειδών……..147
7.1 Εισαγωγή……..147
7.2 Πειραματική πορεία……149
7.2.1 Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια……149
7.2.2 Στάδια πειραματικής πορείας……..150
7.2.3 Στατιστική ανάλυση……...150
7.3 Αποτελέσματα……151
7.3.1 Μελέτη των στοιχείων Pb, Cd, Hg και As…….....151
7.3.2 Εκτιμώμενη εβδομαδιαία πρόσληψη……155
7.3.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων του ολικού λίπους (TL) με χρήση GC-FID……..157
7.3.4 Υπολογισμός AI και TI……..……159

7.4 Συμπεράσματα……161
8. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Προσδιορισμός των στοιχείων Pb, Hg, Ad, As και Se στις γαρίδες *A. foliacea* (κόκκινες γαρίδες). Μελέτη των αρσενολιπιδίων με χρήση HPLC-ICPMS……163
8.1 Εισαγωγή……..163
8.2 Πειραματική πορεία……164
8.2.1 Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια……164
8.2.2 Στάδια πειραματικής πορείας……..165
8.2.3 Στατιστική ανάλυση……...165
8.3 Αποτελέσματα……165
8.3.1 Ανάλυση των στοιχείων Pb, Hg, Cd και Se……..165
8.3.2 Ανάλυση ολικού αρσενικού (tAs)……168
8.3.3 Προσδιορισμός αρσενολιπιδίων……168
8.3.3.1 Ανάλυση αρσενολιπιδίων……..170
8.3.4 Υπολογισμός εκτιμώμενης εβδομαδιαίας πρόσληψης……176
8.4 Συμπεράσματα……178
9. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Προσδιορισμός απαραίτητων μετάλλων και λιπαρών οξέων μυών και κεφαλοθωράκων των γαρίδων *A. foliacea*……181
9.1 Εισαγωγή……..181
9.2 Πειραματική πορεία……182
9.2.1 Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια……182
9.2.2 Στάδια πειραματικής πορείας……..182
9.2.3 Στατιστική ανάλυση……...183
9.3 Αποτελέσματα……183
9.3.1 Προσδιορισμός μετάλλων και ημερήσια πρόσληψη……183
9.3.2 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων TL, NL και PL……186
9.4 Συμπεράσματα……190
10. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: Γενικά συμπεράσματα……193
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ……197
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ……203
ΑΝΑΦΟΡΕΣ……207

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 2-1: Περιγραφική πορεία ανάλυσης λιπιδίων……..51

Σχήμα 4-1: Αναπαράσταση του κύκλου του As στους οργανισμούς και πιθανοί μηχανισμοί παραγωγής αρσενολιπιδίων……68

Σχήμα 4-2: Ανάλυση As και των δομών του……71

Σχήμα 6-1: Πειραματική πορεία ανάλυσης λιπιδίων των γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris*……110

Σχήμα 7-1: Πειραματική πορεία ανάλυσης των γαρίδων *P. longirostris* (γαρίδες Μεσογείου) και *P. borealis* (γαρίδες Βόρειας θάλασσας)……149

Σχήμα 7-2: Χρωματογράφημα (με μεγένθυνση) από HPLC-ICPMS ανάλυση, των ενώσεων As σε δείγμα κεφαλοθωράκων *P. borealis*……..……..154

Σχήμα 7-3: Χρωματογράφημα (με μεγένθυνση) από HPLC-ICPMS ανάλυση, των ενώσεων As σε δείγμα μυών *P. borealis* ……..……..155

Σχήμα 7-4: GC-FID χρωματογράφημα λιπαρών οξέων κεφαλοθωράκων *P. longirostris* (μεσογειακές γαρίδες)……161

Σχήμα 8-1: Πειραματική πορεία προσδριορισμών στοιχείων και αρσενολιπιδίων γαρίδων *A. foliacea*…….....164

Σχήμα 8-2: Χρωματογράφημα έκλουσης του Ph_3AsO (std) στα 15 min. με χρήση στήλης waters acquity……...171

Σχήμα 8-3: Χρωματογράφημα με τους χρόνους έκλουσης των AB, TMAO, DMA και MMA……..172

Σχήμα 8-4: Χρωματογράφημα (με μεγένθυνση) από HPLC-ICPMS ανάλυση αρσενολιπιδίων στο λίπος των μυών των *A. foliacea* με χρήση waters acquity……..……173

Σχήμα 8-5: Χρωματογράφημα (με μεγένθυνση) από HPLC-ICPMS ανάλυση αρσενολιπιδίων στο λίπος των κεφαλοθωράκων των *A. foliacea* με χρήση waters acquity...174

Σχήμα 8-6: Σύγκριση των κορυφών των στοιχείων As (ιόν 75) και P (ιόν 31) των μυών *A. foliacea*…….……..174

Σχήμα 8-7: Σύγκριση των κορυφών των στοιχείων As (ιόν 75) και P (ιόν 31) των κεφαλοθωράκων *A. foliacea*……...……...175

Σχήμα 8-8: Σύγκριση των κορυφών του χρωματογραφήματος αρσενολιπιδίων των κεφαλοθωράκων με κορυφές ιχθυελαίου και διαλύματος Ph_3AsO……176

Σχήμα 9-1: Πειραματική πορεία ανάλυσης γαρίδων *A. foliacea*……...182

Σχήμα 9-2: Επί τοις % συνεισφορά μυών και κεφαλοθωράκων των κόκκινων γαρίδων στην ημερήσια πρόσληψη σε Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, Ni και Cr……..185
Σχήμα 9-3: Επί τοις % σύσταση των κυριότερων λιπαρών οξέων ολικού λίπους των ιστών των γαρίδων *A. foliacea*……..188

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1-1: Μορφολογία γαρίδας……..30
Εικόνα 1-2: *Aristaeomorpha foliacea*……31
Εικόνα 1-3: *Parapenaeus longirostris*……33
Εικόνα 1-4: *Pandalus borealis*……...34
Εικόνα 2-1: Κατηγορίες λιπιδίων (ουδέτερα και πολικά λιπίδια)……38
Εικόνα 2-2: Δομή χοληστερόλης……...40
Εικόνα 2-3: Δομή τριγλυκεριδίων……...41
Εικόνα 2-4: Δομές γλυκεροφωσφολιπιδίων……43
Εικόνα 2-5: Γενική δομή σφιγγολιπιδίων……..45
Εικόνα 2-6: Παραδείγματα σφιγγολιπιδίων……..45
Εικόνα 5-1: Φασματοφωτόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS)…….....80
Εικόνα 5-2: Συνδεσμολογία HPLC-ICPMS……...83
Εικόνα 5-3: Οργανολογία για τον προσδιορισμό του Hg……85
Εικόνα 5-4: Σύνολο της διάταξης εκρόφησης του υδραργύρου από τις παγίδες και τελικής μέτρησης στον φθορισμομετρικό ανιχνευτή……..86
Εικόνα 5-5: Διάταξη των δύο παγίδων, δείγματος και αναλυτικής……86
Εικόνα 5-6: Iatroscan MK-6 (TLC/FID-FPD Analyser)……97
Εικόνα 5-7: Τοποθέτηση δείγματος στα Chromarods……97
Εικόνα 5-8: Καύση των Chromarods με φλόγα υδρογόνου……97
Εικόνα 5-9: Εκχύλιση ουδετέρων λιπιδίων με SPE……98
Εικόνα 5-10: Εκχύλιση πολικών λιπιδίων με SPE……99
Εικόνα 5-11: Σχηματισμός διφασικού συστήματος των λιπαρών οξέων για εξισορρόπηση των φάσεων……...102
Εικόνα 5-12: Αεριοχρωματογράφος (GC-FID)……...……...104
Εικόνα 5-13: Αυτόματος δειγματολήπτης……...104
Εικόνα 5-14: Συνδεσμολογία HPLC-DAD……..105
Εικόνα 5-15: Διφασικό σύστημα για μελέτη αρσενολιπιδίων……...107
Εικόνα 6-1: Χρωματογράφημα των επιμέρους τάξεων ολικού λίπους των γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα σε ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης……118
Εικόνα 6-2: Χρωματογράφημα των επιμέρους τάξεων ολικού λίπους των γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα σε πολικό σύστημα ανάπτυξης……..119

Εικόνα 6-3: Χρωματογράφημα εμφάνισης φωσφο(νο)λιπιδίων ολικών λιπιδίων των γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα σε πολικό σύστημα ανάπτυξης με αντιδραστήριο Dittmer-Lester……120
Εικόνα 6-4: Χρωματογράφημα εμφάνισης αμινομάδων ολικών λιπιδίων των γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα σε πολικό σύστημα ανάπτυξης με αντιδραστήριο νινυδρίνης……...120
Εικόνα 6-5: Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας ολικού λίπους των κεφαλοθωράκων κόκκινων γαρίδων σε ουδέτερο σύστημα……..121
Εικόνα 6-6: Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας ολικού λίπους των μυών κόκκινων γαρίδων σε πολικό σύστημα……...122
Εικόνα 7-1: Σημεία δειγματοληψίας γαρίδων *P. longirostris* και *P. borealis*……...147

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 4-1: Κατανομή των χημικών ενώσεων As στα διάφορα θαλάσσια διαμερίσματα……..65

Πίνακας 4-2: Υδατοδιαλυτές ενώσεις οργανικού αρσενικού……...66

Πίνακας 4-3: Λιποδιαλυτές ενώσεις αρσενικού……67

Πίνακας 6-1: Μέσος όρος μήκους των γαρίδων, ολικού βάρους και επιμέρους βάρους ιστών (μύες-κεφαλοθώρακες)…….....112

Πίνακας 6-2: Ποσοστά υγρασίας, τέφρας, πρωτεϊνών και ολικού λίπους σε νωπό ιστό (ww) μυών και κεφαλοθωράκων κόκκινων και ροζ γαρίδων……..113

Πίνακας 6-3: Ποσοστό φωσφολιπιδίων των ολικών λιπιδίων και συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων σε mg ανά 100 g νωπού ιστού (ww)……..116

Πίνακας 6-4: Επιμέρους τάξεις ουδετέρων και πολικών λιπιδίων (% w/w) ολικού λίπους μυών και κεφαλοθωράκων των δύο ειδών γαρίδων……...123

Πίνακας 6-5: Σύστημα επιμέρους ουδετέρων και πολικών λιπιδίων σε mg/100 g νωπού ιστού……126

Πίνακας 6-6: Σύσταση λιπαρών οξέων % των ολικών λιπιδίων (%TL) με GC-FID…129

Πίνακας 6-7: Δείκτες αθηρογένεσης (AI), θρομβογένεσης (TI), υποχοληστερολαιμικών-υπερχοληστερολαιμικών λιπαρών οξέων (h/H), χοληστερόλης (CI) και χοληστερόλης-κορεσμένων λιπαρών οξέων (CSI) ολικού λίπους των μυών και κεφαλοθωράκων των *A. foliacea* και *P. longirostris*……136

Πίνακας 6-8: Σύσταση % λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων (TG) των μυών και κεφαλοθωράκων των *A. foliacea* και *P. longirostris* με GC-FID……137

Πίνακας 6-9: Σύσταση λιπαρών οξέων % των ολικών πολικών λιπιδίων με GC-FID……140

Πίνακας 6-10: Σύσταση επιμέρους καροτενοειδών % των ολικών καροτενοειδών με HPLC-DAD…….....143

Πίνακας 7-1: Συγκέντρωση (mg/kg νωπού ιστού) Pb, Hg, Cd, iAs και tAsστους μύες και κεφαλοθώρακες των *P. longirostris* και *P. borealis*…….....154

Πίνακας 7-2: Εκτιμώμενη εβδομαδιαία πρόσληψη ανά γεύμα (Estimated Weekly Intake per meal size, EWIm) ενηλίκων συγκρινόμενη με τη δυνητικά επιτρεπτή έκθεση…….....156

Πίνακας 7-3: Προφίλ λιπαρών οξέων (%) και διατροφικοί δείκτες μυών και κεφαλοθωράκων ολικού λίπους των *P. longirostris* και *P. borealis*……160

Πίνακας 8-1: Συγκέντρωση (mg/kg νωπού ιστού) στοιχείων σε μύες και κεφαλοθώρακες των *A. foliacea*……166
Πίνακας 8-2: Συγκέντρωση ολικού αρσενικού (tAs), αρσενολιπιδίων και υδατοδιαλυτών ενώσεων σε μύες και κεφαλοθώρακες των *A. foliacea*……169
Πίνακας 8-3: Οι τιμές εκτιμώμενης εβδομαδιαίας πρόσληψης ανά γεύμα (EWIm) για τον Pb, Cd, Hg και tAs και η τιμή εκτιμώμενης ημερήσιας πρόσληψης ανά γεύμα (EDIm) για το Se……..178
Πίνακας 9-1: Συγκέντρωση (mg/kg ww) απαραίτητων μετάλλων σε μύες και κεφαλοθώρακες των *A. foliacea*……...184
Πίνακας 9-2: Οι τιμές εκτιμώμενης ημερήσιας πρόσληψης ανά γεύμα (EDIm) για το Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, Ni και Cr……..185
Πίνακας 9-3: Σύσταση % των λιπαρών οξέων των TL, NL και PL μυών και κεφαλοθωράκων των *A. foliacea* με GC-FID……187
Πίνακας 9-4: Τα σύνολα των λιπαρών οξέων, τα ω-3 και ω-6 σε επί τοις % και οι διατροφικοί δείκτες (ω-3/ω-6, AI και TI) των TL, NL και PL μυών και κεφαλοθωράκων των *A. foliacea*…….....189

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε το 2010 στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) σε συνεργασία με το Εργαστήριο Χημείας, Ανάλυσης και Σχεδιασμού Διεργασιών Επεξεργασίας Τροφίμων - Ενόργανης Ανάλυσης Τροφίμων του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του ΤΕΙ Αθήνας, με το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας (ΕΚΠΑ) και με το Εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος (ΕΚΠΑ). Συνεργάστηκα επίσης με το Εθνικό Ινστιτούτο Τροφίμων (National Food Institute), συγκεκριμένα με το Research Group for Nano-Bio Science και το Research Group for Bioactives – Analysis and Application του Technical University of Denmark (DTU).

Η παρούσα εργασία αρχικά μου ανατέθηκε από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του ΕΚΠΑ, κ. Σ. Μηνιάδου, την οποία οφείλω να ευχαριστήσω θερμά. Ευχαριστώ επίσης θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του ΕΚΠΑ κ. Π. Μαρκάκη, η οποία στη συνέχεια ανέλαβε την επίβλεψη της εργασίας μου και με την καθοδήγηση, τη συμπαράσταση και τις συμβουλές της, ολοκληρώθηκε επιτυχώς η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Κωμαΐτη, Ομότιμο Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και μέλους της τριμελούς και επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την άριστη συνεργασία μας και τις σημαντικές παρεμβάσεις του στην εκπόνηση της διδακτορικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κ. Β.Ι. Σινάνογλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ Αθήνας και τρίτο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, η οποία στάθηκε σημαντικός και καταλυτικός σύμβουλος και συνεργάτης στην ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Τις ευχαριστίες μου θέλω επίσης να εκφράσω στους καθηγητές της Δανίας J.J Sloth και C. Jacobsen, στην Dr. V. Sele καθώς επίσης και στους βοηθούς εργαστηρίων B. K. Herbst και T.T Trang Vu, οι οποίοι με βοήθησαν να ολοκληρώσω ένα μεγάλο μέρος της διατριβής μου στα εργαστήριά τους.

Ευχαριστώ θερμά για τη συνεργασία μας την κ. Ε. Σταθοπούλου, Ειδικό Διδακτικό Προσωπικό του Εργαστηρίου Χημείας Περιβάλλοντος του ΕΚΠΑ. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κ. Καπίρη, Ερευνητή Α΄ στο Ινστιτούτο Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων και Εσωτερικών Υδάτων του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών

(ΕΛΚΕΘΕ) και μέλους της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για την πολύτιμη βοήθειά του.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον κ. Α. Καλοκαιρινό, Καθηγητή, τον κ. Ν. Θωμαΐδη, Αναπληρωτή Καθηγητή και τον κ. Χ. Προεστό, Επίκουρο Καθηγητή, του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική υποστήριξη που μου προσέφεραν και κυρίως τη συμπαράσταση των γονιών μου καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

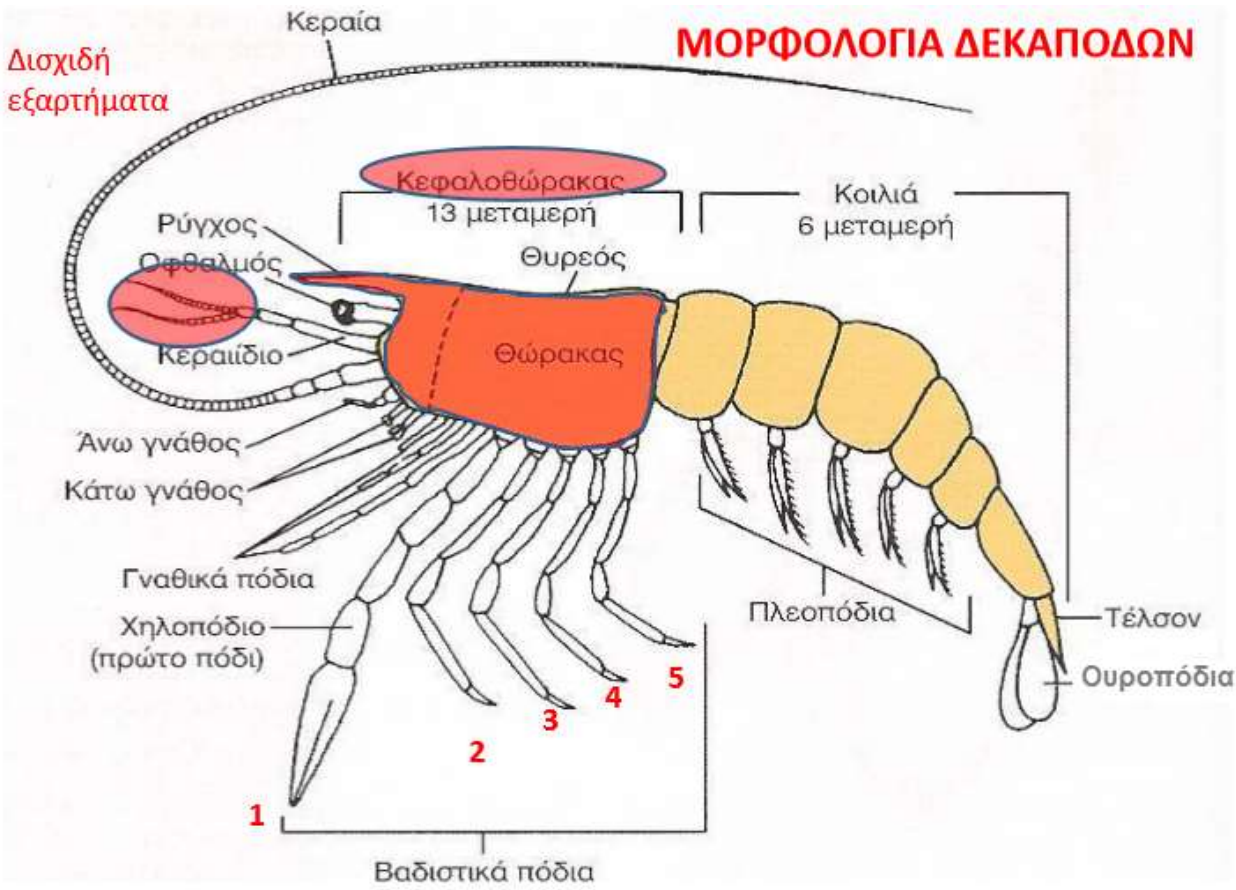
ARISTAEOMORPHA FOLIACEA, PARAPENAEUS LONGIROSTRIS, PANDALUS BOREALIS: ΓΑΡΙΔΕΣ

1.1 Εισαγωγή

Ταξινομικά οι γαρίδες (Φύλο: Αρθρόποδα, Υπόφυλο: Καρκινοειδή, Ομοταξία: Μαλακόστρακα) ανήκουν στη Τάξη των Δεκαπόδων και είναι ευρέως διαδεδομένες σε παγόσμιο επίπεδο. Τα βάθη και τα οικοσυστήματα στα οποία εντοπίζονται οι γαρίδες, ποικίλουν ανάλογα με το είδος τους (ρηχών ή βαθέων υδάτων) και τις βιολογικές τους ανάγκες. Συνήθως ζουν από 1 έως 7 χρόνια. Είναι μοναχικά είδη, με εξαίρεση την περίοδο της σύζευξης κατά την οποία δημιουργούν μεγάλες ομάδες [1].

Ως θαλάσσιοι οργανισμοί διαθέτουν όλα τα βιολογικά συστήματα: αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αναπαραγωγικό, μυϊκό, πεπτικό, απεκκριτικό και νευρικό. Οι γαρίδες παρουσιάζουν έντονο φυλετικό διμορφισμό, εκτός από ορισμένες εξαιρέσεις που παρουσιάζουν ερμαφροδιτισμό, όπως η *Pandalus borealis*. Η διηθηματοφαγία, ο παρασιτισμός, η σαπροφαγία, η σαρκοφαγία ή ακόμα και ο κανιβαλισμός αποτελούν τρόπους διατροφής τους. Γενικώς, τα είδη αυτά θεωρούνται ενεργητικοί θηρευτές. Αποφεύγουν να γίνονται θήραμα με την ταχεία διαφυγή τους (την εκτίναξη του σώματός τους προς τα πίσω συμπιέζοντας απότομα την κοιλιά και ωθώντας το νερό με τα ουροπόδια) [1].

Το σώμα τους χωρίζεται σε δύο βασικά τμήματα: τον κεφαλοθώρακα και την κοιλία, τα οποία περιβάλλονται από εξωσκελετό χιτίνης, πλούσιο σε άλατα ασβεστίου. Ο κεφαλοθώρακας επικαλύπτεται πλευρικά και νωτιαία από ένα συμπαγές κάλυμμα, το θυρεό. Στο μπροστινό τμήμα του θυρεού σχηματίζεται το ρύγχος. Ο κεφαλοθώρακας εκτός από τους οφθαλμούς οι οποίοι είναι έμμισχοι και σύνθετοι (πολλά ομματίδια), διαθέτει 5 κεφαλικούς και 8 θωρακικούς σωμίτες, συντηγμένους μεταξύ τους. Οι κεφαλικοί σωμίτες συμπεριλαμβάνουν: 1 ζεύγος κεραϊδίων, 1 ζεύγος κεραιών, 1 ζεύγος άνω γνάθων και 2 ζεύγη κάτω γνάθων. Οι θωρακικοί σωμίτες αποτελούνται από 3 ζεύγη γναθικών ποδιών και 5 ζεύγη βαδιστικών ποδιών. Το στόμα βρίσκεται στην πρόσθια κοιλιακή χώρα του κεφαλοθώρακα. Τα βράγχια είναι τα όργανα για την αναπνοή, τα οποία εντοπίζονται εσωτερικά και πλευρικά του θυρεού (εικόνα 1-1) [1].



Εικόνα 1-1:Μορφολογία γαρίδας [1]

Η κοιλία αποτελείται από 6 σωμίτες και περιλαμβάνει 5 ζεύγη πλεοποδίων και 1 ζεύγος ουροποδίων, ακολουθεί το ουραίο μέρος που περιλαμβάνει το τέλσον. Κάθε σωμίτης φέρει το νώτο (ραχιαία), τους πλευρίτες (πλευρικά) και το στέρνο (κοιλιακά). Στα θηλυκά το 1^{ο} ζεύγος πλεοποδίων είναι ατροφικό, ενώ στα αρσενικά το 1^{ο} και το 2^{ο} είναι όργανα σύζευξης (εικόνα 1-1) [1].

Η σωματική αύξηση των γαρίδων επιτυγχάνεται με την έκδυση (αποβολή παλαιού εξωσκελετού), γεγονός που αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα στάδια αύξησης [1-6]. Στα νεαρά άτομα παρατηρείται αλλαγή του εξωσκελετού τους σχεδόν κάθε μέρα, ενώ στα πιο ώριμα σχεδόν κάθε δυο εβδομάδες για έναν χρόνο. Κατά την έκδυση το χρώμα των γαρίδων γίνεται υπόλευκο. Η έκδυση ξεκινάει από το κεφάλι και σταδιακά προχωράει σε όλο το σώμα. Σε αυτό το στάδιο οι γαρίδες χρειάζονται μικρό διάστημα για να συνέλθουν και έπειτα αρχίζουν να κινούνται φυσιολογικά. Η διαδικασία της έκδυσης γίνεται συνήθως στα ρηχότερα στρώματα του πυθμένα [4].

Η διαδικασία της έκδυσης των γαρίδων θεωρείται ιδιαιτέρως σημαντική, διότι επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, χρωστικών, μετάλλων

και την κατανομή αυτών μεταξύ των μαλακών ιστών και του νέου εξωσκελετού [2-6]. Ο εξωσκελετός των γαρίδων μπορεί να απομονώσει μέταλλα όπως ασβέστιο και φωσφόρο και να συμβάλλει στην αποβολή τους μέσω της έκδυσης [3,5,6].

Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν τρία είδη γαρίδων: η *Aristaemorpha foliacea* (εικόνα 1-2), η *Parapenaeus longirostris* (εικόνα 1-3) και η *Pandalus borealis* (εικόνα 1-4). Τα πρώτα δύο είδη αλιεύτηκαν από την ευρύτερη περιοχή της Κυλλήνης (Ελλάδα, Μεσόγειος θάλασσα), ενώ το τρίτο είδος αλιεύτηκε από την περιοχή Skagerrak (Δανία, Βόρεια θάλασσα). Τα συγκεκριμένα είδη επιλέχθηκαν να μελετηθούν ως προς τη σύσταση των λιπιδίων και των μετάλλων/μεταλλοειδών τους, λόγω της μεγάλης εμπορικής τους αξίας και της ευρείας κατανάλωσής τους στις τοπικές αγορές. Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η διατροφική τους αξία για την ισορροπία και υγεία του ανθρώπινου οργανισμού.

1.2 *Aristaemorpha foliacea* (Risso, 1827)

Η *A. foliacea* είναι γνωστή ως γιγαντιαία κόκκινη γαρίδα (giant red shrimp) [7]. Η ταξινομική θέση του μεσογειακού αυτού είδους, παρατίθεται παρακάτω:

Φύλο: Αρθρόποδα

Υπόφυλο: Καρκινοειδή (Brűnnich, 1772)

Ομοταξία: Μαλακόστρακα (Latreille, 1806)

Τάξη: Δεκάποδα (Latreille, 1802)

Υπόταξη: Δενδροβραγχιωτά (Bate, 1888)

Υπεροικογένεια: Penaeoidea (Rafinesque, 1815)

Οικογένεια: Aristeidae (Wood-Mason, 1891)

Εικόνα 1-2: *Aristaemorpha foliacea*

Είδος: *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) (γιγαντιαία κόκκινη γαρίδα)

Κατανομή

Απαντάται συνήθως στη Μεσόγειο θάλασσα, στον Α. Ατλαντικό ωκεανό (Μαρόκο, ΝΔ. Σαχάρα, Πορτογαλία), στο Δ. Ατλαντικό (από Βενεζουέλα μέχρι Μασαχουσέτη), στη Ν. Αφρική, στον Ινδικό ωκεανό και Δ. Ειρηνικό ωκεανό [8]. Στα ελληνικά ύδατα απαντάται κυρίως στις περιοχές του Ιονίου Πελάγους, των Σποράδων, των Κυκλάδων, του Κορινθιακού και Ευβοϊκού κόλπου, στη Β. Κρήτη και στα Δωδεκάνησα [9]. Επειδή αυτό

το είδος προτιμά περιοχές με υψηλή αλατότητα και θερμοκρασία, καθιστά τα ελληνικά ύδατα κατάλληλα για την ανάπτυξη του [9,10] .

Περιγραφή

Το χρώμα της *A. foliacea* είναι κόκκινο σκούρο με σκούρες βιολετί αντανακλάσεις στο πάνω μέρος του κεφαλοθώρακα. Το ρύχγος της φέρει 5-9 δόντια και είναι βραχύτερο στα αρσενικά. Το είδος αυτό παρουσιάζει έντονο φυλετικό διμορφισμό. Τα θηλυκά έχουν μεγαλύτερο μήκος κεφαλοθώρακα και είναι βαρύτερα [11].

Βιολογία

Η αναλογία των φύλων στην *A. foliacea* στις διάφορες περιοχές της Μεσογείου είναι περίπου 1:1 ή ελαφρώς υπέρ των θηλυκών [12], ενώ στο Ιόνιο Πέλαγος επικρατούν τα αρσενικά κυρίως στα τέλη φθινοπώρου και κατά τον χειμώνα [13]. Σχετικά με την ηλικία των θηλυκών ατόμων που έχουν αλιευθεί στο Ιόνιο Πέλαγος έχουν υπολογιστεί ότι υπάρχουν 2-4 γενεές, ενώ για τα αρσενικά 1-3 γενεές [13]. Για τις θηλυκές γαρίδες στη Μεσόγειο, μέγιστο ολικό μήκος σώματος που έχει μετρηθεί είναι τα 225 mm, ενώ για τις αρσενικές τα 170 mm [8]. Στο Ιόνιο Πέλαγος, έχουν βρεθεί κεφαλοθώρακες με μέγιστο μέγεθος μήκους 62 mm στα θηλυκά και 44 mm στα αρσενικά άτομα [13].

Έχει παρατηρηθεί ότι οι *A. foliacea* καταναλώνουν περισσότερη τροφή το χειμώνα έναντι των άλλων εποχών, πιθανόν γιατί τείνουν να αποθηκεύουν ενέργεια για την ωρίμανση των γονάδων κατά τη διάρκεια της άνοιξης και για την απελευθέρωση των αυγών που λαμβάνει χώρα το καλοκαίρι. Το χειμώνα εξάλλου γίνεται η σύζευξη των δύο φύλων. Το καλοκαίρι και το φθινόπωρο παρουσιάζουν μειωμένη τροφική δραστηριότητα, διότι οι γονάδες καταλαμβάνουν τον μεγαλύτερο όγκο της θωρακικής τους κοιλότητας [11].

Οι *A. foliacea* συνήθως εντοπίζονται σε βάθη από 150 έως 1300 m, με ιδανικό βάθος τα 500-800 m. Κατά τη διάρκεια της νύχτας για λόγους διατροφής παρουσιάζουν ανοδικές κινήσεις και ανέρχονται μέχρι τα 150 m [14]. Το χειμώνα παρουσιάζουν μια μεταναστευτική τάση προς τα ρηχότερα στρώματα της θάλασσας, ενώ στα τέλη καλοκαιριού και μετά την αναπαραγωγική περίοδο μετακινούνται σε βαθύτερα στρώματα [13]. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των γονάδων τους προτιμούν περισσότερο τα μεγαλύτερα βάθη (≥500 m). Η εύρεση τροφής, οι διαφορετικές υδρολογικές μάζες, το υπόστρωμα του πυθμένα και η αναπαραγωγική τους

δραστηριότητα αποτελούν βασικές αιτίες για τις ημερήσιες και εποχιακές μετακινήσεις τους [11].

Συχνά το είδος αυτό συγχέεται με ένα άλλο είδος παρόμοιου μεγέθους, την *Aristeus antennatus* (μωβ-κόκκινη γαρίδα βαθέων υδάτων). Οι *A. antennatus* ανήκουν και αυτές στην οικογένεια Aristeidae [15-17]. Έχουν ένα ελαφρώς κόκκινο, μαργαριταρώδες ροζ χρώμα, με βιολετί αποχρώσεις στην επιφάνεια του κεφαλοθώρακα και στις αρθρώσεις των κοιλιακών τμημάτων. Το σώμα τους είναι λείο με μαλακό θυρεό και το ρύγχος τους φέρει 3 δόντια [11].

1.3 *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846)

Οι γαρίδες *P. longirostris* είναι γνωστές ως ροζ γαρίδες βαθέων υδάτων (deep water rose shrimp) [7]. Η ταξινομική του συγκεκριμένου είδους είναι η εξής:

Φύλο: Αρθρόποδα

Υπόφυλο: Καρκινοειδή (Brűnnich, 1772)

Ομοταξία: Μαλακόστρακα (Latreille, 1806)

Τάξη: Δεκάποδα (Latreille, 1802)

Υπόταξη: Δενδροβραγχιωτά (Bate, 1888

Υπεροικογένεια: Penaeoidea (Rafinesque, 1815)

Οικογένεια: Penaeidae (Rafinesque-Schmaltz,1815)

Εικόνα 1-3: *Parapenaeus longirostris*

Είδος: *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846), (ροζ γαρίδα βαθέων υδάτων)

Κατανομή

Απαντάται στη Μεσόγειο και στον Ατλαντικό. Στον Α. Ατλαντικό από την Πορτογαλία μέχρι την Αγκόλα και στον Δ. Ατλαντικό από τη Μασαχουσέτη μέχρι τη Γουινέα. Βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία κυρίως στο Κεντρικό Τυρρηνικό πέλαγος, στο στενό της Σικελίας και του Ιονίου. Στη Μεσόγειο εντοπίζονται κυρίως σε βάθη 20-750 m με ιδανικό βάθος τα 100-400m. Στην Αδριατική θάλασσα μετακινούνται κυρίως στα 150-400 m. Οι ώριμες γαρίδες προτιμούν τα μεγαλύτερα βάθη [18-20]. Στην Ελλάδα είναι το σημαντικότερο καρκινοειδές είδος από πλευράς βάρους αλιεύματος, αλιευτικών εκφορτώσεων και εμπορικής αξίας και απαντάται σε αφθονία στο Αιγαίο και το Ιόνιο Πέλαγος [21].

Περιγραφή

Το χρώμα τους είναι ροζ-πορτοκαλί. Οι γονάδες των θηλυκών μπορεί να αποκτήσουν από άσπρο έως σκούρο πράσινο χρώμα ανάλογα με το στάδιο της ωρίμανσης [22]. Το ρύγχος τους περιλαμβάνει 3 μυτερά δόντια [18].

Βιολογία

Το είδος αυτό παρουσιάζει επίσης φυλετικό διμορφισμό. Τα θηλυκά είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από τα αρσενικά. Στα θηλυκά το μέγεθος του κεφαλοθώρακα κυμαίνεται από 160 έως 186 mm, ενώ στα αρσενικά από 140 έως 160 mm. Τα θηλυκά άτομα είναι συνήθως περισσότερα σε πληθυσμό από τα αρσενικά, ενώ στους πληθυσμούς του Ιονίου υπάρχει ίση παρουσία αρσενικών και θηλυκών (1:1). Η ωρίμανση του είδους παρατηρείται από τον πρώτο χρόνο ζωής. Έχει υπολογιστεί ότι η διάρκεια ζωής του συγκεκριμένου είδους είναι 3-4 έτη. Τα αρσενικά αναπτύσσονται πιο αργά από ότι τα θηλυκά [23].

1.4 *Pandalus borealis* (Krøyer, 1838)

Η *P. borealis* είναι γνωστή ως γαριδάκι της Αρκτικής (northern shrimp) [7]

Η ταξινομική του συγκεκριμένου είδους παρατίθεται παρακάτω:

Φύλο: Αρθρόποδα

Υπόφυλο: Καρκινοειδή (Brűnnich, 1772)

Ομοταξία: Μαλακόστρακα (Latreille, 1806)

Τάξη: Δεκάποδα (Latreille, 1802)

Υπόταξη: Pleocyemata (Burkenroad, 1963)

Υπεροικογένεια: Caridea (Dana, 1852)

Οικογένεια: Pandalidae (Haworth, 1825)

Εικόνα 1-4: *Pandalus borealis*

Είδος: *Pandalus borealis* (Krøyer, 1838) (γαριδάκι της Αρκτικής)

Κατανομή

Οι γαρίδες αυτές εντοπίζονται στον Β. Ατλαντικό (από το νησί Spitsbergen και τη Γροιλανδία μέχρι τη Μασσαχουσέτη) και στον Β. Ειρηνικό ωκεανό (από τη Bering θάλασσα μέχρι Ν.Α. Σιβηρία και από την Ιαπωνία μέχρι το Όρεγκον). Ζουν σε ψυχρά

κλίματα όπου η θερμοκρασία των υδάτων κυμαίνεται από 0 έως 8°C. Κινούνται σε βάθη 20-1330 m [24].

Περιγραφή

Το χρώμα τους είναι λαμπερό ροζ-κόκκινο και το σώμα τους είναι λεπτό με λεία επιφάνεια. Λόγω του λεπτού κελύφους τους, η μετακίνησή τους γίνεται πιο δύσκολη σε σύγκριση με άλλα είδη γαρίδων. Το ρύγχος τους διαθέτει 12-16 δόντια [24].

Βιολογία

Οι *P. borealis* έχουν διάρκεια ζωής έως 8 έτη. Το είδος αυτό είναι ερμαφρόδιτο. Μέχρι τα δύο πρώτα χρόνια είναι αρσενικές και στη συνέχεια οι όρχεις μετατρέπονται σε γονάδες και το είδος παραμένει θηλυκό μέχρι το θάνατό του. Η ωοτοκία αρχίζει από τον τρίτο χειμώνα και στη συνέχεια η εκκόλαψη πραγματοποιείται την άνοιξη. Το μέγιστο μέγεθος των γαρίδων ως αρσενικό άτομο είναι 120 mm, ενώ ως θηλυκό 165 mm [25]. Στη Δ. Γροιλανδία έχει παρατηρηθεί να ζουν μέχρι τα 6 έτη ως αρσενικά και στη συνέχεια να μετατρέπονται σε θηλυκά παρουσιάζοντας περαιτέρω διάρκεια ζωής έως και 8 χρόνια [25].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΛΙΠΙΔΙΑ

2.1 Εισαγωγή

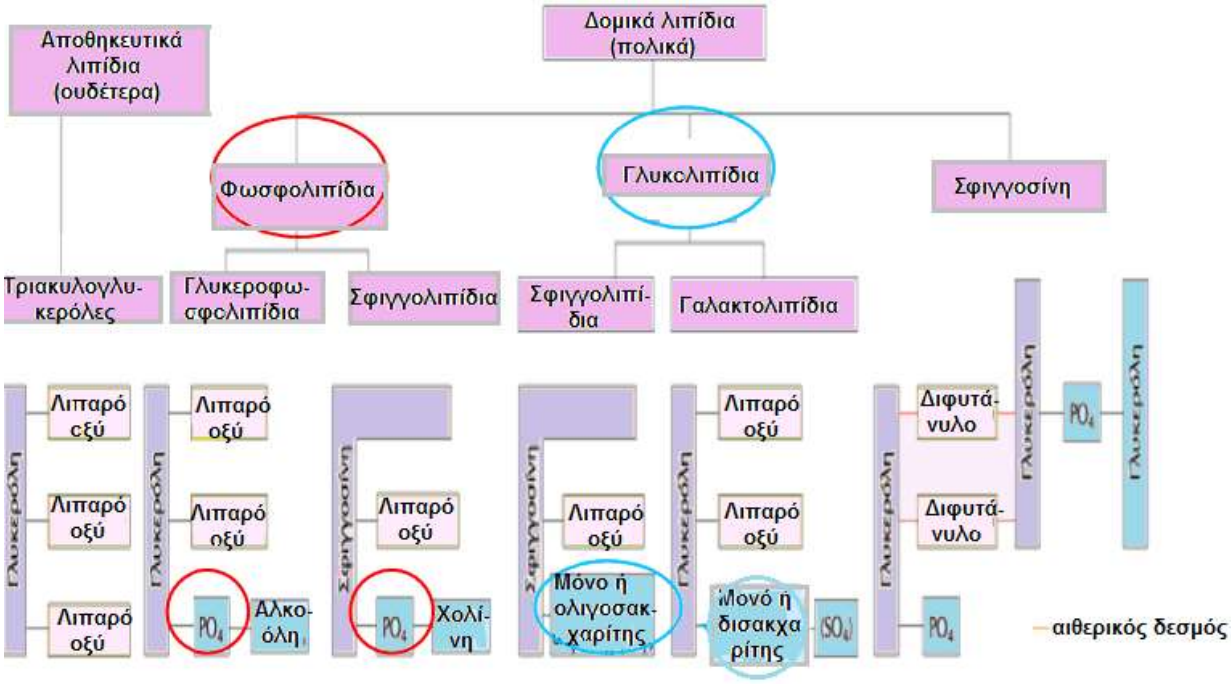
Με τον όρο “λιπίδια” χαρακτηρίζουμε τις ενώσεις που είναι αδιάλυτες στο νερό και διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες [26,27]. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στις ομάδες υδρογονανθράκων μακριάς αλυσίδας των λιπιδίων, οι οποίες δεν σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Τα λιπίδια προσδιορίζονται με βάση αυτή τους την ιδιότητα και όχι με βάση τη χημική τους δομή και διακρίνονται σε ουδέτερα και πολικά.

Στα λιπίδια ανήκουν πλήθος απλών ενώσεων όπως υδρογονάνθρακες μακριάς αλυσίδας, αλκοόλες, αλδεΰδες, λιπαρά οξέα και σύνθετων ενώσεων όπως εστέρες, φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια και σουλφολιπίδια. Επίσης περιλαμβάνονται ουσίες όπως οι λιποδιαλυτές βιταμίνες A, D, E και K, τα καροτενοειδή, οι στερόλες και οι εστέρες στερολών, οι οποίες είναι συνήθως συνδεδεμένες σε κυτταρικές μεμβράνες και παραλαμβάνονται μαζί με τα φωσφολιπίδια και τα ουδέτερα λιπίδια, κατά την εκχύλιση ιστών με κατάλληλο σύστημα διαλυτών [27,28].

Τα λιπίδια παίζουν πολλαπλό ρόλο στους ζωντανούς οργανισμούς καθώς αποτελούν δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, συνιστούν την κύρια μορφή αποθήκευσης και μεταφοράς ενέργειας στον οργανισμό, δρουν ως προστατευτικός μανδύας στην επιφάνεια πολλών οργάνων και αποτελούν πρόδρομες ενώσεις πολλών σημαντικών βιολογικών μορίων, όπως στεροειδών ορμονών, βιταμίνης D και εικοσανοειδών [26-29].

2.2 Κατηγορίες λιπιδίων

Τα λιπίδια χωρίζονται σε ουδέτερα, τα οποία είναι αποθηκευτικά, και σε πολικά τα οποία είναι δομικά και αποτελούν συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών (εικόνα 2-1). Ο κύριος κορμός τους αποτελείται από ένα μόριο γλυκερόλης ή σφιγγοσίνης, ενωμένο με ένα ή περισσότερα λιπαρά οξέα ή και με μία φωσφορική ομάδα ή ένα σάκχαρο. Όταν το μόριο της γλυκερόλης ή της σφιγγοσίνης ενώνεται με φωσφορική ομάδα ονομάζεται φωσφολιπίδιο, ενώ όταν ενώνεται με σάκχαρο, γλυκολιπίδιο [29].



Εικόνα 2-1: Κατηγορίες λιπιδίων (ουδέτερα και πολικά λιπίδια) [29]

2.2.1 Ουδέτερα λιπίδια: λιπαρά οξέα, χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, καροτενοειδή

Ουδέτερα ονομάζονται τα λιπίδια που συμπεριλαμβάνουν: 1) τα τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια και μονογλυκερίδια (εστέρες γλυκερόλης με λιπαρά οξέα), 2) τις λιπαρές αλκοόλες, 3) τους υδρογονάνθρακες, 4) τις στερόλες και 5) τα λιπαρά οξέα [26]. Από την ομάδα των ουδετέρων λιπιδίων θα αναλυθούν εκτενέστερα τα λιπαρά οξέα, η χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια και τα καροτενοειδή.

- **Λιπαρά οξέα**

Λιπαρά οξέα είναι μονοκαρβοξυλικά οξέα διαφόρων μηκών ανθρακικής αλυσίδας με άρτιο κυρίως αριθμό ατόμων άνθρακα και συνήθως από 4-24 άτομα άνθρακα [28]. Αποτελούν βασικό συστατικό των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων [26]. Μπορούν να ανιχνευτούν και ως ελεύθερα, αλλά σε μικρά ποσοστά, κυρίως μετά από υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων [30].

Τα λιπαρά οξέα κατατάσσονται σε α) κορεσμένα (δεν περιέχουν διπλούς δεσμούς) και β) ακόρεστα: i) μονοακόρεστα (ένας διπλός δεσμός) και ii) πολυακόρεστα (δύο και άνω διπλοί δεσμοί) [26]. Τα κύρια κορεσμένα λιπαρά οξέα (Saturated Fatty Acids, SFA) είναι το μυριστικό (C14:0), το παλμιτικό (C16:0) και το στεατικό (C18:0) οξύ. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα συχνά ενοχοποιούνται για βλάβες στον οργανισμό. Πιθανόν

σε αυτά να οφείλονται η αρτηριοσκλήρυνση, διάφορα καρδιαγγειακά νοσήματα και μορφές καρκίνου, όπως του παχέος εντέρου [31-35].

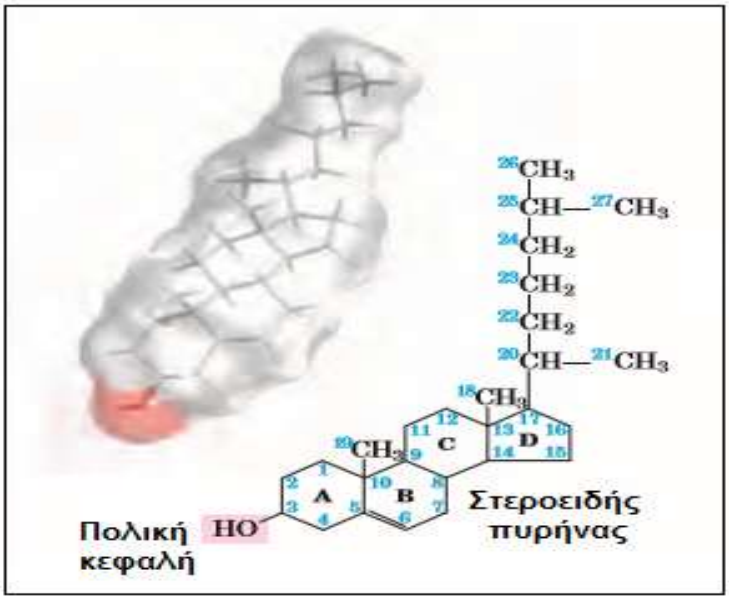
Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Monounsaturated Fatty Acids, MUFA) έχουν ευεργετικές ιδιότητες στην ανθρώπινη υγεία [36]. Πρόσφατη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στο Wageningen αναφέρει ότι η αντικατάσταση διατροφής πλούσιας σε SFA από μια διατροφή πλούσια σε MUFA, αύξησε τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας στο αίμα μειώνοντας τις πιθανότητες για καρδιακά νοσήματα [36].

Τα πολυακόρεστα (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA) είναι γνωστά για τα οφέλη τους στον ανθρώπινο οργανισμό [37,38]. Οι πιο σημαντικές οικογένειες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων είναι τα ω-3 και ω-6. Το α-λινολενικό (C18:3ω-3, ALA) και το λινελαϊκό οξύ (C18:2ω-6, LA), χαρακτηρίζονται ως «απαραίτητα» λιπαρά οξέα, διότι δεν βιοσυντίθενται στον ανθρώπινο οργανισμό και πρέπει προσλαμβάνονται μέσω της τροφής [39]. Η έλλειψη αυτών των λιπαρών οξέων στον ανθρώπινο οργανισμό προκαλεί προβλήματα γονιμότητας, καταστροφή/βλάβες στα νεφρά, στο δέρμα, στην όραση και παρατηρείται έντονη τριχόπτωση. Επίσης η έλλειψή τους παρουσιάζει έντονη εφίδρωση και δίψα [40]. Το LA είναι πρόδρομο λιπαρό οξύ για το σχηματισμό λιπαρών οξέων της οικογένειας των ω-6. Σημαντικό λιπαρό οξύ που προέρχεται από το LA είναι το αραχιδονικό οξύ (C20:4 ω-6, AA), ένα λιπαρό οξύ, πλούσιο στα πολικά λιπίδια ζωικής προέλευσης. Το ALA αποτελεί υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων της οικογένειας ω-3. Κύριες πηγές του είναι τα φύκη και τα ψάρια γι' αυτό συνιστάται η συχνή κατανάλωσή τους [41]. Τα οξέα εικοσιπεντενοϊκό (C20:5 ω-3, EPA) και εικοσιδυοεξενοϊκό (C22:6 ω-3, DHA) προέρχονται από το ALA. Ένας από τους βασικούς ρόλους του DHA είναι ότι σχετίζεται με τη σωστή ανάπτυξη του εγκεφάλου και του νευρικού συστήματος του εμβρύου, ενώ βασικός ρόλος τόσο του EPA όσο και του DHA είναι ότι συμβάλλουν στη μείωση των πιθανοτήτων ανάπτυξης Alzheimer και κατάθλιψης [41-44]

- **Χοληστερόλη**

Η χοληστερόλη (εικόνα 2-2) είναι στεροειδές δομημένο από τέσσερις συνδεδεμένους δακτύλιους υδρογονανθράκων [27-29]. Ο ρόλος της χοληστερόλης στον ανθρώπινο οργανισμό είναι ευρέως γνωστός καθώς: α) αποτελεί συστατικό των μεμβρανών των κυττάρων και των λιποπρωτεϊνών του αίματος και β) είναι πρόδρομη ένωση ορμονών (ανδρογόνων, οιστρογόνων) και χολικών αλάτων [26]. Ο ευεργετικός της ρόλος, όμως

συχνά επισκιάζεται διότι οι υψηλές συγκεντρώσεις της χοληστερόλης στο αίμα ευνοούν την εμφάνιση καρδιακών νοσημάτων και την αύξηση της θνησιμότητας [30]. Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη χοληστερόλης είναι <200 mg/ημέρα [46].



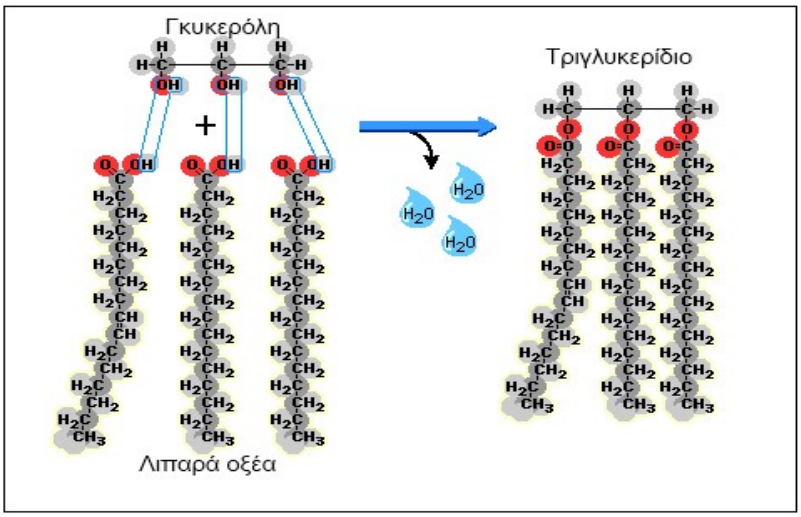
Εικόνα 2-2: Δομή χοληστερόλης

- **Τριγλυκερίδια**

Τριγλυκερίδια ονομάζονται τα λιπίδια που σχηματίζονται με εστεροποίηση της γλυκερόλης είτε με το ίδιο λιπαρό οξύ και στις τρεις θέσεις (απλά τριγλυκερίδια) είτε με διαφορετικά λιπαρά οξέα (μεικτά τριγλυκερίδια) (εικόνα 2-3) [29].

Τα τριγλυκερίδια αποθηκεύονται με μορφή ενέργειας στον λιπώδη ιστό των ζώων και στους σπόρους των φυτών. Ο οργανισμός αποθηκεύει τα τριγλυκερίδια στα λιποκύτταρα και τα απελευθερώνει όποτε χρειάζεται ενέργεια [46]. Εκτός από τον αποθηκευτικό τους ρόλο, έχουν και προστατευτικό ρόλο, καθώς έχουν αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [46].

Τα επίπεδα όμως των τριγλυκεριδίων στο αίμα δεν πρέπει να ξεπερνούν τα 150 mg/dL [47]. Η συστηματική κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε υδατάνθρακες και λίπη, αυξάνει τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στο αίμα, με αποτέλεσμα να ευνοείται η εμφάνιση καρδιακών και εγκεφαλικών επεισοδίων [47-49].



Εικόνα 2-3: Δομή τριγλυκεριδίων

- **Καροτενοειδή**

Τα καροτενοειδή είναι φυσικές χρωστικές ενώσεις που βιοσυντίθενται μόνο στα φυτά και στα φύκη και σε ορισμένους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς όπως μύκητες και βακτήρια [50]. Στους ζωικούς οργανισμούς δεν παράγονται de novo, συνεπώς πρέπει να προσλαμβάνονται μέσω της τροφής [50,51]. Τα καροτενοειδή προσδίδουν το έντονο χρώμα (κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο) σε φρούτα, λαχανικά, θαλάσσια φύκη [50], οστρακοειδή και γαρίδες [51].

Μέχρι σήμερα, έχουν προσδιοριστεί παραπάνω από 600 διαφορετικές ενώσεις καροτενοειδώ. Διακρίνονται σε α) καροτένια (πολυενικοί υδρογονάνθρακες με κύρια τα α και β-καροτένιο και το λυκοπένιο) και β) ξανθοφύλλες (οξυγονούχα παράγωγα με υποκατεστημένες υδροξυ-ή όξυ- ή εποξυ-ομάδες) με κύριες τη β-κρυπτοξανθίνη, τη λουτεΐνη, τη ζεαξανθίνη, την κανθαξανθίνη και την ασταξανθίνη [29,50].

Παρουσιάζουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον, διότι έχουν ευεργετικές ιδιότητες στην ανθρώπινη υγεία. Συγκεκριμένα, έχουν αντιοξειδωτική δράση, προστατεύοντας τα κύτταρα και τους ιστούς από τις ελεύθερες ρίζες και την οξείδωσή τους. Ρυθμίζουν και ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Μειώνουν τον κίνδυνο καρδιακών παθήσεων και διαφόρων τύπου καρκίνου (πχ καρκίνο στον προστάτη). Επίσης δρουν ως πρόδρομες ουσίες της βιταμίνης-Α [52-55].

2.2.2 Πολικά λιπίδια

Τα πολικά λιπίδια είναι τα κυριότερα συστατικά των μεμβρανών. Βασικό χαρακτηριστικό των μεμβρανών είναι το διπλό λιπιδικό στρώμα (μεμβρανική διπλοστιβάδα), το οποίο λειτουργεί ως φραγμός για το πέρασμα πολικών μορίων και ιόντων. Τα μεμβρανικά λιπίδια είναι αμφιπολικά και αποτελούνται από δύο τμήματα, το υδρόφιλο (πολικές κεφαλές) και το υδρόφοβο (μη πολικές ουρές) [27-29].

2.2.2.1 Φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια αποτελούν δομικό υλικό των βιολογικών μεμβρανών και εντοπίζονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Είναι σύνθετα λιπίδια και αποτελούνται από 4 είδη απλών ενώσεων: α) τα λιπαρά οξέα, β) τη γλυκερόλη ή τη σφιγγοσίνη, γ) μια φωσφορική ομάδα και δ) μια αμινοαλκοόλη (αζωτούχο βάση) ή πολυόλη προσδεμένη στη φωσφορική ομάδα. Τα λιπαρά οξέα προσδίδουν τον υδρόφοβο χαρακτήρα στη μεμβράνη, ενώ το υπόλοιπο μόριο έχοντας υδρόφιλο χαρακτήρα αλληλοεπιδρά με το περιβάλλον. Τα φωσφολιπίδια διακρίνονται σε γλυκεροφωσφολιπίδια και σφιγγολιπίδια (εικόνα 2-1) [29].

2.2.2.1.1 Γλυκεροφωσφολιπίδια: φωσφατιδυλοχολίνη (PC), φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη (PE), φωσφατιδυλοσερίνη (PS) και φωσφατιδυλοϊνοσίτης (PI)

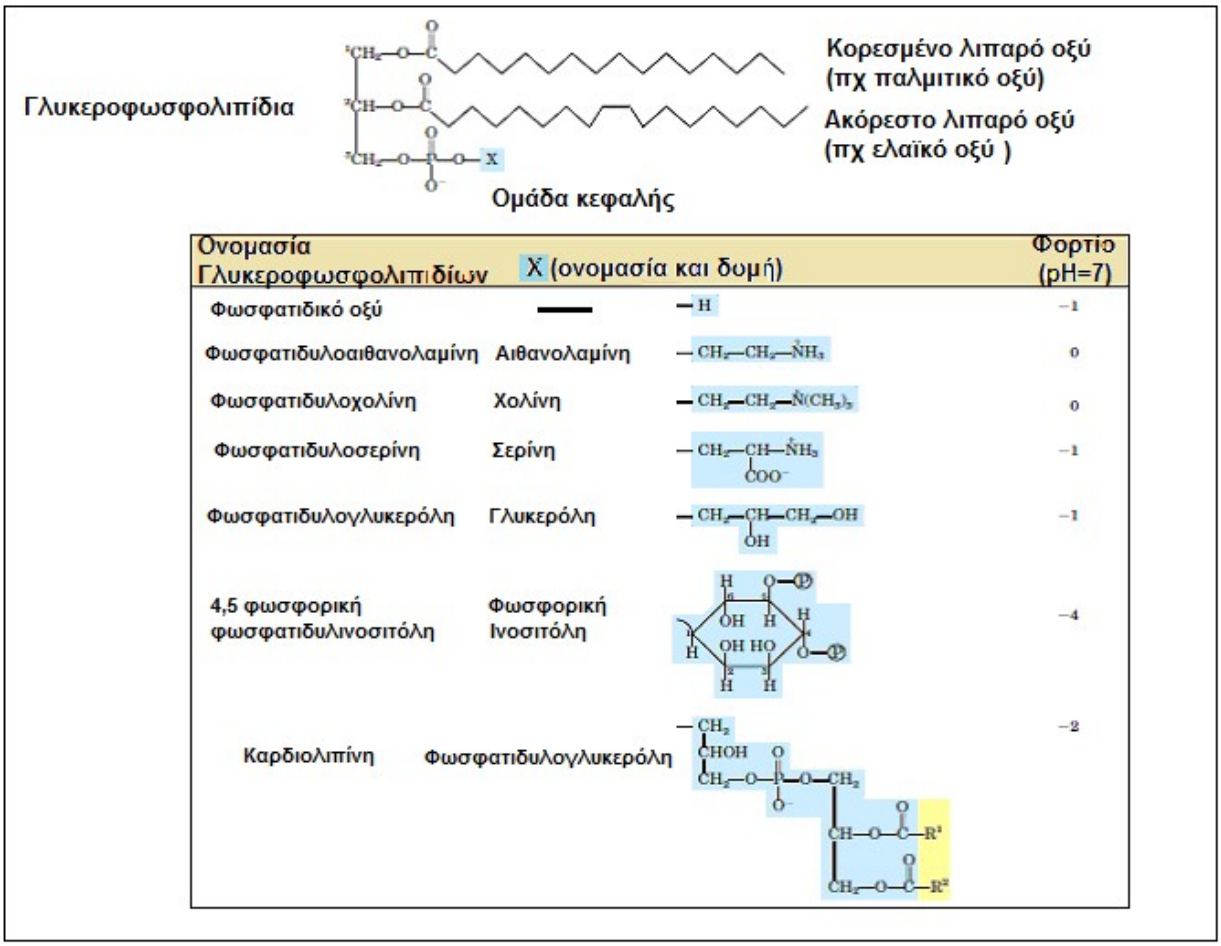
Τα γλυκεροφωσφολιπίδια (ή φωσφογλυκερίδια) αποτελούνται από δύο λιπαρά οξέα ενωμένα με εστερικό δεσμό με δύο από τις υδροξυλομάδες της γλυκερόλης. Η τρίτη υδροξυλομάδα της γλυκερόλης είναι ενωμένη με μια αμινοαλκοόλη ή πολυόλη μέσω φωσφορικού δεσμού. Όλα τα γλυκεροφωσφολιπίδια αποτελούν παράγωγα του φωσφατιδικού οξέος (εικόνα 2-4) [27-29].

Στα γλυκεροφωσφολιπίδια, οι βάσεις που απαντάμε συχνότερα είναι οι αμινοαλκοόλες χολίνη και αιθανολαμίνη, το αμινοξύ σερίνη και η πολυόλη ινοσίτης, στις αντίστοιχες ενώσεις φωσφατιδυλοχολίνη (λεκιθίνη), φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (κεφαλίνη), φωσφατιδυλοσερίνης και φωσφατιδυλοϊνοσίτη. Η καρδιολιπίνη επίσης ανήκει στα γλυκεροφωσφολιπίδια, αλλά έχει διαφορετική δομή έναντι των υπολοίπων, καθώς αποτελείται από δύο φωσφατιδικά οξέα, ενωμένα με το μόριο της γλυκερόλης [28-31].

- **Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)**

Η φωσφατιδυλοχολίνη ή λεκιθίνη (phosphatidylcholine/glycerolphosphatidylcholine, PC) αποτελεί το 40-60% των φωσφολιπιδίων και βρίσκεται κυρίως στα ευκαρυωτικά

κύτταρα [56,57]. Εκτός από τη συμμετοχή της στο σχηματισμό των κυτταρικών μεμβρανών στους ζωτικούς οργανισμούς (δομικός ρόλος), έχει κύριο ρόλο και στην κυτταρική σηματοδότηση επηρεάζοντας τη δραστικότητα πολλών μεμβρανικών ενζύμων [58]. Η φωσφατιδυλοχολίνη συμμετέχει άμεσα στη σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων [59,60], στην έκκριση λιποπρωτεϊνών [58,61] και στη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών [62]. Επίσης συμμετέχει ως πρόδρομο μόριο στην παραγωγή άλλων φωσφολιπιδίων όπως της PE και PS [63]. Επίσης, πιθανόν η σύσταση των λιπαρών οξέων της PC να επηρεάζει σημαντικά τη λειτουργία της ινσουλίνης στον ανθρώπινο οργανισμό σύμφωνα με έρευνα του Clore et al. (2000) [64].



Εικόνα 2-4: Δομές γλυκεροφωσφολιπιδίων [29]

❖ Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE)

Η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη ή κεφαλίνη (phosphoethanolamine/glycerophosphoethanolamine, PE) αποτελεί το δεύτερο μεγαλύτερο σε ποσοστά φωσφολιπίδιο μετά την PC. Στα θηλαστικά κυμαίνεται από 20-50% των ολικών φωσφολιπιδίων. Στον

εγκέφαλο των θηλαστικών αγγίζει το 45% των ολικών φωσφολιπιδίων και η δομή της παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες λειτουργίες του εγκεφάλου. Για παράδειγμα, πιθανή μείωση των ποσοστών της PE μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή των κυττάρων μετά από ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο δηλαδή να διακοπεί η παροχή αίματος σε τμήμα του εγκεφάλου, με αποτέλεσμα τη θανάτωση εγκεφαλικών κυττάρων [65,66]. Στο συκώτι των θηλαστικών βρίσκεται σε χαμηλότερα ποσοστά (<20% των ολικών φωσφολιπιδίων) [67].

Η PE μπορεί να σχηματιστεί από την PS. Το ένζυμο PS συνθάση-2 (PSS2), καταλύει την ομάδα της σερίνης, προσθέτοντας αιθανολαμίνη στο φωσφολιπίδιο [28].

- **Φωσφατιδυλοσερίνη (PS)**

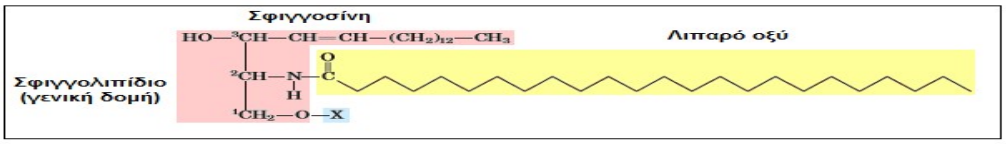
Η φωσφατιδυλοσερίνη (phosphatidylserine/glycerophosphoserine, PS) αποτελεί το 3-15% των ολικών φωσφολιπιδίων [65]. Η PS επίσης αποτελεί συστατικό των λιπιδίων του εγκεφάλου και φαίνεται να βελτιώνει την ικανότητα της μνήμης, καθώς και να προλαμβάνει προβλήματα που σχετίζονται με την ηλικία. Σημαντικό ποσοστό της ρητίνης στον εγκέφαλο αποτελείται από PS, με κύριο λιπαρό οξύ το DHA (C22:6 ω-3) [67]. Η PS δρώντας ως συμπαράγοντας μπορεί να συμβάλλει σε πολλές πρωτεϊνικές αντιδράσεις, όπως της κινάση C, της Na^+, K^+-ATP-άσης κλπ [56]. Επίσης δρα ως πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση της PC και PE στα ευκαρυωτικά κύτταρα [66]. Τέλος, παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση του κυττάρου (κυτταρικός θάνατος). Το κύτταρο κατά την απόπτωση μεταφέρει αμέσως PS στο εξωτερικό τμήμα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης αλλάζοντας έτσι την κατανομή των φωσφολιπιδίων μεταξύ του εσωτερικού και εξωτερικού τμήματος της μεμβράνης. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται σήμα για αναγνώριση και απομάκρυνση του υπό θανάτωση κυττάρου [67].

- **Φωσφατιδυλοϊνοσίτης (PI)**

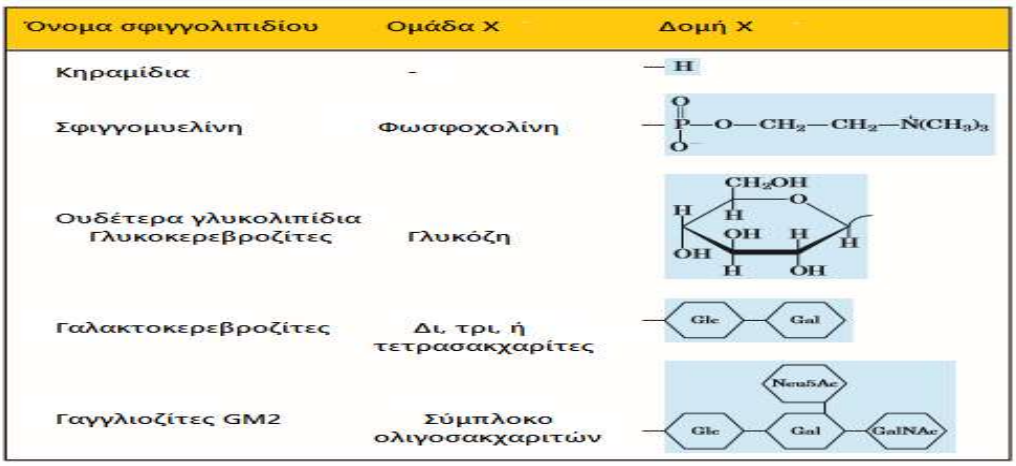
Ο φωσφατιδυλοϊνοσίτης (phosphatidylinositol/glycerophosphoinositol, PI) είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο και εντοπίζεται σε ποσοστά μικρότερα του 5% των ολικών φωσφολιπιδίων στα ευκαριωτικά κύτταρα [29,69]. Ο PI επειδή μπορεί να φωσφορυλιωθεί σε τρεις διαφορετικές θέσεις στον δακτύλιο του ινοσίτη σχηματίζοντας φωσφοϊνοσιτίδια (phosphoinositides/PIPs) μπορεί να μεταδίδει πληροφορίες στο κύτταρο, να ενεργοποιεί πρωτεΐνες και ένζυμα [68,69] και να συμβάλλει στη σωστή δομή και λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης [70].

2.2.2.1.2 Σφιγγολιπίδια: Σφιγγομυελίνη (SM)

Τα σφιγγολιπίδια αποτελούν την τέταρτη μεγαλύτερη ομάδα των μεμβρανικών λιπιδίων. Αποτελούνται από μία ομάδα πολικής κεφαλής και δύο μη πολικές ουρές. Αντί για το μόριο της γλυκερόλης, περιέχουν ένα μόριο σφιγγοσίνης (αμινική αλκοόλη) [29]. Για πρώτη φορά δόθηκε το όνομα αυτό από τον Thudichum το 1884 επειδή ο βιολογικός τους ρόλος ήταν αινιγματικός, εξού και το αρχικό «σφίγγα» [71]. Τα λιπίδια αυτά εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων, αν και η συγκέντρωσή τους είναι υψηλότερη στα κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ο ρόλος τους πλέον είναι γνωστός. Συντελούν στη σταθεροποίηση της μεμβράνης, καθορίζουν την ταυτότητα του κυττάρου και αποτελούν αναγνωρίσιμα σήματα για τα γειτονικά κύτταρα, επειδή βρίσκονται στην επιφάνειά του κυττάρου [71]. Για παράδειγμα, τα γλυκολιπίδια (ενώσεις λιπιδίων με υδατάνθρακες πχ μονοσακχαρίτες ή ολιγοσακχαρίτες) αποτελούν τα σήματα αναγνώρισης της κυτταρικής επιφάνειας για τον καθορισμό των ομάδων αίματος του συστήματος ΑΒΟ και γι'αυτό χρησιμοποιούνται συχνά στην ιατρική για τις μεταγγίσεις αίματος [29]. Μέχρι σήμερα είναι γνωστά παραπάνω από 60 διαφορετικά μοριακά είδη σφιγγολιπιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό. Παρακάτω δίνονται η γενική δομή των σφιγγολιπιδίων (εικόνα 2-5) και κάποια παραδείγματα μοριακών δομών (εικόνα 2-6) [29].



Εικόνα 2-5: Γενική δομή σφιγγολιπιδίων [29]



Εικόνα 2-6: Παραδείγματα σφιγγολιπιδίων [29]

- **Σφιγγομυελίνη (SM)**

Η σφιγγομυελίνη (sphingomyelin, SM) αποτελείται από μια μονάδα κηραμιδίου συνδεδεμένη στην ακραία υδροξυλομάδα με μια φωσφορική ομάδα και μια βάση χολίνης ή αιθανολαμίνης. Απαντάται στις μεμβράνες των ζωικών ιστών π.χ. εγκέφαλο, συκώτι, καρδιά κλπ. και δεν απαντάται στα φυτά ή σε μικροοργανισμούς [29]. Η σφιγγομυελίνη, παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά με τη φωσφατιδυλοχολίνη, καθώς βιοσυντίθεται με άμεση μεταφορά της χαρακτηριστικής ομάδας φωσφορυλοχολίνης από τη φωσφατιδυλοχολίνη μέσω του ενζύμου συνθάση της σφιγγομυελίνης, πιθανόν υποκαθιστώντας το ρόλο της φωσφατιδυλοχολίνης στις κυτταρικές μεμβράνες [29,72]. Η σφιγγομυελίνη μπορεί όμως με τη σειρά της να αποτελέσει πρόδρομη ένωση σφιγγολιπιδικών μεταβολιτών, ύστερα από υδρόλυσή της σε φωσφορική χολίνη και κηραμίδιο με τη βοήθεια του ενζύμου, σφιγγομυελινάση. Με τη σειρά του το κηραμίδιο μπορεί να μετατραπεί σε σφιγγοσίνη και ένα λιπαρό οξύ από την κηραμιδάση [29]. Συνεπώς η περιεκτικότητα σε σφιγγομυελίνη, επηρεάζει και την περιεκτικότητα του κηραμιδίου, άρα και τον κύκλο του κυτταρικού μεταβολισμού [73,74].

2.3 Πρόσφατες μελέτες των λιπιδίων στις γαρίδες

Πρόσφατες έρευνες αποδεικνύουν ότι τα λιπίδια είναι απαραίτητα για τη σωστή και ισορροπημένη λειτουργία του οργανισμού των γαρίδων [75-79]. Ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, τις διατροφικές συνήθειες, την εποχή και το γεωγραφικό πλάτος στο οποίο ζουν, αναπτύσσουν και κατάλληλους μηχανισμούς ώστε να βιοσυνθέτουν τα λιπίδια που έχουν ανάγκη. Μεγάλα ποσοστά λιπιδίων τα προσλαμβάνουν έτοιμα από την τροφή τους. Βασική τροφή των γαρίδων είναι το φυτοπλαγκτόν και το ζωοπλακτόν, τα οποία είναι πλούσια σε λιπίδια και συνεπώς παρέχουν μεγάλα ποσά λιπιδίων στις γαρίδες.

Οι γαρίδες, περιέχουν μικρά ποσοστά λίπους (0.2-3%) [75-79] προσελκύοντας το ενδιαφέρον του καταναλωτικού κοινού. Ο Bono και οι συνεργάτες του (2012) βρήκαν 1.5-2.9% ολικού λίπους (Total Lipid, TL) στο βρώσιμο τμήμα των κόκκινων γαρίδων, *A. foliacea* [75], ενώ οι Rosa και Nunes (2003) προσδιόρισαν χαμηλά ποσοστά ολικού λίπους στις ροζ γαρίδες *P. longirostris* και στις κόκκινες γαρίδες *A. antennatus*, τα οποία κυμαίνονταν από 0.2-0.3% επί του νωπού ιστού και στα δύο είδη [76]. Στα είδη γαρίδων *Xiphopenaeus kroyeri, Macrobrachium rosenbergii, Penaeus brasiliensis και Penaeus schimitti* προσδιορίστηκαν ποσοστά λίπους από 0.9 εώς 1.1% επί του νωπού ιστού [78].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο υποκεφάλαιο 2.2 (εικόνα 2-1), το ολικό λίπος στους οργανισμούς αποτελείται από πολικά (Polar Lipids, PL) και ουδέτερα (Neutral Lipids, NL) λιπίδια. Ομοίως ισχύει και στις γαρίδες. Τα πολικά λιπίδια, με κύρια τα φωσφολιπίδια, έχουν κυρίως δομικό ρόλο, συμβάλλοντας στη δομή των κυττάρων και κατ' επέκταση στη δομή των ιστών [79]. Γι' αυτό παρατηρείται στους μύες των γαρίδων να περιέχονται μεγάλα ποσοστά φωσφολιπιδίων. Για παράδειγμα, στους μύες των *Penaeus japonicus* [80], *Litopenaeus vannamei* [79], *Penaeus vannamei* και *Penaeus monodon* [81] τα ποσοστά των φωσφολιπιδίων που βρέθηκαν ήταν 68.4%, 69.5%, 72.3% και 74.5% επί των ολικών λιπιδίων (Total Lipids, TL) αντιστοίχως. Αντιθέτως, στους κεφαλοθώρακες έχουν προσδιορισθεί χαμηλότερα ποσοστά πολικών λιπιδίων και υψηλότερα ποσοστά ουδετέρων [79,82]. Για παράδειγμα, στους κεφαλοθώρακες των *Penaeus kerathurus* ή *Melicertus kerathurus* (στο παρόν διδακτορικό θα χρησιμοποιείται πλέον η ονομασία *M. kerathurus*) το ποσοστό των πολικών λιπιδίων ήταν 48.3%, εκ των οποίων τα φωσφολιπίδια καταλάμβαναν το 45.5% TL [82]. Αυτό συμβαίνει διότι οι κεφαλοθώρακες συμπεριλαμβάνουν το ηπατοπάγκρεας. Το ηπατοπάγκρεας με τη σειρά του, απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας (υπό μορφή τριγλυκεριδίων- αποθήκες ενέργειας) για την κάλυψη των βιολογικών αναγκών των γαρίδων [80].

Η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) προσδιορίζονται ως τα κύρια φωσφολιπίδια του ολικού λίπους των γαρίδων, τόσο σε μύες όσο και σε κεφαλοθώρακες [82]. Στο βρώσιμο τμήμα των *Metapenaeus dobsoni, Metapenaeus affinis, Metapenaeus monoceros, Penaeus indicus* και *Parapenaeus stylifera*, η PC και η PE προσδιορίστηκαν σε ποσοστά που κυμαίνονταν από 44.5 έως 52.5% TL και 23.1 έως 30.8% TL [83].

Από το κλάσμα των ουδετέρων λιπιδίων, τα τριγλυκερίδια και η χοληστερόλη προσδιορίζονται ως τα κυριότερα λιπίδια των γαρίδων. Συγκεκριμένα, στο βρώσιμο τμήμα των *A. antennatus* και *P. longirostris* τα ποσοστά των τριγλυκεριδίων που προσδιορίστηκαν κυμαίνονταν από 6.1 έως 9.5% και της ελεύθερης χοληστερόλης από 15.9 εώς 18.3% TL ανάλογα με την εποχή αλίευσης των συγκεκριμένων ειδών [76].

Οι γαρίδες αποτελούν καλή πηγή λιπαρών οξέων παρέχοντας σημαντικές ποσότητες ω-3 PUFA στον άνθρωπο [75-84]. Στους μύες των γαρίδων *A. foliacea, A. antennatus* και *P. martia* (οικ. Pandalidae) τα ποσοστά των PUFA αποτελούσαν το 33.88, 29.68

και το 32.20% των ολικών λιπαρών οξέων (TFA), τα MUFA το 34.92, 37.59 και 37.87% TFA, ενώ τα SFA το 31.19, 32.73 και 29.93% TFA αντίστοιχα [84].

Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που ανιχνεύονται στο ολικό λίπος των γαρίδων είναι το μυριστικό (C14:0), το παλμιτικό (C16:0) και το στεατικό (C18:0) οξύ από την ομάδα των SFA, από τα MUFA κυρίαρχο είναι το ελαϊκό (C18:1 ω-9), ενώ από τα PUFA τα EPA (C20:5 ω-3) και DHA (C22:6 ω-3). Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, α-λινολενικό (C18:3 ω-3, ALA) και λινελαϊκό (C18:2 ω-6, LA) επίσης προσδιορίζονται στις γαρίδες αν και συνήθως σε μικρά ποσοστά όπως στις *Penaeus japonicus, Penaeus semisulcatus* και *Plesionica edwardsii* (0.10-0.45%TFA και 1.37-8.56% TFA αντίστοιχα) [84].

Οι καταναλωτές έχουν ως βασικό κριτήριο για την επιλογή των θαλασσινών το χρώμα των ειδών. Ως εκ τούτου, οι επιστήμονες, τα τελευταία χρόνια, έχουν εστιάσει τις έρευνές τους στα καροτενοειδή [75]. Η ασταξανθίνη έχει βρεθεί ότι είναι το κύριο καροτενοειδές που προσδίδει το κόκκινο χρώμα στις γαρίδες [80].

2.4 Λιπίδια και ανθρώπινη υγεία

Ο ρόλος των λιπιδίων στην ανθρώπινη υγεία είναι σημαντικός, επειδή ο οργανισμός δεν βιοσυνθέτει όλα τα λιπίδια de novo και κρίνεται απαραίτητο να τα προσλαμβάνει μέσω της τροφής. Τα θαλασσινά είναι καλή πηγή πρόσληψης λιπιδίων. Οι γαρίδες καθίστανται ελκυστικό τρόφιμο προς κατανάλωση διότι συνδυάζουν άψογα τα μοναδικά οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, δηλ. το ελκυστικό κόκκινο-ροζ χρώμα, το ιδιαίτερο *"ocean-like"* ή "*slightly iodine*" άρωμα και την "*briny*" (υφάλμυρη) γεύση [85], με τα χημικά χαρακτηριστικά τους (μικρά ποσοστά λίπους, χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης, σημαντικά ποσοστά ω-3 λιπαρών οξέων και υψηλά ποσοστά πρωτεϊνών) [86].

Έρευνες αποδεικνύουν ότι τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν τόσο αντιθρομβωτική όσο και αντιαθηρογόνο δράση μειώνοντας συνεπώς τον κίνδυνο καρδιακών νοσημάτων [44]. Συμβάλλουν στην καλή ανάπτυξη και λειτουργία του εγκεφάλου [57], ενισχύουν τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος και παίζουν σημαντικότατο ρόλο στο σχηματισμό των κυτταρικών μεμβρανών στον ανθρώπινο οργανισμό [43].

Επίσης τα ω-3 PUFA τείνουν να μειώνουν τα επίπεδα της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων [88] και να επιβραδύνουν την εξέλιξη εκφυλιστικών νοσημάτων όπως του Alzheimer και του καρκίνου [42]. Μπορούν να δράσουν κατά της κατάθλιψης και

να μειώσουν την επιθετικότητα [42, 43]. Σύμφωνα με την International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids (ISSFAL), η ελάχιστη ημερήσια πρόσληψη των DHA+EPA θα πρέπει να είναι 500 mg/ημέρα, ενώ σύμφωνα με την European Food Safety Authority (EFSA) 250 mg/ημέρα [89]. Τέλος, συμβάλλουν στην ισορροπημένη ανάπτυξη των νεογνών. Έχει παρατηρηθεί ότι πρόωρα βρέφη που γεννιούνται με έλλειψη DHA έχουν πιθανό κίνδυνο πρόκλησης αιμορραγιών, ανεπαρκή λειτουργική εξέλιξη και ανάπτυξη του εγκεφάλου τους. Παιδιά που τρέφονταν από μητέρες που κατανάλωναν υψηλά επίπεδα DHA κατά τον τοκετό, είχαν αυξημένα επίπεδα αντίληψης και προσοχής στο δεύτερο χρόνο ζωής τους. Η ισορροπημένη διατροφή της μητέρας, πλούσιας σε ω-3 λιπαρά οξέα, βοηθά στη διανοητική και οπτική ανάπτυξη των νηπίων μέσω του θηλασμού [88,90]. Γι'αυτό η ISSFAL και η EFSA, συστήνουν 200 και 100-200 mg/ημέρα πρόσληψης DHA αντίστοιχα σε έγκυες γυναίκες ή γυναίκες που βρίσκονται στην περίοδο γαλουχίας [89].

Όπως επισημάνθηκε παραπάνω (υποκεφάλαιο 2.3) οι καταναλωτές επιλέγουν τις γαρίδες κυρίως με βάση το χρώμα τους, το οποίο οφείλεται στα καροτενοειδή. Όμως τα καροτενοειδή, πέρα από αυτό το έντονο, ζωηρό χρώμα που προσδίδουν, έχουν και αντιοξειδωτική δράση ωφελώντας την ανθρώπινη υγεία. Συγκεκριμένα, η ασταξανθίνη, η οποία βρίσκεται σε ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά στις γαρίδες, έχει βρεθεί να έχει παραπάνω από δέκα φορές μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση έναντι άλλων καροτενοειδών όπως της ζεαξανθίνης και του β-καροτένιου (καροτενοειδή που εντοπίζονται σε άλλα τρόφιμα) και 100 φορές μεγαλύτερη δράση από την α-τοκοφερόλη [50].

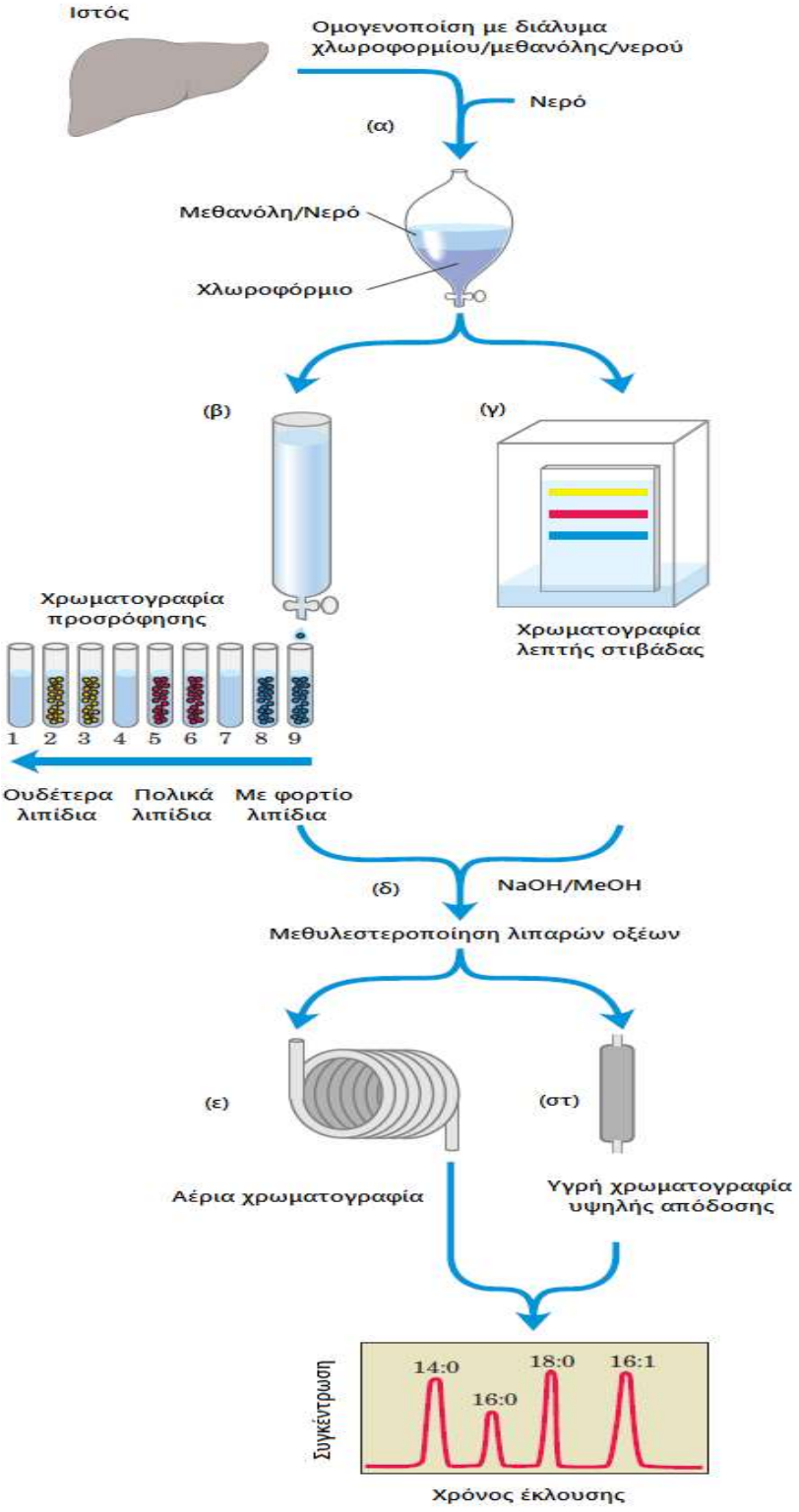
2.5 Ανάλυση λιπιδίων

Βασικός σκοπός των επιστημόνων είναι να αναλύουν ποιοτικά και ποσοτικά τα λιπίδια στα τρόφιμα, διότι τα λιπίδια συμμετέχουν σε μια σειρά βιολογικών αντιδράσεων στον ανθρώπινο οργανισμό και επηρεάζουν την υγεία και την ισορροπία του.

Στο παρακάτω σχήμα 2-1 παρουσιάζονται εν συντομία τα στάδια που λαμβάνουν χώρα κατά την ανάλυση των λιπιδίων. Αρχικά πραγματοποιείται η συλλογή και η επεξεργασία του δείγματος. Στη συνέχεια αφού πραγματοποιηθεί η ομογενοποίησή του, ακολουθούν η εκχύλιση και παραλαβή του λίπους. Συνήθως χρησιμοποιείται η μέθοδος Bligh-Dyer (1959) (προσθήκη διαλυτών: χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό σε αναλογία 1:2:0.8 v/v/v) [91].

Η παραλαβή του λίπους γίνεται στη χλωροφορμική φάση (κάτω φάση). Η συντήρηση του δείγματος επιτυγχάνεται με την αναδιάλυση του ολικού λίπους με διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης (9:1v/v).

Στη συνέχεια το λίπος μπορεί να διαχωριστεί στα επιμέρους κλάσματά του με εκχύλιση στερεής φάσης (solid phase extraction, SPE) (βήμα β σχήμα 2-1) ή με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography, TLC) (βήμα γ σχήμα 2-1). Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση αεριοχρωματογραφία (gas chromatography, GC), ενώ ο προσδιορισμός των καροτενοειδών με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high performance liquid chromatography, HPLC) [29].



Σχήμα 2-1: Περιγραφική πορεία ανάλυσης λιπιδίων [29]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΟΕΙΔΗ

3.1 Εισαγωγή

Τα μέταλλα και τα μεταλλοειδή υπάρχουν φυσικά στον φλοιό της γης και στις θάλασσες, σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα περισσότερα από αυτά, σε ιχνοποσότητες, είναι απαραίτητα για τη σωστή ανάπτυξη και λειτουργία των οργανισμών [92-93]. Ο Nielsen (2000), μέλος του Grand Forks, Κέντρου Ανθρώπινης Διατροφής του Τμήματος Γεωπονίας των ΗΠΑ (Human Nutrition Center of the United States, Department of Agriculture, USDA), τονίζει τη σπουδαιότητα αυτών των στοιχείων επισημαίνοντας ότι ο σίδηρος, το μαγγάνιο και το μαγνήσιο είναι στοιχεία ζωτικής σημασίας [92]. Για παράδειγμα, ο σίδηρος και ο χαλκός, συνδέονται στενά μεταξύ τους και είναι απαραίτητα στον ανθρώπινο οργανισμό σε συγκεκριμένες αναλογίες για την παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Χωρίς τη σωστή ποσότητα χαλκού, ο σίδηρος δε θα μπορούσε να ενσωματωθεί στην αιμοσφαιρίνη. Το δε μαγνήσιο, βοηθά στη διόρθωση των συμπτωμάτων ανεπάρκειας του καλίου, αφού ενισχύει την κυτταρική κατακράτηση του καλίου [92].

Εξαίρεση αποτελούν ο μόλυβδος, ο υδράργυρος και το κάδμιο, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι αν ξεπεράσουν τα επιτρεπτά όρια της νομοθεσίας, καθίστανται τοξικά. Η ανθρώπινη δραστηριότητα (η ανάπτυξη της βιομηχανίας, της γεωργίας και των διαφόρων τύπων ορυχείων) έχει αυξήσει δραματικά τις συγκεντρώσεις αυτών των μετάλλων ρυπαίνοντας το υδάτινο περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι θαλάσσιοι οργανισμοί να συσσωρεύουν στους ιστούς τους υψηλές συγκεντρώσεις αυτών των στοιχείων και μέσω της τροφικής αλυσίδας να μεταφέρονται στους ανώτερους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου και τον άνθρωπο [94].

3.2 Ανόργανα συστατικά

Τα “ανόργανα συστατικά” είναι χημικά στοιχεία τα οποία παίζουν καθοριστικό και πολλαπλό ρόλο στην ομαλή λειτουργία του οργανισμού συμμετέχοντας σε πλήθος βιολογικών λειτουργιών [92,93]. Αποτελούν το 4% του βάρους του ανθρώπινου σώματος. Πρέπει να προσλαμβάνονται μέσω της τροφής, καθώς δεν συντίθενται de novo [93].

Ο ρόλος τους είναι πολλαπλός. Συμμετέχουν στη δομή των σκελετικών ιστών προσδίδοντας αντοχή και σκληρότητα [92]. Εμπλέκονται στην παραγωγή της ενέργειας μέσω της μεταβολικής τους λειτουργίας παρ' όλο που δεν έχουν την ικανότητα να παράγουν ενέργεια [93]. Λαμβάνουν μέρος σε ρυθμιστικές λειτουργίες όπως τη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας και της ωσμωτικής πίεσης [92,93]. Συμμετέχουν στη σωστή λειτουργία ορισμένων ενζύμων είτε ως συμπαράγοντες πχ Mg, Zn είτε ως μέρη του μορίου τους (μεταλλοένζυμα) πχ ο Fe [95]. Κάποια ανόργανα στοιχεία παρατηρείται να έχουν ανταγωνιστική δράση με τα τοξικά μέταλλα μειώνοντας την πρόσληψη τους στον οργανισμό. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το σελήνιο (Se), το οποίο ανταγωνίζεται την πρόσληψη του υδραργύρου, μειώνοντας τα επίπεδά του και συνεπώς την τοξικότητά του [96]. Επίσης, ενώσεις, που περιέχουν στο μόριό τους απαραίτητα ανόργανα στοιχεία, μπορούν να σχηματίζουν σύμπλοκα με βαρέα μέταλλα και στη συνέχεια να αποβάλλονται από τον οργανισμό. Για παράδειγμα η μεταλλοθειονίνη με το καδμίου (Cd). Η μεταλλοθειονίνη είναι μια πρωτεΐνη πλούσια σε θείο (S), η οποία μπορεί να συμπλοκοποιήσει όλο σχεδόν το προσλαμβανόμενο κάδμιο (Cd), λόγω των πολλών σουλφυδριλικών ομάδων και συνεπώς το σύμπλοκο να αποβληθεί μέσω της ουρίας, προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό από χρόνια έκθεσή του σε Cd [97].

3.3 Κατηγορίες ανόργανων συστατικών

Τα ανόργανα συστατικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα μακροστοιχεία (macrominerals) και τα μικροστοιχεία ή ιχνοστοιχεία (microminerals or trace elements). Η κατηγοριοποίησή τους σε μακροστοιχεία και μικροστοιχεία γίνεται βάσει της Συνιστώμενης Ημερήσιας Πρόσληψής (ΣΗΠ) τους σε mg. Ως μακροστοιχεία ορίζονται τα ανόργανα στοιχεία των οποίων η πρόσληψή τους είναι άνω των 100 mg/ημέρα. Τέτοια στοιχεία είναι το ασβέστιο (Ca), χλώριο (Cl), μαγνήσιο (Mg), κάλιο (K), φωσφόρος (P), νάτριο (Na) και θείο (S). Ως μικροστοιχεία ή ιχνοστοιχεία ορίζονται τα στοιχεία που είναι απαραίτητα στον ανθρώπινο οργανισμό, ωστόσο η απαιτούμενη ημερήσια πρόσληψή τους είναι κάτω από 100 mg/ημέρα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν το χρώμιο (Cr), κοβάλτιο (Co), χαλκός (Cu), φθόριο (F), ιώδιο (I), σίδηρος (Fe), μαγγάνιο (Mn), μολυβδένιο (Mo), νικέλιο (Ni), σελήνιο (Se), πυρίτιο (Si), κασσίτερος (Sn) , βανάδιο (V), ψευδάργυρος (Zn) [93]. Στη συνέχεια θα αναλυθούν εκτενέστερα τα στοιχεία που προσδιορίστηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή και είναι ο P, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Se, Cr και Ni.

3.3.1 Φωσφόρος (P)

Ο φωσφόρος αποτελεί περίπου το 1% του ανθρώπινου σώματος, καταλαμβάνοντας το ¼ του συνόλου των ανόργανων συστατικών στο σώμα. Το 85% του P στο ανθρώπινο σώμα βρίσκεται στα οστά και τα δόντια υπό μορφή ανόργανων ενώσεων, ενώ το υπόλοιπο 15% βρίσκεται υπό οργανική μορφή στους μαλακούς ιστούς [98]. Ο P αποτελεί απαραίτητο συστατικό των πρωτεϊνών, των λιπιδίων, των υδατανθράκων, του DNA και RNA και ενώσεων όπως της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και της φωσφορικής κρεατίνης, μόρια που συμμετέχουν στην παραγωγή και αποθήκευση ενέργειας [28-30]. Συμμετέχει στη βιοσύνθεση φωσφολιπιδίων. Για παράδειγμα, ο P από το ATP αντιδρά με τη χολίνη για την παραγωγή της φωσφατιδυλοχολίνης. Επίσης παίζει βασικό ρόλο στην ισορροπία του pH του σώματος συμμετέχοντας ως ρυθμιστής του pH [29].

Φωσφόρο περιέχουν πάρα πολλά τρόφιμα, γι'αυτό σπάνια παρατηρείται έλλειψή του στον ανθρώπινο οργανισμό. Η παρατεταμένη έλλειψή του μπορεί να προκαλέσει ραχίτιδα και οστεομαλάκυνση. Οι υψηλές συγκεντρώσεις P μπορούν να προκαλέσουν μείωση των επιπέδων του Ca στο αίμα και να δημιουργήσουν δυσμενείς επιπτώσεις στο νευρικό σύστημα [97,98].

Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψή του είναι τα 550 mg [99]. Τροφές πλούσιες σε P είναι το κρέας, τα πουλερικά, τα ψάρια, τα αυγά, το γάλα, το τυρί, οι ξηροί καρποί, τα δημητριακά.

3.3.2 Μαγνήσιο (Mg)

Το μαγνήσιο βρίσκεται σε μεγάλα ποσοστά στα οστά και στα δόντια. Συμμετέχει σε πολλές βιολογικές λειτουργίες του οργανισμό όπως στην πρωτεϊνοσύνθεση και στην παραγωγή ορμονών. Παίζει σημαντικό ρόλο σε παραπάνω από 300 ενζυμικές αντιδράσεις, έχει νευρωνική δραστηριότητα, δρα ανταγωνιστικά με το Ca ώστε να υπάρχει ισορροπία στους μαλακούς ιστούς [93].

Η έλλειψη Mg επιτρέπει την εναπόθεση του Ca στους μαλακούς ιστούς. Χαμηλές συγκεντρώσεις Mg μπορεί να προκαλέσουν σύγχυση, αϋπνία, νευρικότητα, κακή πέψη, ταχυκαρδία, επιληπτικές κρίσεις, διαβήτη, καρδιακή αρρυθμία, καρδιαγγειακές παθήσεις, υπέρταση, άσθμα, χρόνια κόπωση και κατάθλιψη. Σε αντίθεση, υψηλές συγκεντρώσεις Mg πιθανόν να αποσταθεροποιήσουν την ισορροπία των μετάλλων, να προκαλέσουν υπόταση, ξηροδερμία, διάρροια, γαστρεντερικά προβλήματα [93].

Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη Mg είναι τα 300 mg [99]. Πηγές πλούσιες σε Mg είναι τα λαχανικά, τα ψάρια, τα οστρακοειδή, τα φυστίκια, τα σιτηρά κ.α.

3.3.3 Σίδηρος (Fe)

Ο σίδηρος βρίσκεται κυρίως στην αιμογλοβίνη (60%), η οποία συμμετέχει στη μεταφορά του οξυγόνου από τους ιστούς. Ποσοστό περίπου 4% βρίσκεται στη μυοβλοβίνη (συστατικό των μυών). Αποτελεί συστατικό διαφόρων ενζύμων που συμμετέχουν στον ενεργειακό μεταβολισμό και συμμετέχει στη συντήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος [93,97]. Οι ποσότητες του Fe που δεν χρησιμοποιούνται από τον οργανισμό, αποθηκεύονται στο ήπαρ, τη σπλήνα και τον μυελό των οστών με τη μορφή ενός συμπλόκου, γνωστού ως φερριτίνη (ένωση του Fe με πρωτεΐνη) [97].

Η έλλειψη Fe προκαλεί στον άνθρωπο αναιμία, γνωστική ανεπάρκεια, πεπτικές διαταραχές, ζάλη, κόπωση, αδυναμία συγκέντρωσης, φλεγμονή στοματικής κοιλότητας και μπορεί να καταστήσει τα μαλλιά, τα νύχια και τα οστά εύθραυστα [93]. Απαιτείται μεγαλύτερη πρόσληψη Fe από κάποιες ομάδες πληθυσμού, όπως παιδιά, έφηβοι και γυναίκες. Οι υψηλές συγκεντρώσεις Fe όμως πιθανόν να οδηγήσουν σε αύξηση ελευθέρων ριζών. Η υπερβολική συγκέντρωση Fe στο αίμα οδηγεί σε τοξική συσσώρευση του μετάλλου στο συκώτι, τη σπλήνα, το πάγκρεας και τα νεφρά [93].

Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη του Fe είναι 14 mg [99]. Κύριες πηγές Fe είναι το κρέας, το συκώτι, το κοτόπουλο, το ψάρι, τα στρείδια, το κακάο και το χαβιάρι.

3.3.4 Ψευδάργυρος (Zn)

Ο ψευδάργυρος δρα ως συμπαράγοντας σε παραπάνω από 300 ένζυμα τα οποία συμμετέχουν σε πληθώρα βιοχημικών αντιδράσεων. Αλληλοεπιδρά με την ινσουλίνη για τη σωστή λειτουργία της, ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα, συμβάλλει στην επούλωση των πληγών [93]. Είναι απαραίτητος στην πρωτεϊνοσύνθεση, και συμμετέχει στη σωστή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Συμβάλλει επίσης στην καλύτερη απορρόφηση του Ca από τα οστά. Εμπλέκεται στην πέψη και στη σωστή ανάπτυξη των αναπαραγωγικών οργάνων. Βελτιώνει την όραση, τη γεύση και την οσμή, παρεμποδίζει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και βοηθά στην καλύτερη απορρόφηση της βιταμίνης A [93].

Η έλλειψη Zn προκαλεί καθυστερημένη σωματική ανάπτυξη, καθυστερημένη σεξουαλική ωριμότητα και παρατεταμένη επούλωση των πληγών. Η έλλειψή του επίσης, μειώνει την αίσθηση της γεύσης και της οσμής. Επιπροσθέτως, παρατηρείται

κόπωση, απώλεια μαλλιών, κακή νυχτερινή όραση, αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις, απώλεια μνήμης, προδιάθεση για διαβήτη, προβλήματα στον προστάτη καθώς και δερματικές αλλοιώσεις [93]. Υψηλές συγκεντρώσεις Zn προκαλούν γαστρεντερικές ενοχλήσεις, ζαλάδα, ναυτία, μειωμένη ανοσία, δυσμενείς αλλαγές στον λόγο καλής/κακής χοληστερόλης (HDL/LDL) [93].

Ως συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη είναι τα 10 mg [99]. Πηγές πρόσληψης Zn είναι το μοσχαρίσιο κρέας, τα πουλερικά, τα στρείδια, τα μπαχαρικά, οι σταφίδες κλπ.

3.3.5 Μαγγάνιο (Mn)

Το μαγγάνιο, αποτελεί συστατικό πολλών ενζύμων. Συμμετέχει σε πολλές βιολογικές διεργασίες όπως τη σύνθεση χοληστερόλης, το σχηματισμό συνδετικού νευρικού ιστού, στον μεταβολισμό των λιπών, πρωτεϊνών και υδατανθράκων, στην παραγωγή γάλακτος, στο σχηματισμό της ουρίας και στην παραγωγή ορμονών του φύλου. Έχει ισχυρές οιστρογονικές ιδιότητες και σε συνδυασμό με τη δράση της βιταμίνης Β1 χρησιμοποιείται για τη θεραπεία συμπτωμάτων εμμηνόπαυσης, οστεροπόρωσης και της επιλόχειας κατάθλιψης. Είναι απαραίτητο στοιχείο για την πήξη του αίματος. Η απορρόφησή του μπορεί να ανασταλεί με την παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης Fe, Ca, Mg και P [93, 97].

Η έλλειψη Mn προκαλεί στον άνθρωπο πόνους στα μάτια και τα αυτιά, απώλεια μνήμης, ζάλη, διαταραχές στον αναπαραγωγικό κύκλο, αθηροσκλήρωση. Αντίθετα, η μακροχρόνια πρόσληψη υψηλών συγκεντρώσεων Mn μπορεί να καταστρέψει τα βασικά γάγγλια του εγκεφάλου προκαλώντας Πάρκινσον [93].

Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη είναι 2-5 mg [99]. Πηγές πλούσιες σε Mn είναι τα δημητριακά ολικής άλεσης, οι ξηροί καρποί, τα αυγά, τα πράσινα λαχανικά, ο καφές, τα φασόλια, τα μπιζέλια κα.

3.3.6 Χαλκός (Cu)

Ο χαλκός βοηθά στην απορρόφηση, την αποθήκευση και το μεταβολισμό του Fe [93]. Συμβάλλει στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και αποτελεί συστατικό διαφόρων ενζύμων του νευρικού συστήματος [97]. Δρα συνεργιστικά με τον Zn και τη βιταμίνη C για το σχηματισμό ελαστίνης. Συμμετέχει στην ανάπτυξη και συντήρηση του καρδιακού συστήματος, στην επούλωση πληγών και στην παραγωγή ενέργειας. Προστατεύει διάφορα όργανα όπως το συκώτι, τον εγκέφαλο και τους πνεύμονες από οξειδωτικές αντιδράσεις [93].

Έλλειψη Cu παρατηρείται σπάνια. Το ανθρώπινο σώμα περιέχει περίπου 50-120 mg Cu. Όταν υπάρξει έλλειψή του, πιθανόν να προκληθεί αναιμία, καθυστέρηση στην ανάπτυξη, σκελετικές ανωμαλίες και προβλήματα στο νευρικό σύστημα. Η σύντομη έκθεση σε μεγάλες ποσότητες Cu προκαλεί γαστρεντερικές παθήσεις, ναυτία, αναιμία, διάρροια, πονοκέφαλο, αίσθηση μεταλλικής γεύσης στο στόμα και δερματίτιδα [93]. Η μακροχρόνια έκθεση στον Cu προκαλεί βλάβες στο ήπαρ και στα νεφρά.

Ως ημερήσια πρόσληψη συνιστάται το 1.1 mg [99]. Τρόφιμα πλούσια σε Cu είναι τα οστρακοειδή, οι γαρίδες, το συκώτι, τα καρύδια, το μαύρο πιπέρι, το κακάο, τα όσπρια.

3.3.7 Σελήνιο (Se)

Το σελήνιο έχει κυρίως αντιοξειδωτική δράση. Ως ισχυρό αντιοξειδωτικό αναστέλλει την οξείδωση του λίπους. Δρα συνεργιστικά με την βιταμίνη Ε για την παραγωγή αντισωμάτων, ενισχύοντας το ανοσοποιητικό σύστημα. Παίζει ρόλο στην αναπαραγωγική λειτουργία των ανδρών. Στην ιατρική χρησιμοποιούνται συμπληρώματα Se για να θεραπεύσουν ασθένειες όπως την κίρρωση του ήπατος, τον καρκίνο, τη στειρότητα, τις καρδιακές παθήσεις, τη γήρανση και την υψηλή χοληστερόλη [93]. Δρα ανταγωνιστικά έναντι του Hg, μειώνοντας την πρόσληψή του από τον οργανισμό [96].

Η ανεπάρκεια Se μειώνει τη δραστικότητα των ενζύμων που εξαρτώνται από το Se προκαλώντας βλάβες στους μυϊκούς ιστούς, συμπεριλαμβάνοντας και των μυών της καρδιάς. Επίσης μπορεί να προκαλέσει πρόωση γήρανση, μειωμένη όραση, νευρικές διαταραχές, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις Se προκαλούν αλλοιώσεις στο δέρμα, τα μαλλιά και τα νύχια [93].

Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη είναι τα 55 μg [99]. Καλές πηγές Se είναι τα θαλασσινά (κυρίως στρείδια), τα καρύδια, ορισμένα λαχανικά και τα εμπλουτισμένα δημητριακά.

3.3.8 Χρώμιο (Cr)

Το χρώμιο είναι απαραίτητο στοιχείο για το μεταβολισμό της γλυκόζης, του λίπους και των υδατανθράκων. Ενισχύει τη δράση της ινσουλίνης [93]. Στους οργανισμούς βρίσκεται υπό την τρισθενή μορφή του, ενώ η εξασθενής του θεωρείται τοξική.

Χαμηλές συγκεντρώσεις Cr προκαλούν κούραση, άγχος, δυσανεξία στη γλυκόζη, ανεπάρκεια στο μεταβολισμό των αμινοξέων, νευροπάθεια, αυξημένο κίνδυνο

αρτηριοσκλήρυνσης. Υψηλές συγκεντρώσεις δημιουργούν ερεθισμούς στο στομάχι, ανεπάρκεια στα νεφρά και στο ήπαρ [93,100].

Συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη είναι τα 45 μg [99] και πηγές πρόσληψης Cr είναι το μοσχάρι, το συκώτι, τα ψάρια, το κοτόπουλο, τα αυγά, οι πατάτες, οι μπανάνες.

3.3.9 Νικέλιο (Ni)

Η δράση του νικελίου στον ανθρώπινο οργανισμό είναι ακόμα ασαφής και είναι απαραίτητες περαιτέρω έρευνες [93,100]. Πιθανόν το Ni να παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των ορμονών και των λιπιδίων [100]. Επίσης ίσως να συμμετέχει ως ενεργοποιητής στη δράση κάποιων ενζύμων και να εμπλέκεται στο μεταβολισμό της γλυκόζης [93,100].

Άνθρωποι που προσλαμβάνουν υψηλές συγκεντρώσεις Ni λόγω εργασίας παρουσιάζουν νεφροτοξικότητα, υψηλή αρτηριακή πίεση, καρκίνο στους πνεύμονες, ίλιγγο, ναυτία, πονοκέφαλο, εμετό. Επηρεάζονται επίσης το συκώτι, τα νεφρά, η σπλήνα και ο εγκέφαλος [93].

Η ημερήσια πρόσληψη Ni μπορεί να ποικίλει σημαντικά, ανάλογα με τις διατροφικές συνήθειες των χωρών και κυμαίνεται 100-800μg/ημέρα. Η μέση πρόσληψη Ni από τη διατροφή στις περισσότερες χώρες είναι 100-300 μg/ημέρα [101]. Πηγές πλούσιες σε Ni είναι τα δημητριακά, τα λαχανικά, τα όσπρια, τα ψάρια, τα οστρακοειδή κλπ.

3.4 Τοξικά μέταλλα

3.4.1 Κάδμιο (Cd)

Το κάδμιο βρίσκεται φυσικά στο περιβάλλον και προέρχεται κυρίως από ηφαιστειογενείς παράγοντες και την αποσάθρωση του εδάφους. Η συγκέντρωσή του όμως έχει αυξηθεί, λόγω της ρύπανσης του περιβάλλοντος από ανθρώπινες δραστηριότητες [102].

Η αύξηση των συγκεντρώσεων του Cd έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση των στοιχείων Zn, Ca, Fe και Cu στους ιστούς των οργανισμών αλλοιώνοντας την λειτουργία τους [103]. Επίσης, ενώνεται με τις σουλφυδριλικές ομάδες ενζύμων τροποποιώντας τις βιοχημικές και λειτουργικές τους δράσεις [102]. Πιθανόν να παρεμποδίζει και να διακόπτει τη δράση της μεταλλοθειονίνης [97]. Επίσης, πιθανόν να καταστρέφει το θυροειδή αδένα και το καρδιοαναπνευστικό σύστημα, να αποθηκεύεται στα νεφρά, στους πνεύμονες, στο ήπαρ, στους όρχεις, στις ωοθήκες και

στους μύες, προκαλώντας βλάβες στη λειτουργία τους. Σχετίζεται με τον καρκίνο και τη θνησιμότητα [102-104]. Η πρόσληψή του γίνεται κυρίως μέσω του αέρα, του νερού και του καπνίσματος [93].

3.4.2 Μόλυβδος (Pb)

Η αύξηση της συγκέντρωσης του μολύβδου έχει πραγματοποιηθεί κυρίως λόγω της βιομηχανοποίησης και της εκπομπής ρύπων των αυτοκινήτων (χρήση μη-αμόλυβδης βενζίνης) [97,104].

Ο Pb αντικαθιστά το Ca λόγω παρόμοιου φορτίου και μεγέθους [105]. Αντιδρά με τις σουλφυδριλικές ομάδες διαφόρων ενζύμων αδρανοποιώντας τη δράση τους [106]. Επηρεάζει το κεντρικό νευρικό, το αιματολογικό και το νεφρικό σύστημα [107-109]. Εμποδίζει τη δράση του Fe επεμβαίνοντας στη σύνθεση της αίμης. Η απορρόφησή του από το έντερο αυξάνεται με τη μείωση των επιπέδων Fe, Zn και Cu [109]. Παρεμποδίζει την παραγωγή ερυθρών κυττάρων στο μυελό των οστών [108]. Στα νήπια και τα παιδιά προκαλεί καθυστέρηση της φυσικής ή διανοητικής τους ανάπτυξης, μειώνει τη δυνατότητα συγκέντρωσης και την ικανότητα εκμάθησης [108,109]. Προκαλεί βλάβες στα νεφρά, στο νευρικό, ενδοκρινικό και αναπαραγωγικό σύστημα. Συμπτώματα που παρουσιάζονται ύστερα από δηλητηρίαση με Pb είναι η ανορεξία, τα κοιλιακά άλγη, οι εμετοί, η εγκεφαλοπάθεια, η αναιμία, η περιφερική νευροπάθεια [104,107]. Προσλαμβάνεται κυρίως μέσω της αναπνευστικής οδού [97].

3.4.3 Υδράργυρος (Hg)

Ο υδράργυρος εντοπίζεται κυρίως στους υδάτινους οργανισμούς. Σύμφωνα με την Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA 2011a και 2011b), το μεγαλύτερο ποσοστό υδραργύρου στους θαλάσσιους οργανισμούς είναι σε οργανική μορφή (μεθυλυδράργυρος), η οποία θεωρείται πιο τοξική από την ανόργανη [110,111]. Δρα κυρίως ως νευροτοξίνη οδηγώντας σε διαταραχές της συμπεριφοράς του ατόμου. Προκαλεί χρόνιες, μη αναστρέψιμες βλάβες του εγκεφάλου, των νεφρών και των πνευμόνων. Αυξάνει την αρτηριακή πίεση, εμφανίζει αλλεργίες και οδηγεί σε θνησιμότητα [110-112]. Τα έμβρυα και τα νήπια άμεσα προσλαμβάνουν τον υδράργυρο από τη μητέρα με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η νευρολογική τους ανάπτυξη [112]. Η οξεία δηλητηρίαση από Hg επηρεάζει τα νεφρικά σωληνάρια και το γαστρεντερικό σωλήνα [111]. Η πρόσληψή του γίνεται κυρίως από την κατανάλωση

μεγάλων και λιπαρών ψαριών όπως τον τόνο, τον ξιφία, τη φάλαινα και τον καρχαρία [112,113].

3.5 Πρόσφατες μελέτες μετάλλων και μεταλλοειδών στις γαρίδες

Οι θαλάσσιοι οργανισμοί και συγκεκριμένα οι γαρίδες λαμβάνουν τα μέταλλα και τα μεταλλοειδή από το νερό και την τροφή. Τα ανόργανα συστατικά στους θαλάσσιους οργανισμούς συμμετέχουν κυρίως στη δράση των ενζύμων και παίζουν καταλυτικό ρόλο στην παραγωγή των ορμονών τους. Γαρίδες ιχθυοκαλλιέργειας (οικ. Penaeid) που είχαν ελεγχόμενη διατροφή μακροστοιχείων και ιχνοστοιχείων παρατηρήθηκε να έχουν βελτίωση στην ανάπτυξη, την υγεία και το αναπαραγωγικό τους σύστημα [115].

Ο Oksuz et al. (2009) μελετώντας τις γαρίδες *P. longirostris* και *P. martia* προσδιόρισαν τις συγκεντρώσεις διαφόρων μετάλλων στο βρώσιμο τμήμα τους και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα επίπεδα των μετάλλων αυτών ήταν σε επιθυμητά όρια καθιστώντας τις γαρίδες κατάλληλες προς κατανάλωση. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις που βρέθηκαν σε Mg ήταν 382 και 579, σε P ήταν 933 και 1344.6, σε Fe ήταν 18 και 2.0, σε Cu ήταν 2.2 και 2.83, σε Mn ήταν 0.729 και 0.145, σε Cr ήταν 0.098 και 0.099 και σε Zn ήταν 6.1 και 5.87mg/kg νωπού ιστού στις *P. longirostris* και στις *P. martia* αντίστοιχα [116].

Παρόλο που οι γαρίδες μπορούν να προσφέρουν στον άνθρωπο τα απαραίτητα στοιχεία για μια ισορροπημένη διατροφή, συγχρόνως αποτελούν πηγή πρόσληψης τοξικών μετάλλων. Για τον λόγο αυτό, οι γαρίδες κρίνονται ως ιδανικά θαλάσσια είδη κατάλληλα για τον έλεγχο της ρύπανσης των υδάτων.

Οι συγκεντρώσεων των μετάλλων και των μεταλλοειδών που παρατηρούνται στις γαρίδες οφείλονται σε διάφορους παράγοντες όπως τη διατροφή, τη χρονική περίοδο αλίευσης, την ηλικία, το φύλο, την έκδυση, την αλατότητα, το γεωγραφικό πλάτος [116-118].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4
ΑΡΣΕΝΙΚΟ
ΕΝΑ ΙΔΙΑΙΤΕΡΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ

4.1 Εισαγωγή

Το αρσενικό (As) είναι γνωστό από την αρχαιότητα για την τοξικότητά του. Μεγάλη φήμη για τη δηλητηριώδη ιδιότητά του απέκτησε κατά την περίοδο του μεσαίωνα όπου το αποκαλούσαν “βασιλιά των δηλητηρίων”. Ο Ναπολέων Βοναπάρτης πιθανόν να δηλητηριάστηκε με As το 1851 [119].

Παρόλη τη μεγάλη φήμη του για τις τοξικές του ιδιότητες, χρησιμοποιούνταν στην ιατρική για τη θεραπεία ορισμένων ασθενειών. Υπάρχουν τεκμηριωμένες αποδείξεις για τη χρήση του ως θεραπευτικό μέσο γύρω στο 2000 π.Χ. Ο πατέρας της ιατρικής, Ιπποκράτης, πιστεύεται ότι χρησιμοποιούσε As για τη θεραπεία του έλκους. Ο Αριστοτέλης επίσης αναφέρει ότι χρησιμοποιούσαν As σε ασθενείς [119]. Η αποκορύφωση της χρήσης του As ως στοιχείο με ευεργετικές ιδιότητες πραγματοποιήθηκε το 1786, όπου ανακαλύφθηκε ένα διάλυμα αρσενικού (1% $KAsO_2$) που χρησιμοποιούσαν για τη θεραπεία της ελονοσίας, της σύφιλης, του άσθματος, του εκζέματος και της ψωρίασης. Τέλος, υπάρχουν αναφορές για τη χρήση του κατά του καρκίνου του δέρματος και του μαστού [119]. Άρα δικαίως χαρακτηρίζεται ως ένα ιδιαίτερο στοιχείο που κεντρίζει το ενδιαφέρον των επιστημόνων, είτε για τις τοξικές του είτε για τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Πιθανόν στο μέλλον να προστεθεί στην ομάδα των μικροστοιχείων ως απαραίτητο στοιχείο για την ισορροπία του οργανισμού [93, 119].

Λόγω της ιδιαιτερότητας του As, τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό μεγάλου αριθμού ενώσεων As που απαντώνται στο περιβάλλον. Ο συνδυασμός δύο τεχνικών χημικής ανάλυσης, της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης και της φασματομετρίας μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, HPLC-ICPMS) είναι η αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται συχνά για την ειδοταυτοποίηση τέτοιων ενώσεων [120,121]. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή διότι θεωρείται ένα χρήσιμο εργαλείο το οποίο παρέχει ικανοποιητικό διαχωρισμό των ενώσεων, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα [120-122].

4.2 Αρσενικό (As)

Το As που υπάρχει στο περιβάλλον προέρχεται τόσο από φυσικές πηγές όπως ηφαιστειακή δραστηριότητα και αποσάθρωση των πετρωμάτων όσο και από ανθρωπογενείς δραστηριότητες όπως μεταλλουργία, καύση ορυκτών, χρήση εντομοκτόνων [124,125]. Το As απαντάται υπό ανόργανη (iAs) ή οργανική (org-As) μορφή. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η οργανική του μορφή παρουσιάζει αμελητέα ή/και μηδενική τοξικότητα για τους οργανισμούς συγκριτικά με την ανόργανη μορφή του. Η τρισθενής μορφή του αρσενικού (As^{3+}) και η πεντασθενής μορφή του (As^{5+}) θεωρούνται άκρως τοξικές [111,112,124-127]. Έχει αποδειχθεί ότι άτομα που κατανάλωναν, επί σειρά ετών, πόσιμο νερό με υψηλές συγκεντρώσεις iAs, όπως στις περιοχές Μπαγκλαντές και Ταϊβάν, παρουσίασαν καρκίνο στους πνεύμονες, στο δέρμα και στην ουροδόχο κύστη [127]. Πιστεύεται όμως ότι το iAs σε θαλάσσιους οργανισμούς όπως στα φύκη, μεθυλιώνεται δίνοντας οργανικά παράγωγα. Οι οργανισμοί αυτοί προσλαμβάνουν το iAs από το θαλάσσιο νερό και λόγω της προσπάθειας τους για αποτοξίνωση, το μετασχηματίζουν σε οργανικές δομές μη τοξικές ή λιγότερο τοξικές [124-126]. Για παράδειγμα, η αρσενοβεταΐνη (arsenobetaine, AB) και η αρσενοχολίνη (arsenocholine, AC) (οργανικές ενώσεις) που έχουν ανιχνευτεί σε αρκετούς θαλάσσιους οργανισμούς και σε υψηλές συγκεντρώσεις, δεν παρουσίασαν τοξικές ιδιότητες [128,129]. Οι ίδιες ενώσεις παρατηρήθηκαν αμετάβλητες και σε ανθρώπινα ούρα, παρουσιάζοντας μηδενική τοξικότητα [130]. Όμως η τοξικότητα άλλων οργανικών ενώσεων, πλην των AB και AC είναι ακόμα υπό συζήτηση και μελέτη [123,124,128-130].

4.3 Δομές αρσενικού (iAs και org-As)

Όπως ήδη έχει τονισθεί, το As εντοπίζεται σε ανόργανη και οργανική δομή. Η ανόργανη δομή του είναι As^{3+} και As^{5+}. Οι οργανικές ενώσεις ανάλογα με την διαλυτότητά τους στο νερό ή στο λίπος ονομάζονται υδατοδιαλυτές ή λιποδιαλυτές (αρσενολιπίδια) αντίστοιχα [131]. Ο Lunde στη δεκαετία ‘60 ήταν ο πρώτος που μελέτησε το As στο λιποδιαλυτό κλάσμα [132].

Οργανικές και ανόργανες ενώσεις As έχουν βρεθεί σε διάφορα θαλάσσια διαμερίσματα και σε πολλούς θαλάσσιους οργανισμούς [131]. Παρακάτω δίνεται εν συντομία η κατανομή των χημικών ενώσεων του As στα διάφορα θαλάσσια διαμερίσματα όπως επισημαίνονται από τους Francesconi και Edmonds (1996) [133] (πίνακας 4-1).

Πίνακας 4-1: Κατανομή των χημικών ενώσεων As στα διάφορα θαλάσσια διαμερίσματα [133]

ΙΖΗΜΑΤΑ	ΘΑΛΑΣΣΙΝΟ ΝΕΡΟ
Κυρίαρχα: As(v) και As(III) **Μικροποσότητες**: MMA, DMA **Ιχνοποσότητες**: TMAO **Μη ανιχνεύσιμα**: AB, TeMA, AC, As-sug	**Κυρίαρχα**: As(v) και As(III) **Μικροποσότητες**: MMA, DMA **Μη ανιχνεύσιμα**: AB, TeMA, AC, As-sug
ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΦΥΚΗ	**ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΖΩΑ**
Κυρίαρχα: As-sug **Μικροποσότητες**: As(v) **Ιχνοποσότητες**: MMA, DMA **Μη ανιχνεύσιμα**: AB, TeMA, AC	**Κυρίαρχα**: AB **Μικροποσότητες**:TeMA, As-sug **Ιχνοποσότητες:** TMAO, AC, As(v) και As(III), DMA

4.3.1 Ανόργανο αρσενικό (iAs)

Σε θαλάσσιους οργανισμούς το ανόργανο αρσενικό βρίσκεται σε ποσοστό μικρότερο από 1% του ολικού αρσενικού (tAs) με εξαίρεση τα φύκη *Hizika fusiforme* και τα μύδια *Mytilus edilus* τα οποία περιείχαν ποσοστά άνω των 50% και 40% tAs αντίστοιχα [134]. Οι οργανισμοί προσλαμβάνουν το αρσενικό είτε άμεσα από το νερό είτε έμμεσα καταναλώνοντας άλλους οργανισμούς που περιέχουν tAs [124]. Οι οργανισμοί αυτοί προσλαμβάνουν το As, επειδή το As παρουσιάζει παρόμοιες χημικές ιδιότητες με τον φωσφόρο (P), το οποίο αποτελεί θρεπτικό συστατικό των οργανισμών. Τα δύο αυτά στοιχεία ανήκουν στην 15^{η} ομάδα του περιοδικού πίνακα [119].

4.3.2 Οργανικό αρσενικό (org-As)

4.3.2.1 Υδατοδιαλυτές ενώσεις org-As

Μέχρι σήμερα παραπάνω από 50 υδατοδιαλυτές ενώσεις οργανικού αρσενικού έχουν ανιχνευτεί στο θαλάσσιο περιβάλλον [124]. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων δίνονται στον πίνακα 4-2 που ακολουθεί. Από αυτές τις ενώσεις η πιο σημαντική που προσδιορίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι η αρσενοβεταΐνη (μη τοξική). Συγκεκριμένα, έχει προσδιοριστεί σε ποσοστά άνω του 90% του tAs σε ψάρια, δίθυρα και μαλακόστρακα. Η AB ανιχνεύτηκε, για πρώτη φορά το 1977 στον αστακό *Panulirus Cygnus* [135].

Συνήθως οι οργανικές ενώσεις μέθυλο-αρσονικικό οξύ (methylarsonate, MA^{v}), διμεθυλο-αρσενικικό οξύ (dimethylarsinate, DMA^{v}), αρσενοχολίνη (AC), οξείδιο της τριμεθυλαρσίνης (trimethylarsine oxide, TMAO) και ιόν της τετραμεθυλαρσίνης (tetramethylarsonium ion, TETRA) ανιχνεύονται σε μικρότερα ποσοστά στους υδάτινους οργανισμούς. Εξαιρέσεις παρουσιάστηκαν στα είδη *Kyphosus syndeyanus* (είδος ψαριού) και *Dermochelys coriacea* (είδος χελώνας), όπου στο πρώτο, κύρια ένωση αρσενικών βρέθηκε το TMAO, ενώ στη χελώνα η AC. Επίσης ενώσεις αρσενοσακχάρων έχουν ταυτοποιηθεί σε θαλάσσιους οργανισμούς όπως φύκη, μαλάκια και γαστρόποδα καταλαμβάνοντας ποσοστά μεγαλύτερα του 15% tAs [136].

Πίνακας 4-2: Υδατοδιαλυτές ενώσεις οργανικού αρσενικού [120]

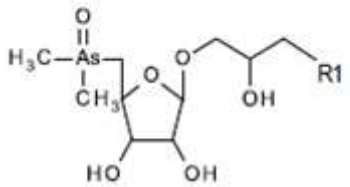
Ακρωνύμια	Υδατοδιαλυτές ενώσεις As	Δομές
MA(V)	Μεθυλο-αρσονινικό	$As(O^-)_3$
DMA(V)	Διμεθυλο-αρσενινικό	$(CH_3)_2AsO(O^-)$
AB	Αρσενοβεταΐνη	$(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$
AC	Αρσενοχολίνη	$(CH_3)_3AsO$
TMAO	Οξείδιο της τριμεθυλαρσίνης	$(CH_3)_3As^+CH_2CH_2OH$
TETRA	Ιόν της τετραμεθυλαρσίνης	$(CH_3)_4As^+$

Αρσενοσάκχαρο 1: R=OH

Αρσενοσάκχαρο 2:
R = $OP(O)(OH)OCH_2CH(OH)CH_2OH$

Αρσενοσάκχαρο 3: R=SO_3^-

Αρσενοσάκχαρο 4:R =OSO_3^-

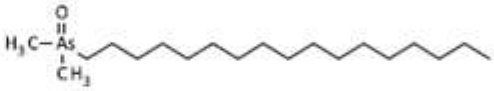
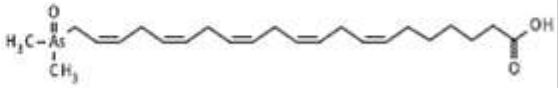
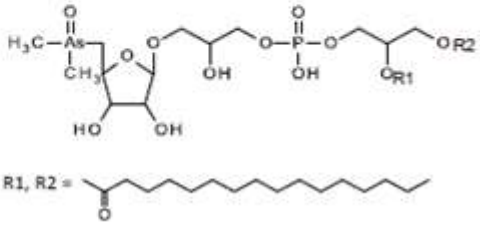


4.3.2.2 Λιποδιαλυτές ενώσεις org-As

Παρουσία αρσενικού στο λίπος (αρσενολιπίδια) παρατηρήθηκε για πρώτη φορά τον 20° αιώνα στο μουρουνέλαιο (oil of cod liver) σε συγκεντρώσεις από 1.4-5.1 mg/kg λίπους [137]. Συνήθως οι συγκεντρώσεις των αρσενολιπιδίων σε θαλάσσια είδη, κυμαίνονται από 0.2 έως 19.3 mg/kg λίπους. Επίσης σε θαλάσσιους οργανισμούς, τα αρσενολιπίδια αποτελούν το 10-30% του tAs [138]. Πολύ υψηλότερα ποσοστά αρσενολιπιδίων ανιχνεύτηκαν στο σολομό *Thunnus* (87% tAs) [139] και στη φώκια *Phoco hispida* (90% tAs) [140]. Από τότε έχουν πραγματοποιηθεί εκτενείς μελέτες, για την ειδοταυτοποίηση ενώσεων As. Μέχρι στιγμής έχουν προσδιοριστεί τέσσερις

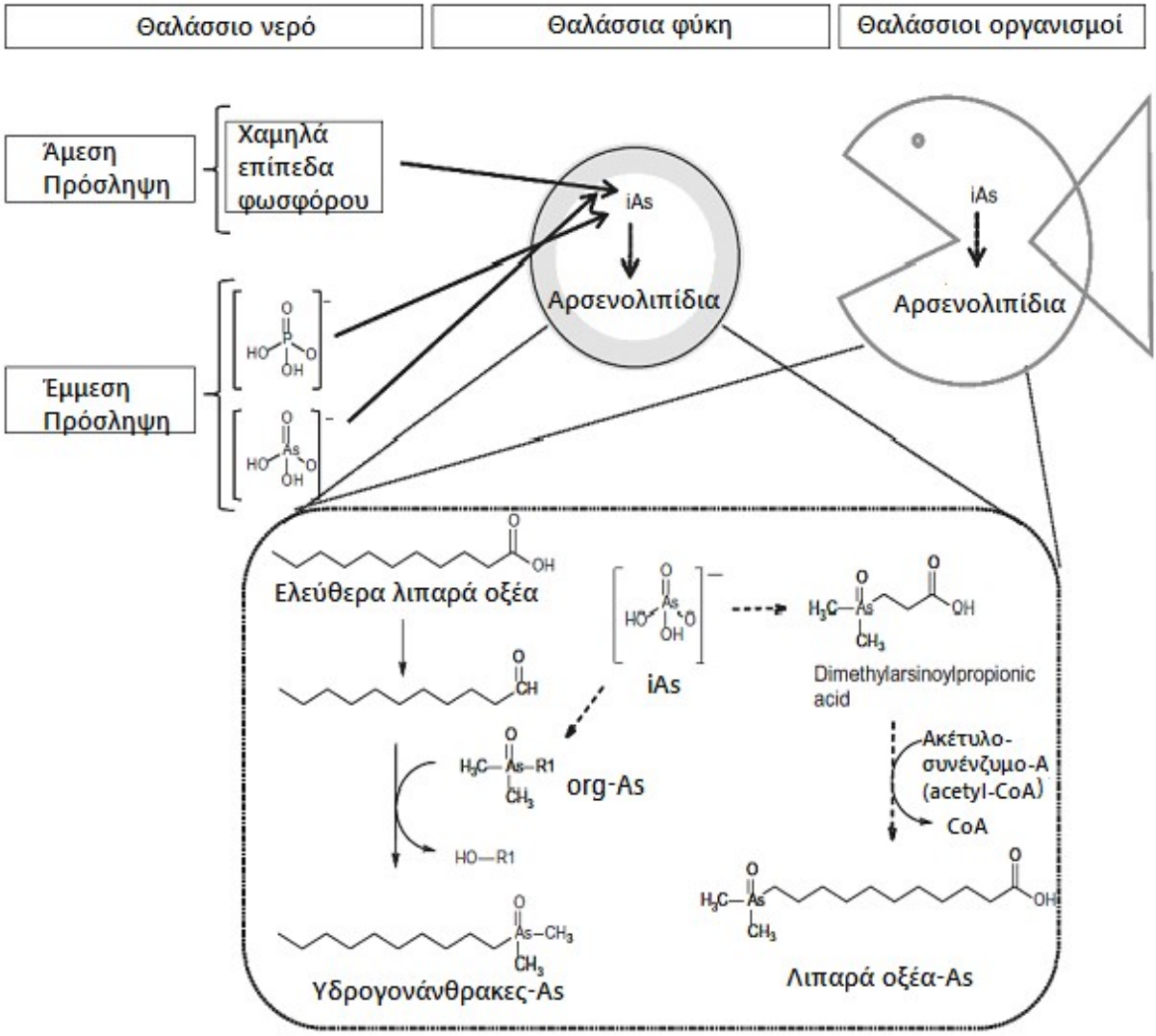
ομάδες αρσενολιπιδίων σε θαλάσσιους οργανισμούς, α) υδρογονάνθρακες που περιέχουν αρσενικό (arsenic-containing hydrocarbons, AsHCs), β) λιπαρά οξέα που περιέχουν αρσενικό (arsenic-containing fatty acids, AsFAs), γ) τριμεθυλιωμένες λιπαρές αλκοόλες αρσενικού (trimethylated arsenic fatty alcohols, TMAsFOHs) και δ) φωσφολιπίδια ενωμένα με αρσενοσάκχαρα (arsenosugar phospholipids, As-sugPLs) (πίνακας 4-3) [124]. Οι Morita και Shibata (1988) ήταν οι πρώτοι ερευνητές που ταυτοποίησαν ένωση με δομή As-sugPL στα φύκη *Undaria pinnafitida* [141], ενώ ο Rumpler και οι συνεργάτες του (2008) προσδιόρισαν ενώσεις της δομής AsFAs στο μουρουνέλαιο [142]. Τέλος, ενώσεις με δομές AsHCs [143] και TMAsFOHs [144] ανιχνεύτηκαν στο λίπος του καπελάνου (είδος ψαριού) από τους Taleshi et al. (2008) και Amayo et al. (2013) αντιστοίχως.

Πίνακας 4-3: Λιποδιαλυτές ενώσεις αρσενικού [124]

Ακρωνύμια	Λιποδιαλυτές ενώσεις As	Δομές
AsHC-C_{17}	Υδρογονάνθρακες-As	
AsFA-C_{21}	Λιπαρά οξέα-As	
TMAsFOH-C_{21}	Τριμεθυλιωμένες αλκοόλες-As	
As-sugPL$_{958}$	Φωσφολιπίδια-Αρσενοσάκχαρα	

Εκτός από την ειδοταυτοποίηση του As, βασικός στόχος των ερευνητών είναι να διατυπώσουν πιθανούς χημικούς μηχανισμούς παραγωγής αρσενολιπιδίων ώστε να δώσουν απαντήσεις για τον κύκλο του As στους οργανισμούς. Πιστεύεται ότι τα αρσενολιπίδια παράγονται στα φύκη και μεταφέρονται μέσω της τροφικής αλυσίδας στους ανώτερους οργανισμούς (σχήμα 4-1). Για παράδειγμα, ο Wrench και η ομάδα του (1979) αναφέρουν έναν τέτοιο πιθανό μηχανισμό. Συγκεκριμένα αναφέρουν ότι το

As που βρισκόταν στο θαλάσσιο νερό απορροφήθηκε από το φυτοπλαγκτό *Dunaliella marina*, στη συνέχεια αυτό μετασχηματίστηκε σε λιποδιαλυτό As και μεταφέρθηκε στο ζωοπλαγκτό *Artemia salina*, το οποίο καταναλώθηκε από τη γαρίδα *Lysmata seticaudata* [145].



Σχήμα 4-1: Αναπαράσταση του κύκλου του As στους οργανισμούς και πιθανοί μηχανισμοί παραγωγής αρσενολιπιδίων [120]

4.4 Πρόσφατες μελέτες αρσενικού στις γαρίδες

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι στο θαλάσσιο περιβάλλον υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις As, οι οποίες οφείλονται κυρίως σε ηφαιστειογενείς δραστηριότητες και λιγότερο σε ανθρώπινες. Οι Francesconi και Edmonds (1996) εστιάζοντας την έρευνά τους σε διάφορα θαλάσσια είδη συμπεριλαμβανομένων και των γαρίδων, όντως παρατήρησαν υψηλές συγκεντρώσεις tAs, οι οποίες κυμαίνονταν από 1-100 mg/kg ww [133]. Μια νεότερη έρευνα, του Julshamn και της ομάδα του

(2004), αναφέρει συγκεντρώσεις tAs που κυμαίνονταν από 13 έως 96 mg/kg ww σε γαρίδες *P. borealis.*

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθεί, ότι η σχετική βιβλιογραφία που αφορά τη μελέτη του As στις γαρίδες είναι ακόμα περιορισμένη και στόχος είναι να πραγματοποιηθούν περισσότερες έρευνες επικεντρώνοντας στον διαχωρισμό του tAs σε iAs και org-As.

4.5 Αρσενικό και ανθρώπινη υγεία: Τοξικό ή όχι τελικά?

Όπως έχει επισημανθεί στην εισαγωγή (υποκεφάλαιο 4.1) το As είναι ένα ιδιαίτερο στοιχείο. Είναι αποδεδειγμένες οι τοξικές του ιδιότητες και μπορεί να δηλητηριάσει τον ανθρώπινο οργανισμό, μέσω της στοματικής οδού και της εισπνοής [111,112,119]. Υψηλές συγκεντρώσεις tAs μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο στο συκώτι, στους πνεύμονες, αποβολή εμβρύου, στειρότητα, καρδιακές ανωμαλίες, εγκεφαλικές βλάβες, πιθανή καταστροφή της δομής του DNA, καθώς και αύξηση της αρτηριακή πίεσης οδηγώντας συχνά σε θνησιμότητα. Κύρια συμπτώματα που παρουσιάζονται σε περίπτωση δηλητηρίασης είναι η ναυτία, ο εμετός, η διάρροια, ο πόνος [119]. Το iAs και οι μεταβολίτες του, απεκκρίνονται στα ούρα σε 4-5 μέρες και παρουσιάζουν σχετικά χαμηλό ποσοστό βιοσυσσώρευσης [146].

Πιστεύεται ότι στον ανθρώπινο οργανισμό, το As^{3+} και As^{5+} μεθυλιώνονται σε μονομεθυλαρσονικικό οξύ (MMA) και διμεθυλαρσενικικό οξύ (DMA). Η επικρατέστερη θεωρία είναι αυτή του Cullen και της ομάδας του (1989), όπου αναφέρουν ότι μέσω μια σειράς οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων και αντιδράσεων μεθυλίωσης, το As^{3}+ και As^{5}+ μετασχηματίζονται δίνοντας ως παράγωγα τα MMA^{III}, MMA^{v}, DMA^{III} και DMA^{v} [147]. Πιθανόν η μεθυλίωση του iAs σε org-As να πραγματοποιείται για την αποτοξίνωση του οργανισμού [130,148]. Έχει όμως παρατηρηθεί ότι στα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα το παράγωγο MMA^{III} είναι πιο τοξικό από τις υπόλοιπες δομές του As (MMA^{III}>As^{III}>As^{v}>MMA^{v}=DMA^{v}) [149]. Στα ούρα, συνήθως τα ποσοστά που προσδιορίζονται είναι 10-30% iAs, 10-20% MMA^{V} και 60-70% DMA^{V} [150]. Η έρευνα αυτή, έρχεται να συμπληρωθεί από μια άλλη έρευνα, που αποδεικνύει ότι ο ανθρώπινος οργανισμός έχει την ικανότητα να μετασχηματίζει το iAs γρήγορα σε DMA^{v} [149] και γι'αυτό πιθανόν το DMA^{v} να ανιχνεύεται σε μεγαλύτερα ποσοστά στα ούρα.

Ο Schmeisser et al. το 2006 πραγματοποιώντας έρευνα σε δύο εθελοντές ανίχνευσε μόνο οργανικές ενώσεις ενισχύοντας την θεωρία του Cullen και της ομάδας του (1989), ότι δηλαδή, το As^{3}+ και το As^{5}+ μετασχηματίζονται δίνοντας οργανικά παράγωγα. Οι

συγκεκριμένοι εθελοντές κατανάλωσαν μουρουνέλαιο με συγκέντρωση tAs 1.0-3.3 mg/kg. Στα ούρα τους προσδιορίστηκαν DMA^{V}, μια αμετάβλητη ποσότητα αρσενοβεταΐνης (AB) και 4 ενώσεις DMA συνδεδεμένες με λιπαρά οξέα, οι οποίες προήλθαν από αρσενολιπίδια [150].

Μία άλλη έρευνα που πραγματοποίησε η Molin και οι συνεργάτες της (2012) πάλι σε ανθρώπινα ούρα πιθανόν να έρχεται να συμπληρώσει τη θεωρία του Schmeisser και της ομάδας του (2006). Αναλυτικότερα, η ομάδα της Molin (2012) ανίχνευσε υψηλότερες συγκεντρώσεις AB από τις αναμενόμενες/υπολογιζόμενες τιμές στα ούρα εθελοντών, οι οποίοι ακολούθησαν συγκεκριμένη/καθορισμένη διατροφή. Γι'αυτό οι ερευνητές υπέθεσαν ότι στον ανθρώπινο οργανισμό τελικά, το DMA πιθανόν να μετασχηματίζεται περαιτέρω σε AB, ώστε να υπάρχει μηδενική τοξικότητα As [148].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια από τον Moxon το 1938, η οποία αναφέρει ότι το iAs^{III} παρουσίασε προστατευτική δράση έναντι της τοξικότητας του iSe^{iv}. Συγκεκριμένα, υψηλή συγκέντρωση iAs^{III} (5mg/L), την οποία αυτός πρόσθεσε, προστάτεψε τα ποντίκια από θανατηφόρα βλάβη στο συκώτι, η οποία θα προερχόταν από την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης iSe^{iv} (11 mg/kg) και την ταυτόχρονη απουσία As στον οργανισμό τους. Η αλληλεπίδραση των δύο στοιχείων στο συκώτι σχημάτισε ένα σύμπλοκο As-Se, το οποίο στη συνέχεια εκκρίθηκε στη χολή προστατεύοντας έτσι το συκώτι [151].

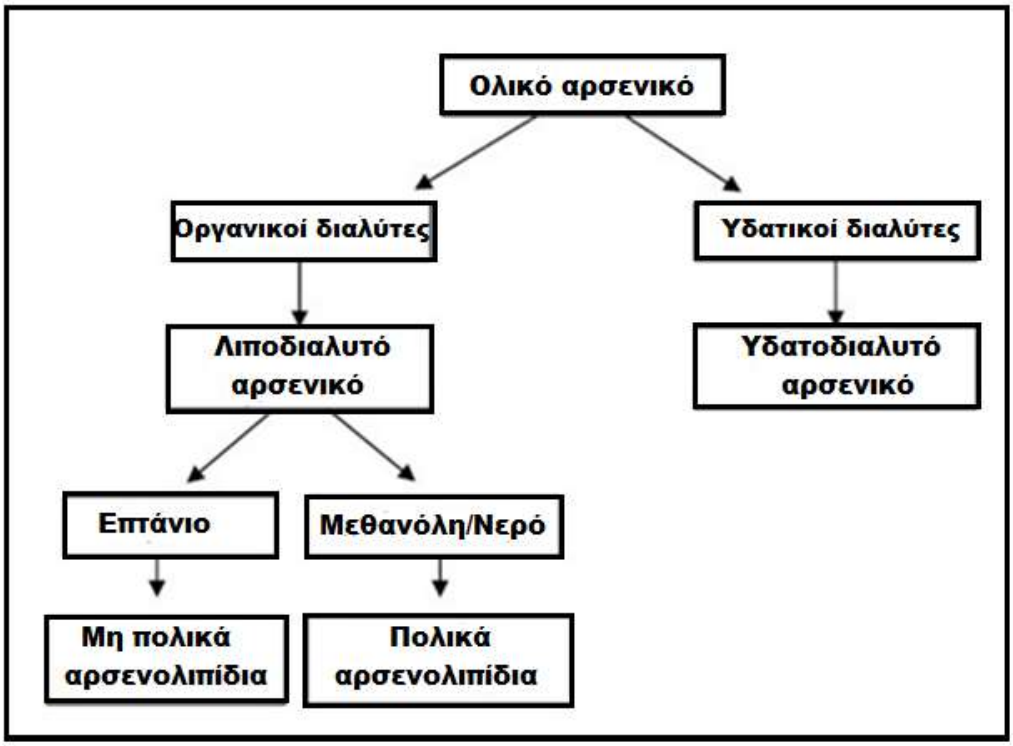
Σε αντίθεση όμως με αυτή την έρευνα, άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε πάλι σε ποντίκια από τους Levander και Baumann το 1966, αναφέρει ότι το As είχε ανασταλτική δράση στην αποβολή περίσσειας συγκέντρωσης Se από τον οργανισμό μέσω της αναπνοής. Οι οργανισμοί είχαν αναπτύξει ειδικούς μηχανισμούς ώστε μέσω της αναπνοής να αποβάλλουν την περίσσεια Se που προσλάμβαναν. Όμως η παρουσία του As, εμπόδιζε την αποβολή ενώσεων Se όπως της ένωσης $(CH_3)_2Se$ μέσω της αναπνοής αυξάνοντας ταυτόχρονα δραματικά την έκκριση του Se στη χολή [152].

Τελικά το As είναι ένα στοιχείο, το οποίο θα διατηρήσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων για αρκετά χρόνια, ώστε να δοθούν ολοκληρωμένες απαντήσεις σχετικά με την τοξικότητά του.

4.6 Ανάλυση αρσενικού

Σκοπός της ανάλυσης του αρσενικού είναι να προσδιορίσουμε αρχικά τη συγκέντρωση του ολικού αρσενικού, του οργανικού και ανόργανου As στους ιστούς (ξηρό/νωπό

ιστό). Στη συνέχεια, γίνεται εκχύλιση λίπους του δείγματος με οργανικούς και υδατικούς διαλύτες, συνήθως με χρήση Bligh-Dyer (χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό 1:2:0.8 v/v/v). Ύστερα από την παραλαβή του λίπους, προσδιορίζουμε το ολικό αρσενικό στο λίπος (αρσενολιπίδια). Για την ανάλυση των αρσενολιπιδίων προσθέτουμε οργανικούς διαλύτες (στην περίπτωσή μας επτάνιο) και υδατικούς (μεθανόλη/νερό 9:1 v/v). Στην φάση του επτανίου εκλούονται τα μη πολικά αρσενολιπίδια, ενώ στη μεθανολική φάση τα πολικά (σχήμα 4-2). Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ICPMS σε συνδυασμό με την HPLC.



Σχήμα 4-2: Ανάλυση As και των δομών του

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Δειγματοληψία

Η αλίευση 30 kg γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris* πραγματοποιήθηκε στην ευρύτερη περιοχή της Κυλλήνης (Μεσόγειος θάλασσα) από την εμπορική μηχανότρατα "Παναγία Φανερωμένη ΙΙ" τις περιόδους Μάρτιο και Σεπτέμβριο του 2011-2015. Πενήντα γαρίδες *P. borealis* αλιεύθηκαν τον Νοέμβριο του 2012 από την περιοχή Skagerrak (γνωστή ως Βόρεια θάλασσα, κοντά στη Δανία) (δες εικόνα 7-1). Οι γαρίδες (*P. longirostris*) από τη Μεσόγειο αποθηκεύτηκαν σε πάγο και μεταφέρθηκαν αμέσως στο εργαστήριο, ενώ οι γαρίδες (*P. borealis)* από τη Skagerrak, πρώτα βράστηκαν στο πλοίο και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε πάγο και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο. Στα συγκεκριμένα είδη εφαρμόσθηκαν οι τρόποι αλίευσης και επεξεργασίας τους σύμφωνα με τις τοπικές συνήθειες και νομοθεσίες, έτσι ώστε να εκτιμηθεί η διατροφική αξίας τους όπως ακριβώς καταναλώνονται στις τοπικές κοινωνίες. Στην Ελλάδα τοποθετούνται σε πάγο ώστε να διατηρούνται φρέσκες μέχρι να φτάσουν στον καταναλωτή. Στις σκανδιναβικές χώρες, οι γαρίδες βράζονται πάνω στο πλοίο αμέσως μετά την αλίευσή τους ώστε να διατηρηθεί η γεύση και το άρωμά τους και για να παραμείνουν φρέσκες [153,154]. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: αφού οι γαρίδες αλιευτούν, πλένονται και ρίχνονται ζωντανές σε δοχεία με θαλασσινό νερό θερμοκρασίας 10°C. Οι γαρίδες πρέπει να είναι λίγες, ώστε να υπάρχει αρκετός χώρος για να κολυμπούν ελεύθερα. Ένα τυπικό αλιευτικό, βράζει τις γαρίδες ανά παρτίδες των 18 kg γαρίδων, σε λέβητες που περιέχουν 90 L θαλασσινού νερού σε θερμοκρασία 101°C. Εν συνεχεία βράζονται για 6-7 min. Μετά τον βρασμό, η θερμοκρασία πέφτει στους 86°C, απομακρύνονται από τον λέβητα και καταψύχονται σε κατακόρυφους καταψύκτες. Οι γαρίδες τοποθετούνται σε σάκους πολυαιθυλενίου και περιβάλλονται με νερό, μέσα στον καταψύκτη. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στους -35°C για 90 min [153].

Κατά την επεξεργασία των δειγμάτων στο εργαστήριο, μετρήθηκαν το βάρος και το μήκος των γαρίδων. Ακολούθως έγινε αφαίρεση του κελύφους από την ουρά και η αφαίρεση των εντοσθίων. Διαχωρίστηκαν οι κεφαλοθώρακες από τους μύες και ζυγίστηκε το κάθε τμήμα ξεχωριστά. Ένα υποσύνολο δεκαπέντε γαρίδων απομονώθηκε και καταψύχθηκε για περαιτέρω διεργασίες όπως τον προσδιορισμό

υγρασίας, τέφρας και πρωτεϊνών, ενώ το υπόλοιπο σύνολο υπέστη εκχύλιση για την παραλαβή του ολικού λίπους.

5.2 Λυοφιλίωση

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος της λυοφιλίωσης στηρίζεται στην κατάψυξη του υλικού και στην περαιτέρω εξάχνωση του πάγου. Η λυοφιλίωση επιτυγχάνεται όταν εξασφαλιστούν συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης κάτω από το τριπλό σημείο του νερού, 0°C και 4.7 mmHg. Στην πράξη όμως, υπάρχει πίεση μικρότερη του 1mm στήλης Hg και θερμοκρασία από -4 εώς -16°C [155].

Όργανα και σκεύη

- Ποτήρι ζέσεως των 50 mL
- Labconco freezone 4.5

Αναλυτική Πορεία

Το δείγμα τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως των 50 mL, καταψύχεται και στη συνέχεια ζυγίζεται. Ύστερα, τοποθετείται στο όργανο για 48h. Ζυγίζεται εκ νέου μετά τη λυοφιλίωση.

5.3 Προσδιορισμός υγρασίας

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στον προσδιορισμό της περιεκτικότητα σε υγρασία η οποία πραγματοποιείται με τη μέτρηση της μάζας του δείγματος πριν και μετά την απομάκρυνση του νερού πχ με τη χρήση λυοφιλίωσης [156].

Αναλυτική Πορεία

Ζυγίζουμε το κατεψυγμένο δείγμα και στη συνέχεια το τοποθετούμε στο όργανο προς λυοφιλίωση. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της λυοφιλίωσης, ζυγίζουμε εκ νέου το λυοφιλιωμένο δείγμα. Συνεπώς ο υπολογισμός της υγρασίας γίνεται από τη διαφορά των τιμών βάρους της αρχικής και της τελικής ζύγισης του δείγματος, πριν και μετά τη λυοφιλίωση. Στη συνέχεια το λυοφιλιωμένο δείγμα τοποθετείται στον ξηραντήρα.

5.4 Προσδιορισμός τέφρας

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην τέλεια καύση του δείγματος. Το απομένον ανόργανο υπόλειμμα, ύστερα από την τέλεια καύση, ορίζεται ως τέφρα. Η τέφρα δεν ισοδυναμεί πάντοτε στο σύνολο των ανόργανων συστατικών του δείγματος. Με την καύση, κάποια ανόργανα συστατικά παθαίνουν οξείδωση ή απομακρύνονται ως πτητικές ουσίες (πχ ενώσεις Pb και Hg) ή παράγουν άλλες ουσίες [157].

Όργανα και σκεύη

- Πορσελάνινο χωνευτήρι
- Φούρνος
- Πυριαντήριο
- Ζυγός ακριβείας

Αναλυτική πορεία

Σε προζυγισμένο χωνευτήρι πορσελάνης ζυγίζεται 1 g δείγματος και τοποθετείται στο φούρνο στους 200°C για 2h μέχρι σταθερού βάρους. Ακολούθως, το υπόλειμμα αφήνεται στους 550°C για 5h μέχρι τέλειας καύσεως (αποτέφρωση). Αφού ψυχθεί μέχρι θερμοκρασίας περιβάλλοντος στον ξηραντήρα, ζυγίζεται το παραμένον άκαυστο υπόλειμμα. Υπολογίζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε τέφρα επί της % ξηρό ή νωπό ιστό [158].

5.5 Προσδιορισμός ολικού αζώτου-πρωτεϊνών με μέθοδο Kjeldahl

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην καύση του οργανικού αζώτου και στον περαιτέρω προσδιορισμό του υπό μορφή αμμωνίας. Αφού προσδιορισθεί το οργανικό άζωτο, με τη χρήση κατάλληλων συντελεστών μπορεί να υπολογισθεί το ποσοστό των πρωτεϊνών ($Σ_{ψάρια}$ = 6.25) [158].

Αντιδραστήρια

- Καταλύτες θειϊκό κάλιο (K_2SO_4) και ένυδρος θειϊκός χαλκός ($CuSO_4x5H_2O$)
- π. θειϊκό οξύ (H_2SO_4)
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH 40%)
- Βορικό οξύ (H_3BO_3 2%)
- Δείκτης ηλιανθίνης
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl 0.1N)

Όργανα και σκεύη

- Προχοΐδα
- Κωνικές φιάλες
- Συσκευή Kjeldahl
- Συσκευή απόσταξης

Αναλυτική πορεία

Η απελευθερωμένη στο διάλυμα αμμωνία παραλαμβάνεται ποσοτικά με απόσταξη σε διάλυμα βορικού οξέος (H_3BO_3). Ζυγίζονται 0.5-1.0 g δείγματος και μεταφέρονται στη φιάλη Kjeldahl. Προστίθενται οι καταλύτες (14 g K_2SO_4 και 1 g $CuSO_4x5H_2O$) και 20 mL π.H_2SO_4 ελεύθερου αζώτου. Μεταφέρονται οι σωλήνες στη συσκευή Kjeldahl. Η καύση διαρκεί περίπου 45-60 min. (το διάλυμα παίρνει γαλαζοπράσινο χρώμα). Διακόπτεται η θέρμανση και μεταφέρονται οι σωλήνες εκτός συσκευής για να κρυώσουν. Προστίθεται διπλάσιος όγκος νερού (40 mL) από αυτόν του οξέος, τριπλάσιος όγκος NaOH 40% (60 mL) και πραγματοποιείται απόσταξη υπό υδρατμούς. Το απόσταγμα συλλέγεται σε μια κωνική φιάλη η οποία περιέχει 60 mL H_3BO_3 2% και 1 mL δείκτη ηλιανθίνης, ενώ το σωληνάκι της συσκευής μέσω του οποίου συλλέγεται το απόσταγμα θα πρέπει να είναι βυθισμένο στο διάλυμα του βορικού οξέος, ώστε να μην υπάρχει απώλεια αμμωνίας. Η απόσταξη διαρκεί 3-4 min, μέχρι να συλλεχθούν 100 mL περίπου αποστάγματος. Ακολουθεί τιτλοδότηση του περιεχομένου της κωνικής φιάλης με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl 0.1N) και σύμφωνα με τον όγκο που καταναλώνεται υπολογίζεται το ολικό άζωτο. Το διάλυμα στο τελικό σημείο έχει πορτοκαλί χρώμα. Για σύγκριση γίνεται τυφλός προσδιορισμός [158].

5.6 Προσδιορισμός μετάλλων και μεταλλοειδών

5.6.1 Προσδιορισμός Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Se, Cr, Ni, As, Pb, Hg και Cd με ICP-MS

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην υγρή χώνευση των δειγμάτων με ισχυρά οξέα. Τα λυοφιλιωμένα δείγματα θρυμματίζονται/ομογενοποιούνται σε πορσελάνινο γουδί. Βασική αρχή της υγρής χώνευσης είναι ότι πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο πορσελάνινα, πλαστικά ή γυάλινα σκεύη. Πρέπει να αποφεύγεται επιμελώς η χρήση μεταλλικών σκευών, ενώ οι χειρισμοί γίνονταν πάντα με γάντια πολυαιθυλενίου. Όλα τα σκεύη, γυάλινα και μη, πριν ξεκινήσει η διαδικασία της χώνευσης πρέπει να

παλαιωθούν για μια εβδομάδα σε νιτρικό οξύ 65% και να ξεπλυθούν επανειλημμένως με δις απιονισμένο νερό Milli-Q [159].

Στα λυοφιλιωμένα δείγματα, αφού πρώτα υποστούν υγρή χώνευση, προσδιορίζονται τα μέταλλα και μεταλλοειδή (ποιοτικά και ποσοτικά) με τη χρήση φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS).

Αντιδραστήρια

- Νιτρικό οξύ (HNO_3 65% w/w)
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2 30% w/w)
- Υπερκάθαρο νερό

Όργανα και σκεύη

- Ογκομετρική φιάλη των 25mL
- Αναλυτικός ζυγός
- Σωλήνες για υγρή χώνευση
- Φούρνος μικροκυμάτων για υγρή χώνευση
- ICP-MS

Αναλυτική πορεία

Ποσότητα θρυμματισμένου λυοφιλιωμένου δείγματος ~0.2 g ζυγίζεται με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και εισάγεται στους σωλήνες υγρής χώνευσης. Προστίθενται 5 mL HNO_3 65% w/w και 1 mL H_2O_2 30% w/w. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στο φούρνο υγρής χώνευσης με προεπιλεγμένο πρόγραμμα (πρώτη φάση σε 1600W και 165^oC, για 2 min και στη δεύτερη φάση στα 1600W και 175 ^oC, για 5 min). Μετά τη χώνευση των δειγμάτων στον φούρνο μικροκυμάτων, ακολουθεί αραίωση σε τελικό όγκο 25mL με υπερκάθαρο νερό. Για τη διασφάλιση της ποιότητας και την εκτίμηση της ακρίβειας της μεθόδου, χρησιμοποιούνται πιστοποιημένα υλικά αναφοράς. Επίσης παρασκευάζονται τυφλά διαλύματα και χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα (1000 mg/L) των αντίστοιχων υπό μελέτη μετάλλων και μεταλλοειδών έτσι ώστε να παρασκευαστούν πρότυπες καμπύλες. Τέλος χρησιμοποιείται εσωτερικό πρότυπο για έλεγχο του οργάνου.

Στο ελληνικό εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε ως πιστοποιημένο υλικό αναφοράς το BCR 281 (χλόη σίκαλης), ενώ στο δανέζικο εργαστήριο το TORT-2 (ηπατοπάγκρεας αστακού). Ο φούρνος μικροκυμάτων που χρησιμοποιήθηκε στο ελληνικό εργαστήριο

ήταν MARS X-Press (CEM Corporation, NC, ΗΠΑ) ενώ στο δανέζικο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκε ο Multiwave 3000 (Anton Paar GmbH, Αυστρία). Τέλος, ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το γάλλιο (Ga).

5.6.1.1 Περιγραφή και χρήση του ICP-MS

Αρχή μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην α) ατομοποίηση του δείγματος, β) στη μετατροπή των ατόμων σε ρεύμα ιόντων κυρίως θετικά φορτισμένων με τη χρήση πυρσού, επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma, ICP), γ) στο διαχωρισμό των ιόντων με βάση το λόγο τους m/z και δ) στην απαρίθμηση των ιόντων ή μέτρηση του ρεύματος που παράγεται όταν τα ιόντα προσπέσουν σε κατάλληλο μεταλλάκτη με τη χρήση ενός αναλυτή μάζας (Mass Spectrometry, MS) (εικόνα 5-1)

Το ICP-MS, θεωρείται από τις σπουδαιότερες τεχνικές στοιχειακής ανάλυσης, καθώς επιτυγχάνει χαμηλά όρια ανίχνευσης (0.1-10 ppb). Μπορεί να ανιχνεύσει έως και το 90% των στοιχείων του περιοδικού πίνακα, σε χρόνο 10s για κάθε στοιχείο. Επίσης έχει υψηλό βαθμό εκλεκτικότητας και σχετικά καλή επαναληψιμότητα και ακρίβεια [122].

Εικόνα 5-1: Φασματόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS)

Συνθήκες λειτουργίας

Το ICP-MS που χρησιμοποιήθηκε στο ελληνικό εργαστήριο ήταν το μοντέλο 7700x της Agilent Technologies (Wilmington, Delaware, ΗΠΑ). Οι συνθήκες λειτουργίας του ICP-MS ήταν: ισχύς (RF power) 1550W, ροή αερίου πλάσματος (plasma gas flow) 15L/min, ροή φέροντος αερίου (carrier gas flow) 1.0 L/min, ρυθμός κατανάλωσης αερίου (makeup gas flow) 4.2 L/min, διάμετρος πυρσού (torch i.d) 2.5 mm, ατομοποιητής (nebulizer) OpalMist, χρόνος ολοκλήρωσης (integration time) 1000 ms.

Το ICP-MS που χρησιμοποιήθηκε στο δανέζικο εργαστήριο ήταν το μοντέλο 7500ce της Agilent Technologies (Wilmington, Delaware, ΗΠΑ) συνδεδεμένο με αυτόματο δειγματολήπτη (ASX-500, CETAC Technologies, Ohama, NE, ΗΠΑ). Οι συνθήκες λειτουργίας του ICP-MS ήταν: ισχύς (RF power 1500W), ροή αερίου πλάσματος (plasma gas flow) 15L/min, ροή φέροντος αερίου (carrier gas flow) 0.9 L/min, ρυθμός κατανάλωσης αερίου (makeup gas flow 0.16 L/min), διάμετρος πυρσού (torch i.d.) 2.5 mm, ατομοποιητής (nebulizer) Babington, χρόνος ολοκλήρωσης (integration time) 1000 ms.

5.6.2 Προσδιορισμός ανόργανου αρσενικού (iAs) με HPLC-ICPMS

Αρχή μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην εκχύλιση ανόργανου αρσενικού (iAs) με τη χρήση ισχυρών οξέων. Ο όρος "ανόργανο αρσενικό" περιλαμβάνει τα H_3AsO_3 (As^{III}) και H_3AsO_4 (As^{v}). Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης το As(^{III}) οξειδώνεται σε As(^{V}) με τη βοήθεια του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) [160]. Ο προσδιορισμός του As(^{V}) πραγματοποιείται με τη χρήση HPLC-ICPMS.

Αντιδραστήρια

- Νιτρικό οξύ (HNO_3 67-70% w/w)
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2 30% w/w)
- Μεθανόλη (MeOH)
- Ανθρακικό αμμώνιο ($(NH_4)_2CO_3$)
- Αμμωνία (NH_3 25%)
- Υπερκάθαρο νερό

Πρότυπα διαλύματα

- As (^{III}): Πρότυπο διάλυμα συγκέντρωση 1000mg/L, SCP Science
- As (^{V}): Πρότυπο διάλυμα συγκέντρωση 1000mg/L, SCP Science
- Tuning solutions για το ICP-MS: 1ppb Li, Y, Ce, T, Co διαλυμένα σε 2 wt% HNO_3 της Agilent Technologies

Όργανα και σκεύη

- Πλαστικοί σωλήνες
- Ογκομετρικές φιάλες (1L)
- Πλαστικές φιάλες (1L)
- Ποτήρια ζέσεως (2L)
- Φίλτρα

- Αναλυτικός ζυγός
- Υδατόλουτρο
- Φυγόκεντρος
- pH-μετρο
- HPLC φιαλίδια
- HPLC στήλη: ICSep ION-120 (ανιοανταλλαγής)
- HPLC προ-στήλη:ICSep ION-120
- HPLC σειρά 1260 Agilent technologies
- ICP-MS σειρά 7500ce Agilent technologies
- HP PC και ChemStation software

Αναλυτική πορεία

Παρασκευή κινητών φάσεων

Κινητή φάση B2: 3% MeOH v/v

Σε ογκομετρική φιάλη 1L, προστίθενται 30.0 mL MeOH, και γεμίζεται με νερό μέχρι τη χαραγή. Πραγματοποιείται διήθηση/φιλτράρισμα με χρήση φίλτρου (0.45μm) και τοποθετείται σε πλαστική φιάλη του 1L.

Κινητή φάση A1: 100mM ανθρακικού αμμωνίου $(NH_4)_2CO_3$ σε 3% MeOH v/v

Ζυγίζονται 9.6 g $(NH_4)_2CO_3$ και μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως 2 L, το οποίο περιέχει μικρή ποσότητα νερού. Στη συνέχεια προστίθενται 30.0 mL MeOH και 800 mL H_2O. Το διάλυμα αναδεύεται με χρήση μαγνήτη, σε αναδευτήρα. Ακολουθεί προσθήκη 25% NH_3 (50-80 mL) για τη ρύθμιση του pH στο 10.3. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 1 L και απογεμίζεται με νερό. Στη συνέχεια φιλτράρεται το διάλυμα και τοποθετείται σε πλαστική φιάλη 1 L.

Κινητή φάση A2: 50mM ανθρακικού αμμωνίου $(NH_4)_2CO_3$ σε 3% MeOH v/v

Ζυγίζονται 4.80 g $(NH_4)_2CO_3$ και μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως 2 L, το οποίο περιέχει μικρή ποσότητα νερού. Στη συνέχεια προστίθενται 30.0 mL MeOH και 800 mL H_2O. Το διάλυμα αναδεύεται με χρήση μαγνήτη, σε αναδευτήρα. Ακολουθεί προσθήκη 25% NH_3 (25-40 mL) για τη ρύθμιση του pH στο 10.3. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 1 L και απογεμίζεται με νερό. Στη συνέχεια φιλτράρεται το διάλυμα και τοποθετείται σε πλαστική φιάλη 1 L.

Παρασκευή διαλύματος εκχύλισης 0.1M HNO_3/3% H_2O_2

Λαμβάνονται 6.48 mL HNO_3 και προστίθενται σε 800mL H_2O ογκομετρικής φιάλης 1 L. Στη συνέχεια προστίθενται 100 mL H_2O_2 (30% w/w) και η φιάλη γεμίζεται με H_2O μέχρι τη χαραγή.

Εκχύλιση ανόργανου αρσενικού (iAs)

Κάθε δείγμα ζυγίζεται (0.2g) σε πλαστικό σωλήνα (15 mL) με βιδωτό καπάκι σε αναλυτικό ζυγό με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 mL διαλύματος εκχύλισης (0.1M HNO_3/3% H_2O_2) σε κάθε υπό μελέτη δείγμα. Επίσης παρασκευάζονται τυφλά δείγματα, πρότυπα διαλύματα As για την παρασκευή πρότυπης καμπύλης και δείγματα αναφοράς TORT-2. Όλα τα δείγματα θερμαίνονται σε υδατόλουτρο για 1h, στους 90°C. Τα εκχυλίσματα φυγοκεντρούνται για 10 min. στις 4000 rpm. Τέλος μεταφέρονται 300 μL δείγματος σε φιαλίδιο HPLC, αφού πρώτα φιλτραριστούν. Στη συνέχεια τα δείγματα αναλύονται με HPLC-ICPMS [160].

5.6.2.1 Περιγραφή και χρήση της HPLC- ICPMS

Αρχή μεθόδου

Η αρχή της συγκεκριμένης μεθόδου στηρίζεται στη σύζευξη της τεχνικής της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) (εικόνα 5-2). Η μέθοδος αυτή συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των δύο οργάνων. Χρησιμοποιεί τη διαχωριστική ικανότητα της HPLC με την ικανότητα της ICP-MS να αναλύει στοχευμένα ενώσεις όπως ενώσεις αρσενικού (As), λόγω της ικανότητάς της να διαχωρίζει τα συστατικά ενός δείγματος με βάση το λόγο μάζας/φορτίο (m/z) [124]. Η HPLC-ICPMS χρησιμοποιείται συχνά διότι είναι μια γρήγορη τεχνική, με μεγάλη ευαισθησία και καλή διαχωριστική ικανότητα για πολλά στοιχεία του περιοδικού πίνακα [122].

Εικόνα 5-2: Συνδεσμολογία HPLC-ICPMS

Συνθήκες λειτουργίας

Οι συνθήκες λειτουργίας της HPLC-ICPMS που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα έρευνα ήταν: στήλη ανιοανταλλαγής (anion exchange) Trangenomic 120*4.6mm, μέθοδος ισοκρατική (isocratic) έκλουση, όγκος έκχυσης (injection vol.) 25 μl, ροή (flow) 1 mL/min., θερμοκρασία στήλης (temperature column) 30°C, κινητή φάση (mobile phase) 50 mM $(NH_4)_2CO_3$ σε 3% MeOH, διάρκεια έκλουσης 10 min.

5.6.3 Προσδιορισμός Hg με CVAFS

Αρχή μεθόδου

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στον ατομικό φθορισμό του υδραργύρου και στην "παγίδευσή" του ύστερα από ψυχρό ατμό. Η τεχνική αυτή ονομάζεται φασματομετρία ατομικού φθορισμού ψυχρού ατμού (Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectrometry, CVAFS). Εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό του Hg, επειδή αυτό είναι το μοναδικό μέταλλο που επιτρέπει τη μέτρηση των ατμών του σε θερμοκρασία δωματίου [161].

Αντιδραστήρια

- Νιτρικό οξύ (HNO_3)
- Θειϊκό οξύ (H_2SO_4)
- Χλωριούχο βρώμιο (0.02N BrCl)
- Υδροξυλαμίνη (NH_2OH)
- Χλωριούχος κασσίτερος ($SnCl_2$)

Όργανα και σκεύη

- Δοχεία τεφλόν
- Αναλυτικός ζυγός
- Θερμαντική πλάκα
- Πλυντρίδα
- Παγίδες Hg
- CVAFS (Tekran 2500, Canada)

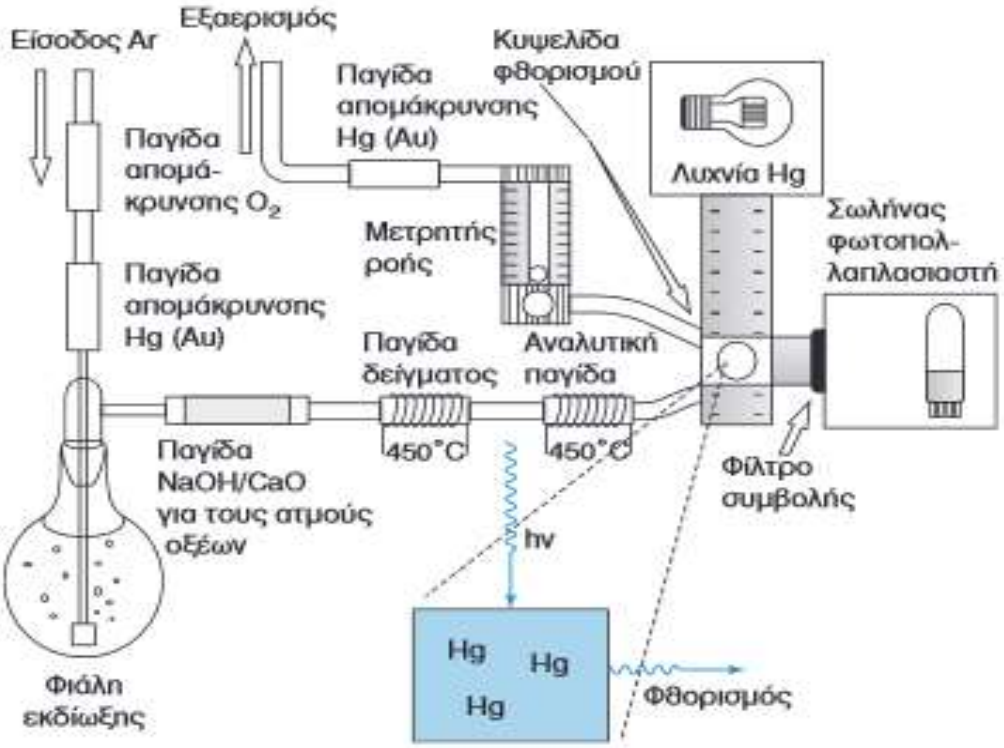
Αναλυτική πορεία

Τα δείγματα, αφού πρώτα λυοφιλιωθούν και ομοιογενοποιηθούν, ζυγίζονται (0.2 g) και στη συνέχεια εισάγονται σε δοχεία τεφλόν. Προστίθενται 7mL HNO_3 και 3 mL H_2SO_4 και αφήνονται στον πάγκο για 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν σταματήσει ο αφρισμός τους, σφραγίζονται καλά με τα πώματά τους. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε θερμαντική πλάκα και όταν ολοκληρωθεί η χώνευση προστίθεται 0.02N BrCl.

Ακριβώς πριν την ανάλυση, τα δείγματα προανάγονται με NH_2OH, για να καταστραφούν τα ελεύθερα αλόγονα, και έπειτα μεταφέρονται στην πλυντρίδα για περαιτέρω αναγωγή με $SnCl_2$. Ο Hg^0 που απελευθερώνεται και χωρίζεται από την υδάτινη μήτρα με την απαέρωση, επικάθεται σε μια παγίδα χρυσής άμμου. Ο υδράργυρος εκροφάται θερμικά από την πρώτη παγίδα προς μια δεύτερη παγίδα που ονομάζεται «αναλυτική». Τέλος, η «αναλυτική» παγίδα θερμαίνεται και ο υδράργυρος που ελευθερώνεται οδηγείται στο φασματόμετρο ατομικού φθορισμού ψυχρών ατμών (CVAFS) για την ποσοτικοποίηση [161].

5.6.3.1 Περιγραφή και χρήση της CVAFS

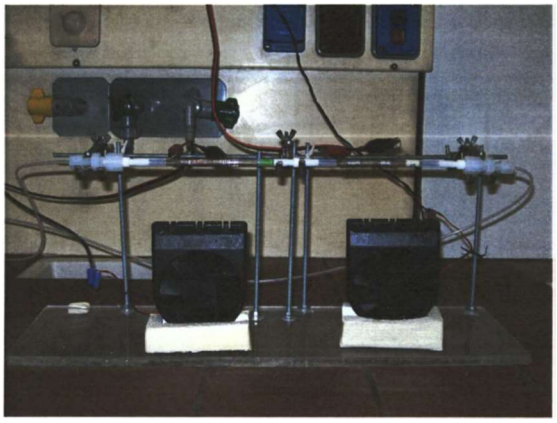
Ο ολικός Hg οξειδώνεται σε $Hg^{(II)}$ με BrCl και ισχυρά οξέα στη φιάλη εκδίωξης. Τα αλογόνα ανάγονται από υδροξυλαμίνη (NH_2OH) και ο Hg^{2+} ανάγεται σε Hg^0 με $SnCl_2$ στην πλυντρίδα. Ο Hg^0, ο οποίος απελευθερώνεται και χωρίζεται από την υδάτινη



Εικόνα 5-3: Οργανολογία για τον προσδιορισμό του Hg [162]

μήτρα με την απαέρωση, επικάθεται σε μια παγίδα χρυσής άμμου. Στη συνέχεια εκροφάται θερμικά από την πρώτη παγίδα προς μια δεύτερη παγίδα που ονομάζεται “αναλυτική”. Η "αναλυτική" παγίδα θερμαίνεται και ο υδράργυρος που ελευθερώνεται, οδηγείται στον φθορισμομετρικό ανιχνευτή (εικόνες 5-3, 5-4 και 5-5) [161,162].

Εικόνα 5-4: Σύνολο της διάταξης εκρόφησης του υδραργύρου από τις παγίδες και τελικής μετρησης στον φθορισμομετρικό ανιχνευτή [163]



Εικόνα 5-5: Διάταξη των δύο παγίδων, δείγμος και αναλυτικής [163]

5.7 Ανάλυση λιπιδίων

5.7.1 Εκχύλιση λιπιδίων με Bligh-Dyer

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αρχή της εκχύλισης των λιπιδίων με οργανικούς διαλύτες. Τα λιπίδια εκχυλίζονται από τους ιστούς στο μονοφασικό σύστημα χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού 1:2:0.8 (v/v/v) και στη συνέχεια το σύστημα μετατρέπεται σε διφασικό με αναλογία χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού 1:1:0.9 (v/v/v) για την παραλαβή των λιπιδίων (χλωροφορμική φάση) [91].

Αντιδραστήρια

- Χλωροφόρμιο ($CHCl_3$)
- Μεθανόλη (MeOH)
- Αιθανόλη (EtOH)
- Απεσταγμένο νερό
- Αέριο άζωτο

Όργανα και σκεύη

- Χοάνες
- Ογκομετρικοί σωλήνες
- Σφαιρικές φιάλες συμπύκνωσης
- Συσκευή διήθησης Buchner
- Συσκευή συμπύκνωσης Flash Evaporator
- Ομογενοποιητής

Αναλυτική πορεία

Το δείγμα ομογενοποιείται με διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης 1:2 (v/v) ανά 0.8 (v) περιεχόμενου νερού, ανάλογα το ποσοστό υγρασίας του νωπού ιστού. Το μείγμα του εκχυλίσματος διηθείται σε χωνί Buchner και το ίζημα-υπόλειμμα εκπλένεται με διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού 1:2:0.8 (v/v/v). Τα ενωμένα διηθήματα συλλέγονται και μεταφέρονται σε διαχωριστική χοάνη. Συμπληρώνεται ο όγκος με υπολογισμένες ποσότητες χλωροφορμίου και νερού, έτσι ώστε η αναλογία χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού να καταστεί περίπου ίση με 1:1:0.9 (v/v/v), προκειμένου να γίνει το σύστημα διφασικό. Γίνεται διαχωρισμός των δύο φάσεων στη χοάνη και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση (κάτω φάση) για τη μελέτη των λιπιδίων. Σε περίπτωση που κατά το διαχωρισμό των δύο φάσεων δημιουργηθεί γαλάκτωμα, προστίθεται NaCl και αναταράσσεται η χοάνη για να διαλυθεί το γαλάκτωμα. Εξατμίζεται ο διαλύτης σε περιστρεφόμενη συσκευή κενού (flash evaporator) στους 35°C και το υπόλειμμα της φιάλης αναδιαλύεται σε διάλυμα χλωροφορμίου-μεθανόλης 9:1 (v/v) και φυλάσσεται σε χαμηλή θερμοκρασία [91].

5.7.2 Προσδιορισμός ολικού λίπους

Αρχή μεθόδου

Πρόκειται για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους των λιπιδίων, ύστερα από απομάκρυνση του διαλύτη και την αποκατάσταση σταθερού βάρους του [157]. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η περιεκτικότητά τους σε νωπό ιστό. Η μέθοδος αυτή είναι γνωστή και ως σταθμικός προσδιορισμός.

Αντιδραστήρια

- Αέριο άζωτο

Όργανα και σκεύη

- Φιαλίδια ζυγίσεως
- Σύστημα εξάτμισης διαλύτη
- Ζυγός ακριβείας
- Ξηραντήρας

Αναλυτική πορεία

Ορισμένος όγκος εκχυλίσματος λιπιδίων (~10 mL) φέρεται σε προζυγισμένο φιαλίδιο ζυγίσεως και απομακρύνεται ο διαλύτης με ρεύμα αζώτου. Κατόπιν, το φιαλίδιο τοποθετείται σε ξηραντήρα για 48h και ζυγίζεται μέχρι σταθερού βάρους. Από τη

διαφορά βάρους του φιαλιδίου πριν και μετά, υπολογίζεται το ξηρό βάρος των λιπιδίων [157].

5.7.3 Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό ανόργανου φωσφόρου (PO_4^{3-}), ο οποίος παράγεται ύστερα από καύση των φωσφολιπιδίων με υπερχλωρικό οξύ. Τα φωσφορικά ιόντα αντιδρούν με μολυβδαινικό αμμώνιο προς σχηματισμό φωσφορομολυβδαινικού οξέος, το οποίο με θέρμανση και παρουσία αμινοναφθολοσουλφονικού οξέος (ANSA-αναγωγικό μέσον), ανάγεται σε κυανούν του φωσφομολυβδαινίου (σχηματισμός έγχρωμου συμπλόκου). Μετρείται η απορρόφηση αυτού στα 820 nm και η περιεκτικότητα των δειγμάτων των λιποειδών σε φωσφόρο υπολογίζεται βάσει καμπύλης αναφοράς, η οποία κατασκευάζεται με χρήση πρότυπων φωσφορικών διαλυμάτων [164].

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται μετά την καύση των δειγμάτων είναι οι εξής:

$PO_4^{3-} + 3NH_4^+ + 12\ MoO_4^{2-} + 24H^+ \rightarrow (NH_4)_3[PMo_{12}O_{40}] + 12H_2O$

$(NH_4)_3[PMo_{12}O_{40}]$ + ANSA → κυανούν του φωσφομολυβδαινίου (A=820nm) [164]

Αντιδραστήρια

- Υπερχλωρικό οξύ ($HClO_4$ 72%)
- Αέριο άζωτο
- Μολυβδαινικό αμμώνιο 0.4%: Ζυγίζονται 2.125 g ένυδρου μολυβδαινικού αμμωνίου ($(NH_4)_2Mo_7O_{24}x4H_2O$) και διαλύονται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500 mL.
- Διάλυμα ANSA (άμινο-νάφθολο-σουλφονικό οξύ): Διαλύονται 30 g ($NaHSO_3$) (ή 28.5g $Na_2S_2O_5$) και 6 g Na_2SO_3 σε 250 ml απεσταγμένο νερό. Στο προκύπτον διάλυμα προστίθενται 0.5g 1,2,4 άμινο-νάφθολο-σουλφονικού οξέος (ANSA). Το διάλυμα αφήνεται 3h σε ηρεμία και αν σχηματισθεί ίζημα διηθείται. Φυλάσσεται σε ψυγείο και θεωρείται κατάλληλο προς χρήση για ένα μήνα από τη μέρα παρασκευής του.
- Αντιδραστήριο ANSA: πριν την εκτέλεση του προσδιορισμού αναμειγνύονται διάλυμα ANSA με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 2:3 (v/v)

- Πρότυπο δ/μα KH_2PO_4 : KH_2PO_4 ξηραίνεται στους 105^oC για 1h. Διαλύονται 175.75mg KH_2PO_4 σε 100 ml νερού. 1 ml του διαλύματος αυτού περιεκτικότητας 1.7575mg/ ml αραιώνεται στα 100 ml οπότε προκύπτει διάλυμα περιεκτικότητας σε φώσφορο 4 μg/mL.

Όργανα και σκεύη

- Δοκιμαστικοί σωλήνες Pyrex
- Πιπέτες
- Σιφώνια
- Πλαστικές κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους (UV-VIS)
- Αμμόλουτρο (ή ελαιόλουτρο) ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας 170-180^oC
- Κυκλοαναδευτήρας
- Υδατόλουτρο

Αναλυτική Πορεία

Δείγματα λιπιδίων περιεκτικότητας 0.5-4.5 μg φωσφόρου, φέρονται σε σωλήνες Pyrex και πραγματοποιείται εξάτμιση του διαλύτη σε ρεύμα αζώτου. Προστίθεται στην συνέχεια 0.5 mL $HClO_4$ 72%. Παράλληλα, προστίθεται 0.5 mL $HClO_4$ 72% σε άλλους άδειους σωλήνες Pyrex, οι οποίοι προορίζονται για τα πρότυπα δείγματα και τον τυφλό προσδιορισμό. Όλοι οι σωλήνες τοποθετούνται σε αμμόλουτρο θερμοκρασίας 170-180^oC για 1h. Στη συνέχεια οι σωλήνες ψύχονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστίθενται 1 mL αποσταγμένου νερού, 3 mL μολυβδαινικού αμμωνίου 0.4% και 0.5 mL αντιδραστηρίου ANSA. Μετά από κάθε προσθήκη αντιδραστηρίου, ακολουθεί έντονη ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα. Στους σωλήνες των πρότυπων δ/των προστίθενται αντίστοιχα 0.2, 0.4, 0.5, 0.8 και 1.0 mL KH_2PO_4 και αποσταγμένο νερό μέχρι συνολικού όγκου 1.0 mL. Στους σωλήνες που αφορούν τον τυφλό προσδιορισμό, τίθενται 1.0mL αποσταγμένου νερού και τα υπόλοιπα αντιδραστήρια. Κατόπιν, οι σωλήνες τοποθετούνται σε ζέον υδατόλουτρο για 10 min. και μετά ψύχονται για 20 min. ώστε να αναπτυχθεί πλήρως το χρώμα. Τα πρότυπα και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 820 nm έναντι τυφλού προσδιορισμού. Πριν από κάθε φωτομέτρηση απαιτείται συνεχής ανάδευση των δειγμάτων, ώστε το χρώμα να κατανέμεται ομοιόμορφα [164].

5.7.4 Προσδιορισμός λιπιδίων

5.7.4.1 Μέθοδοι διαχωρισμού λιπιδίων

5.7.4.1.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)

Αρχή μεθόδου

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) είναι μέθοδος διαχωρισμού των επιμέρους τάξεων του λίπους με τη χρήση κατάλληλων διαλυτών. Η μέθοδος χρωματογραφίας εξαρτάται από την προσροφητική ικανότητα της στατικής φάσης με το δείγμα για τον σωστό διαχωρισμό του [122].

Κάθε συστατικό του μίγματος των λιπιδίων έχει διαφορετική κινητικότητα σε δεδομένο σύστημα διαλυτών το οποίο εκφράζεται με το λόγο μετώπου Rf (frontal ratio). Με τον όρο Rf ορίζεται ως η απόσταση που διατρέχει κάθε ουσία από το σημείο εκκίνησης προς το μέτωπο του διαλύτη. Συνεπώς το Rf αποτελεί μέτρο της ταχύτητας με την οποία κινείται μια ουσία πάνω στη silica. Κάθε ουσία έχει μια τιμή Rf που μετράται κάτω από ορισμένες συνθήκες (διαλύτες, θερμοκρασία, τύπος ανάπτυξης, ανερχόμενη ή κατερχόμενη). Επειδή όμως παρεμβαίνουν τόσες μεταβλητές, η τιμή Rf μιας ουσίας είναι μια κατά προσέγγιση ένδειξη της ταυτότητάς της. Γι' αυτό, κοινή πρακτική είναι η χρησιμοποίηση πρότυπων ουσιών που αναμένεται να υπάρχουν μεταξύ των συστατικών του δείγματος και τα οποία αναπτύσσονται στην ίδια πλάκα με το μίγμα των λιπιδίων. Εν συνεχεία, επιτυγχάνεται ταυτοποίηση των συστατικών του μίγματος συγκρίνοντας τις τιμές Rf. Τέλος, επειδή τα λιπίδια είναι άχρωμα, προκειμένου να εμφανιστούν τα διαχωρισθέντα συστατικά χρησιμοποιούνται διάφορα χημικά αντιδραστήρια [122,165].

5.7.4.1.1.1 Διαχωρισμός λιπιδίων με HPTLC

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή είναι μια βελτιωμένη/εξελιγμένη μορφή της κλασικής TLC. Στηρίζεται στην αρχή της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), με τη διαφορά ότι οι πλάκες που χρησιμοποιούνται είναι υψηλής απόδοσης (High Performance) δηλ. έχουν λεπτότερη επίστρωση, μικρότερο μέσο μέγεθος σωματιδίων και μικρότερη κατανομή στο μέγεθος των σωματιδίων. Συνεπώς πετυχαίνεται καλύτερος διαχωρισμός με αποτέλεσμα αύξηση της επιτυγχανόμενης ανάλυσης. Ονομάζεται χρωματογραφία υψηλής απόδοσης λεπτής στιβάδας (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC) [122].

Το μίγμα των λιπιδίων που πρόκειται να διαχωρισθεί τοποθετείται με μορφή κηλίδας πάνω σε λεπτή στιβάδα κοκκοποιημένου ξηρού υλικού (Silica Gel-G) (ακίνητη φάση)

σε έτοιμες πλάκες. Τα λιπιδικά μόρια παρασύρονται από το σύστημα ανάπτυξης (μίγμα διαλυτών), καθώς αυτό περνάει μέσα από τον προσροφητή, λόγω τριχοειδών φαινομένων και επιτυγχάνεται διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος, λόγω διαφορετικής μετανάστευσή τους. Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση των τιμών Rf με του πρότυπου διαλύματος ώστε να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση των συστατικών του μείγματος [122].

Αντιδραστήρια

- Αέριο άζωτο
- Πρότυπο διάλυμα λιπιδίων (κρόκος αυγού)
- Συστήματα ανάπτυξης για το διαχωρισμό των λιπιδίων:
    - Ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης: πετρελαϊκός αιθέρας-διαιθυλαιθέρας-οξικό οξύ 70:30:1 (v/v/v)
    - Πολικό σύστημα ανάπτυξης: χλωροφόρμιο-μεθανόλη-οξικό οξύ-νερό 50:25:6:2 (v/v/v/v)

Όργανα και σκεύη

- Μικροσύριγγες Hamilton
- Γυάλινη συσκευή ψεκασμού
- Θάλαμοι ανάπτυξης
- Πλάκες HPTLC Silica Gel-G διαστάσεων 10x10 cm

Αναλυτική πορεία

Το μίγμα των ουσιών που πρόκειται να διαχωριστεί, τοποθετείται υπό μορφή κηλίδας πάνω σε λεπτή στιβάδα κοκκοποιημένου ξηρού υλικού (Silica Gel G), σε έτοιμες πλάκες τύπου HPTLC Silica Gel G διαστάσεων 10×10 cm και πάχους 0.25 mm της Merck. Οι πλάκες χωρίζονται σε παράλληλες κάθετες λωρίδες πλάτους 1.5-2.0 cm και το διάλυμα του δείγματος ή του προτύπου λιπιδίου τοποθετείται με μικροσύριγγα σε κάθε λωρίδα σε ύψος περίπου 2 cm. Η ανάπτυξη της χρωματογραφικής πλάκας γίνεται σε κορεσμένο θάλαμο με το κατάλληλο σύστημα διαλυτών ανάπτυξης. Όταν το μέτωπο του διαλύτη φθάσει μέχρι το επιθυμητό ύψος, οι πλάκες ανασύρονται από το θάλαμο και παραμένουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος εντός του απαγωγού να στεγνώσουν. Για την εμφάνιση του χρωματογραφήματος χρησιμοποιούνται διάφορα αντιδραστήρια όπως ατμοί ιωδίου, νινυδρίνης, Dittmer-Lester. Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση των τιμών Rf με του πρότυπου διαλύματος ώστε να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση των

συστατικών του μίγματος. Στο ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης γίνεται διαχωρισμός των ουδέτερων λιπιδίων, ενώ στο πολικό διαχωρίζονται τα πολικά λιπίδια [122].

Εμφάνιση του χρωματογραφήματος

Η εμφάνιση του χρωματογραφήματος πραγματοποιείται με διάφορα αντιδραστήρια που είτε καθιστούν όλα τα λιπίδια ορατά είτε είναι ειδικά για συγκεκριμένες τάξεις λιπιδίων ή χαρακτηριστικές ομάδες αυτών. Όπου απαιτείται ψεκασμός χρησιμοποιείται ειδικός γυάλινος ψεκαστήρας.

i. Έκθεση σε ατμούς ιωδίου

Η πλάκα τοποθετείται σε κορεσμένο με ατμού ιωδίου θάλαμο, που κλείνει ερμητικά κλειστά και επιτυγχάνεται εμφάνιση όλων των ειδών λιπιδίων με τη μορφή κίτρινων ή καστανόχρωμων κηλίδων, τα οποία εξαχνώνονται με την παραμονή στον αέρα. Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί, ως προς το ότι είναι απλή και σύντομη, ενώ επιτρέπει στη συνέχεια και τη χρήση άλλων αντιδραστηρίων εμφάνισης [164].

ii. Αντιδραστήριο νινυδρίνης

Είναι αντιδραστήριο εμφάνισης αμινοξέων, αμινών και αμινοσακχάρων. Η πλάκα ψεκάζεται ομοιόμορφα με διάλυμα 0.2% (w/v) νινυδρίνης σε αιθανόλη και θερμαίνεται στους 110°C για 10 min. προκειμένου να αναπτυχθεί πλήρως το χρώμα [166]. Όσες ενώσεις περιέχουν 1°ταγή και 2° ταγή αμινομάδα εμφανίζονται σαν κόκκινες-ροζ κηλίδες.

iii. Αντιδραστήριο Dittmer-Lester

Πρόκειται για ειδικό αντιδραστήριο εμφάνισης των φωσφο(νο)λιπιδίων, που παρασκευάζεται με την ανάμειξη των παρακάτω διαλυμάτων:

Διάλυμα Α: 40.11g MoO_3 διαλύονται σε 1 L H_2SO_4 25N. Η διάλυση υποβοηθείται με ελαφρύ βρασμό του μίγματος.

Διάλυμα Β: Προστίθενται 1.78 g σκόνης μεταλλικού μολυβδαινίου σε 500 mL διαλύματος Α και το μίγμα βράζεται για 15 min.

Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου ψεκασμού, ενώνονται ίσοι όγκοι των διαλυμάτων Α και Β και προστίθεται τόσος όγκος νερού, έτσι ώστε το διάλυμα να γίνει μπλε, με πρασινωπή απόχρωση. Στη συνέχεια η πλάκα ψεκάζεται ομοιόμορφα και αφήνεται να στεγνώσει. Οι κηλίδες που έχουν φωσφόρο γίνονται μπλε [167].

5.7.4.1.1.2 Διαχωρισμός λιπιδίων με PTLC

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή επίσης στηρίζεται στην αρχή της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) και ονομάζεται παρασκευαστική (Preparative Thin Layer Chromatography, PTLC). Η αρχή της στηρίζεται στον διαχωρισμό και την απομόνωση των συστατικών του μίγματος. Συγκεκριμένα για την επίτευξη του διαχωρισμού των λιπιδίων με PLTC, ύστερα από την πλήρη ανάπτυξη και εμφάνιση του χρωματογραφήματος παραλαμβάνονται τα διάφορα κλάσματα/ζώνες λιπιδίων από την πλάκα και επεξεργάζονται χωριστά.

Αντιδραστήρια

- Αέριο άζωτο
- Πρότυπο διάλυμα λιπιδίων (από κρόκο αυγού)
- Συστήματα ανάπτυξης για το διαχωρισμό των λιπιδίων
    - Ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης: πετρελαϊκός αιθέρας – διαιθυλαιθέρας - οξικό οξύ 70:30:1 (v/v/v)
    - Πολικό σύστημα ανάπτυξης: χλωροφόρμιο - μεθανόλη - οξικό οξύ - νερό 50:25:6:2 (v/v/v/v)

Όργανα και σκεύη

- Διαχωριστική χοάνη
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Μικροσύριγγες Hamilton
- Θάλαμοι ανάπτυξης
- Πλάκες Silica Gel G-50 διαστάσεων 20x20cm και πάχους 0.5mm
- Κυκλοαναδευτήρας
- Φυγόκεντρος
- Συσκευή συμπύκνωσης flash evaporator

Αναλυτική πορεία

Στις παρασκευαστικές πλάκες TLC χαράσσονται 1-2 λωρίδες για την τοποθέτηση των προτύπων, ενώ στο υπόλοιπο τμήμα των πλακών τοποθετούνται 0.6-1.0 mL διαλύματος δείγματος περιεκτικότητας 50 μg/μL. Η ανάπτυξη της χρωματογραφικής πλάκας γίνεται σε προκεκορεσμένο θάλαμο (επιτυγχάνεται με επικάλυψη των τοιχωμάτων του με διηθητικό χαρτί) με κατάλληλο σύστημα διαλυτών ανάπτυξης. Όταν

το μέτωπο του διαλύτη φθάσει σε ύψος περίπου 17 cm, οι πλάκες ανασύρονται από τον θάλαμο και αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος να στεγνώσουν εντός του απαγωγού. Στη συνέχεια εκθέτουμε τις πλάκες σε ατμούς ιωδίου ώστε να εμφανιστούν οι ζώνες των λιπιδίων. Για την εμφάνιση ενώσεων που περιέχουν αμινομάδες χρησιμοποιούμε αντιδραστήριο νινυδρίνης και για την εμφάνιση φωσφο(νο)λιπιδίων, αντιδραστήριο Dittmer-Lester.

Αφού στεγνώσουν οι πλάκες από τους διαλύτες, αποξύνεται η silica-gel κάθε ζώνης της πλάκας, που περιέχει τα ήδη διαχωρισμένα λιπίδια, τοποθετείται χωριστά σε σωλήνα φυγόκεντρου και διαλύεται σε 30 mL διαλύτη Bligh-Dyer (χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό, 1:2:0.8 v/v/v). Το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά για 1-2 min, προκειμένου να εκχυλιστούν τα λιπίδια από τη silica-gel.

Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 10min και αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό σε ογκομετρικό κύλινδρο. Επαναλαμβάνεται η εκχύλιση άλλες δυο φορές και συμπληρώνεται ο όγκος των ενωμένων εκχυλισμάτων μέχρι 95 mL με τον ίδιο διαλύτη. Μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη, όπου εκεί προστίθενται ακόμα 25 mL χλωροφορμίου και 25 mL νερού και το σύστημα αναδεύεται. Έπειτα αφήνεται σε ηρεμία για τον διαχωρισμό των φάσεων. Συλλέγεται η χλωροφορμική φάση (κάτω φάση), η οποία περιέχει τα λιπίδια, απομακρύνεται ο διαλύτης σε περιστρεφόμενη συσκευή αποστάξεως κενού και το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε χλωροφόρμιο-μεθανόλη 9:1 v/v [168].

5.7.4.1.1.3 Διαχωρισμός λιπιδίων με Iatroscan TLC-FID

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή ομοίως στηρίζεται στην αρχή της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), με τη διαφορά ότι είναι ακόμα πιο βελτιωμένη από τις άλλες μεθόδους, καθώς είναι μια υπερσύγχρονη αυτοματοποιημένη τεχνική που επιτυγχάνει ποιοτικό και ποσοτικό διαχωρισμό με ακρίβεια και σαφήνεια [169].

Αντιδραστήρια

- Χλωροφόρμιο ($CHCl_3$)
- Μεθανόλη (MeOH)
- Αέριο άζωτο

Πρότυπα διαλύματα λιπιδίων καθαρότητας (99%) σε χλωροφόρμιο

- Εστέρες στερολών

- Χοληστερόλη
- 1,2 Διγλυκερίδια
- Μονογλυκερίδια
- Τριγλυκερίδια
- Ελεύθερα λιπαρά οξέα
- Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
- Φωσφατιδυλοχολίνη
- Φωσφατιδυλοσερίνη
- Λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
- Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
- Σφιγγομυελίνη

Συστήματα ανάπτυξης για διαχωρισμό των λιπιδίων

- Ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης: εξάνιο-διαιθυλαιθέρας-μυρμηκικό οξύ 60:15:1.5 (v/v/v)
- Πολικό σύστημα ανάπτυξης: χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό 50:20:2 (v/v/v)

Όργανα και σκεύη

- Μικροσύριγγες Hamilton
- Αναλυτικός ζυγός
- Θάλαμοι ανάπτυξης
- Chromarods: Types SIII (Silica gel type)
- Iatroscan MK-6 (TLC/FID–FPD Analyser) (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Tokyo, Japan)

Αναλυτική πορεία

Λαμβάνονται μίγματα λιπιδίων (ολικά, ουδέτερα και πολικά), εξατμίζονται μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου και το υπόλειμμα αναδιαλύεται σε χλωροφόρμιο/μεθανόλη (9:1 v/v) προς σχηματισμό διαλύματος συγκέντρωσης 10-20 mg/mL. Από κάθε δείγμα λιπιδίων λαμβάνονται 0.5-1.0 μL διαλύματος και τοποθετούνται με μικροσύριγγα σε απόσταση 1.0 cm από το ένα άκρο της ράβδου. Λαμβάνονται διαλύματα πρότυπων λιπιδίων (εστέρες στερολών, χοληστερόλη, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, τριγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, σφιγγομυελίνη, λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, καθαρότητας 99%) ίδιας συγκέντρωσης. Οι ράβδοι τοποθετούνται στη συνέχεια σε κορεσμένο θάλαμο με κατάλληλο σύστημα διαλυτών ανάπτυξης. Όταν ολοκληρωθεί

η ανάπτυξη, οι ράβδοι ανασύρονται από το θάλαμο και αφήνονται μέχρι πλήρους εξάτμισης των διαλυτών. Μια ράβδος (η πρώτη συνήθως) λαμβάνεται κενή ώστε να χρησιμοποιηθεί για λευκό προσδιορισμό. Ακολουθεί τοποθέτηση των ράβδων στο θάλαμο του Iatroscan και καύση των διαχωρισμένων λιπιδίων με φορά από το μέτωπο του διαλύτη προς το σημείο τοποθέτησης των δειγμάτων [170].

5.7.4.1.1.3.1 Περιγραφή και χρήση του Iatroscan TLC-FID

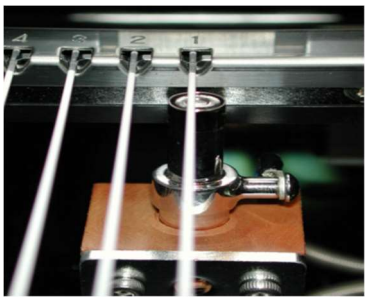
Το Iatroscan MK-6 (TLC / FID–FPD Analyser) (Iatron Laboratories, Tokyo, Japan) είναι ένα αυτόματο σύστημα ανίχνευσης λιπιδικών συστατικών. Διαχωρίζει τα λιπιδικά συστατικά με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (Flame Ionization Detector, FID) και ένα φωτομετρικό ανιχνευτή (Flame Photometry Detector, FPD) (εικόνα 5-6). Η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος για το διαχωρισμό των συστατικών πραγματοποιείται σε ράβδους λεπτής στιβάδας από χαλαζία επιστρωμένες με κατάλληλο ανόργανο προσροφητικό υλικό (Silica-gel ή Alumina), τα Chromarods (εικόνα 5-7). Τα Chromarods είναι τοποθετημένα καθ' όλην τη διάρκεια της πειραματικής διεργασίας σε μεταλλικό πλαίσιο χωρητικότητας δέκα ράβδων και με βαθμονόμηση του ύψους των ράβδων (1-100 mm) [169].

Συνθήκες λειτουργίας

Η ευαισθησία του ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (FID) (εικόνα 5-8) εξαρτάται από την ταχύτητα ροής του αέρα και του υδρογόνου, όπως και από την ταχύτητα σάρωσης των ράβδων από τον καυστήρα. Η βέλτιστη ροή αέρα και υδρογόνου είναι αντίστοιχα 2 L/min και 160 mL/min. Μικρότερη ροή υδρογόνου μειώνει τη θερμοκρασία της φλόγας και μπορεί να επιφέρει ατελή καύση ορισμένων συστατικών. Η ταχύτητα σάρωσης των ράβδων από τον καυστήρα μπορεί να κυμανθεί από 10 έως 60 sec/ράβδο, επιλέγεται δε ως βέλτιστη η τιμή των 20-30 sec/ράβδο (0.50-0.33 cm/sec) [170].

Εικόνα 5-6: Iatroscan MK-6 (TLC/FID–FPD Analyser)

Εικόνα 5-7: Τοποθέτηση δείγματος στα Chromarods



Εικόνα 5-8: Καύση των Chromarods με φλόγα υδρογόνου

5.7.4.1.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Αρχή μεθόδου

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) είναι μια μέθοδος διαχωρισμού υγρής-στερεής εκχύλισης. Στηρίζεται στην ιδιότητα του προσροφητικού υλικού (silica gel) να κατακρατά τις διάφορες ουσίες λόγω της διαφορετικής τους φύσης. Ιοντοανταλλακτικά φαινόμενα εξαιτίας της ήπιας όξινης φύσης των σωματιδίων της silica gel επηρεάζουν τους διαχωρισμούς που βασίζονται σε τέτοιο προσροφητικό υλικό. Τα κλάσματα ανακτώνται μετά από έκλουση με κατάλληλο διαλύτη. Η SPE είναι κατάλληλη μέθοδος για τον διαχωρισμό του λίπους σε ουδέτερα και πολικά λιπίδια ώστε να επιτευχθεί η περαιτέρω ανάλυσή τους [171].

Αντιδραστήρια

- Χλωροφόρμιο ($CHCl_3$)
- Μεθανόλη (MeOH)
- Διαιθυλαιθέρας ($C_4H_{10}O$)
- Οξικό οξύ ($C_2H_4O_2$)
- 2-προπανόλη (C_3H_8O)
- Επτάνιο (C_7H_{16})
- Αέριο άζωτο

Όργανα και σκεύη

- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Πιπέτες Pasteur
- Αναλυτικός ζυγός
- Μικροστήλες SPE αμινοπροπυλο-συζευγμένη σε πυριτική πηκτή (aminopropyl modified silica, Bond Elut-columns, 3 cc/ 500 mg, NH_2, Supelco, USA)

- Ειδικός θάλαμος κενού τύπου Sep-Pack

Αναλυτική πορεία

Αρχικά πραγματοποιείται ενεργοποίηση (conditioning) του προσροφητικού υλικού των 500 mg NH_2 προσθέτοντας 2x2 mL επτανίου σε όλες τις στήλες. Ζυγίζονται 10-20 mg λίπους σε αριθμημένους δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 mL, αφού πρώτα οι διαλύτες των δειγμάτων εξατμισθούν πλήρως με χρήση ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια το λίπος επαναδιαλύεται σε 0.5 mL χλωροφορμίου. Χωρίς να στεγνώσει η επιφάνεια του προσροφητικού υλικού, τα δείγματα μεταφέρονται (loading) με πιπέτα Pasteur στις μικροστήλες. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες εκπλένονται (washing) με χλωροφόρμιο άλλες 2 φορές προσθέτοντας από 0.3 mL κάθε φορά ώστε να παραληφθεί όλη η ποσότητα του λίπους και μεταφέρονται στις μικροστήλες.

Για να πραγματοποιηθεί η έκλουση (elution) των ουδετέρων λιπιδίων (NL), προστίθενται 2x2 mL δ/τος χλωροφορμίου/2-προπανόλη (2:1 v/v) στις μικροστήλες, προσέχοντας να μην ξηραθούν οι στήλες. Με τον τρόπο αυτό συλλέγονται τα ουδέτερα λιπίδια στους δοκιμαστικούς σωλήνες (εικόνα 5-9) .

Εικόνα 5-9: Εκχύλιση ουδετέρων λιπιδίων με SPE

Για την παραλαβή των ελευθέρων λιπαρών οξέων (FFA) μεταφέρονται οι μικροστήλες σε άλλους αριθμημένους δοκιμαστικούς σωλήνες. Στη συνέχεια προστίθενται 3x2 mL διαλύματος διαιθυλαιθέρα/οξικού οξέος (98:2 v/v). Τα FFA επειδή δεν μελετώνται περαιτέρω, απομακρύνονται ώστε στη συνέχεια να συλλεχθούν χωριστά τα κλάσματα των πολικών λιπιδίων.

Στη συνέχεια, οι μικροστήλες μεταφέρονται σε άλλους (τρίτους) αριθμημένους δοκιμαστικούς σωλήνες, για την εκχύλιση των πολικών λιπιδίων. Τα πολικά λιπίδια εκχυλίζονται με προσθήκη 3x2 mL μεθανόλης (εικόνα 5-10). Τα κλάσματα των ουδέτερων και πολικών λιπιδίων εξατμίζονται με ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται σε 1-2 mL χλωροφορμίου-μεθανόλης 9:1 (v/v), ώστε να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων τους με χρήση GC-FID [171].

Εικόνα 5-10: Εκχύλιση πολικών λιπιδίων με SPE

5.7.4.1.2.1 Περιγραφή και χρήση της SPE

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία SPE στερεών φάσεων οι οποίες διατίθενται σε μορφή στηλών μιας χρήσης. Τα προσροφητικά μέσα που χρησιμοποιούνται αποτελούνται συνήθως από μεγάλα σωματίδια (30-60 mm) με πόρους διαμέτρου ~60Å, ενώ είναι τοποθετημένα μέσα σε πλαστικούς σωλήνες σε μορφή σύριγγας από πολυαιθυλένιο ή πολυπροπυλένιο. Πολλές αναλύσεις λιπιδίων με SPE γίνονται ακολουθώντας μια προκαταρκτική εκχύλιση του δείγματος με χλωροφόρμιο ή άλλους πολικούς διαλύτες καθιστώντας τη silica gel κατάλληλο προσροφητή για διαχωρισμούς και καθαρισμούς. Οι πολικές σιλανονικές ομάδες κατακρατούν πολικές ενώσεις και η ανάκτηση της ουσίας με έκλουση συσχετίζεται άμεσα με την πολικότητα των διαλυτών. Η silica κατακρατεί ποικίλες ποσότητες νερού που μπορεί να επηρεάσουν τους διαχωρισμούς. Για αυτόν το λόγο, οι στήλες πιθανόν να απαιτούν ξήρανση πριν την ανάλυση ή χρήση διαλυτών με ελεγχόμενα αφυδατικά συστατικά. Η silica gel δεν προκαλεί υδρόλυση των λιπαρών οξέων από φωσφογλυκερίδια ή άλλες τάξεις εστεροποιημένων λιπαρών οξέων, πρόβλημα που πιθανόν να δημιουργηθεί από άλλες τεχνικές όπως PLTC. Αυτό το πλεονέκτημα οφείλεται στον πολύ μικρότερο χρόνο διαχωρισμού της SPE. Επίσης η SPE προτιμάται έναντι άλλων παραδοσιακών τεχνικών διαχωρισμού λιπιδίων, διότι είναι γρήγορη, εύκολη ως προς τη χρήση της και απαιτεί μικρές ποσότητες διαλυτών. Ο εξοπλισμός της είναι φθηνός και μικρός σε μέγεθος [171].

5.7.5 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων με GC-FID

Αρχή μεθόδου

Τα λιπαρά οξέα των δειγμάτων μετατρέπονται στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες μέσω trans-εστεροποίησης σε αλκαλικό περιβάλλον. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η πτητικότητα των λιπαρών οξέων. Εν συνεχεία, οι μεθυλεστέρες εκλούονται στον αεριοχρωματογράφο (Gas Chromatograph, GC). Καθώς οι μεθυλεστέρες διαπερνούν τη στήλη κατανέμονται ανάμεσα στο υλικό της στατικής φάσης και του φέροντος αερίου. Η ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων γίνεται με σύγκριση των χρόνων κατακράτησης τους (Retention Time, Rt) με τους χρόνους κατακράτησης των προτύπων μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων. Έτσι παρέχεται η δυνατότητα προσδιορισμού της σχετικής αναλογίας των λιπαρών οξέων στο υπό μελέτη δείγμα [122].

Αντιδραστήρια

- n-εξάνιο 95%
- Διάλυμα KOH 2.0N σε μεθανόλη
- Άνυδρο στερεό θειικού νατρίου (Na_2SO_4)
- Διάλυμα NaOH/MeOH 0.5M (10g NaOH σε 500mL MeOH)
- Διάλυμα τριφθοριούχου βορίου σε μεθανόλη ($C_2H_8BF_3O_2$, boron trifluoride methanol complex solution)
- Διάλυμα διβουτυλυδροξυτολουολίου (butylhydroxytoluene)/n-επτάνιο (100mg BHT σε 1L n-επτανίου)
- Κορεσμένο διάλυμα NaCl σε νερό (40g NaCl σε 100mL H_2O)
- Αέριο άζωτο

Πρότυπα διαλύματα λιπαρών οξέων

- Εσωτερικό πρότυπο, λαυρικό οξύ ›99%
- Supelco™ 37 Component FAME Mix C_4-C_{24}, 100mg Neat (Merck, Darmstadt, Germany)
- Supelco PUFA, No. 1, Marine Source, 100mg Neat (Merck, Darmstadt, Germany)
- Εσωτερικό πρότυπο C23:0 (1g C23:0 σε 50 mL MeOH/n-επτάνιο, 1/50 v/v)
- Πρότυπα διαλύματα λιπαρών οξέων της Merck ή Sigma

Όργανα και σκεύη

- Φιαλίδια GC
- Δοκιμαστικοί σωλήνες με καπάκι
- Πιπέτες Pasteur

- Μικροσύριγγες Hamilton
- Αναλυτικός ζυγός
- Κυκλοαναδευτήρας
- Υδατόλουτρο
- Στήλη DB-23 capillary column (60m×0.25mm i.d., 0.15μm film) [50% Cyanopropyl-methylpolysiloxane] και στήλη DB-WAX silica capillary column (10m×0.1mm i.d., 0.1μm film)
- Αέριο ηλίου (He) (φέρον αέριο)
- Αέριο υδρογόνου (H_2) (καύσιμο)
- Ατμοσφαιρικός αέρας (οξειδωτικό)
- Αεριοχρωματογράφος Agilent 6890 Series Gas Chromatograph με ανιχνευτή ιοντισμού με φλόγα υδρογόνου (FID) και Αεριοχρωματογράφος Agilent 7890A Series Gas Chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) με αυτόματο αναλυτή
- Η/Υ με το υποστηρικτικό λογισμικό Hewlett Packard (Agilent) ChemStation Software
- Καταγραφέας HP

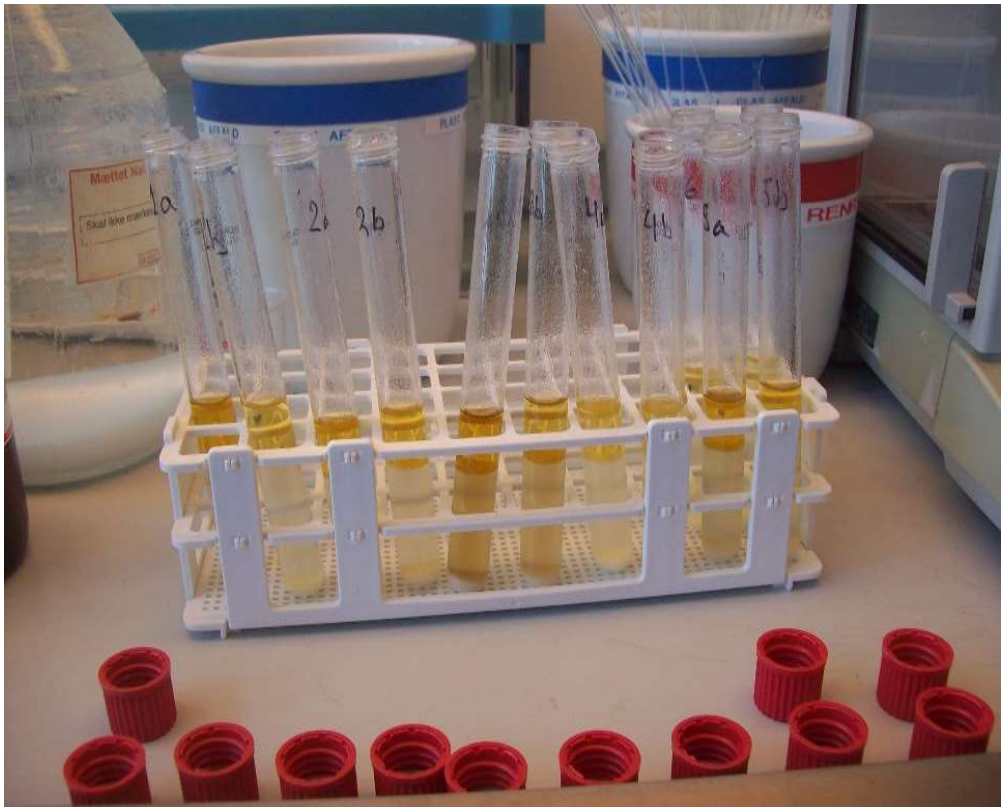
Trans-εστεροποίηση

Α) Δείγμα λιπιδίων έως 50mg εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Κατόπιν, προστίθενται 0.75 mL n-εξανίου με το εσωτερικό πρότυπο του λαυρικού οξέος στον ίδιο διαλύτη και 0.1 mL KOH 2.0N σε μεθανόλη. Το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται ισχυρά για 2 min σε κυκλοαναδευτήρα. Στη συνέχεια προστίθενται 0.2 g Na_2SO4 (αφυδατικό μέσο) και το σύστημα αφήνεται για ~25min προς εξισορρόπηση των φάσεων. Στο υπερκείμενο (φάση εξανίου) λαμβάνονται οι μεθυλεστέρες, ενώ στο ίζημα κάθονται η γλυκερίνη και άλλα αδιάλυτα συστατικά του δείγματος. Το δείγμα των μεθυλεστέρων εισάγεται με μικροσύριγγα του 1 μL. Λαμβάνεται 1 μL δείγματος. Πρέπει να επισημανθεί ότι οι μεθυλεστέρες είναι ασταθείς και ο προσδιορισμός τους πρέπει να γίνεται αμέσως μετά τη μεθανόλυση.

Β) Δείγμα 20-50 mg λίπους λαμβάνεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες με καπάκι. Τα δείγματα ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, ύστερα από πλήρη εξάτμιση του διαλύτη μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια προστίθενται 250 μL εσωτερικού προτύπου C23:0 και 1 mL διαλύματος NaOH/MeOH 0.5M. Βιδώνονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες και βράζονται για 5min σε υδατόλουτρο.

Στη συνέχεια αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να κρυώσουν. Προστίθεται 1.5 mL μεθανολικού διαλύματος τριφθοριούχου βορίου ($C_2H_8BF_3O_2$ - καταλύτης) και οι δοκιμαστικοί σωλήνες ξαναβράζονται για 5min στο υδατόλουτρο. Αφού κρυώσουν, προστίθενται 5 mL κορεσμένου διαλύματος NaCl και 2.5 ml διαλύματος n-επτανίου/BHT. Το BHT προστίθεται για αποφυγή ταγγίσματος των λιπαρών οξέων. Αναδεύονται ισχυρά για 30 sec σε κυκλοαναδευτήρα. Το σύστημα αφήνεται προκειμένου να γίνει εξισορρόπηση των φάσεων (εικόνα 5-11). Στο υπερκείμενο λαμβάνονται οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων, ενώ στο ίζημα παραμένουν η γλυκερίνη και τα άλλα αδιάλυτα συστατικά του δείγματος. Τα δείγματα των μεθυλεστέρων μεταφέρονται με πιπέτα Pasteur σε φιαλίδιο GC. Τοποθετούνται στον αυτόματο αναλυτή, έτοιμα προς ανάλυση και εκλούονται 1.5 μL από τα FAME στον αεριοχρωματογράφο (GC 7890A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), ο οποίος είναι συνδεδεμένος με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας υδρογόνου (Flame Ionisation Detector, FID). Τέλος συγκρίνονται οι χρόνοι έκλουσης των πρότυπων δειγμάτων με τους χρόνους έκλουσης των μεθυλεστέρων του δείγματος [172].

.



Εικόνα 5-11: Σχηματισμός διφασικού συστήματος των λιπαρών οξέων για εξισορρόπηση των φάσεων

5.7.5.1 Περιγραφή και χρήση της GC-FID

Αρχή μεθόδου

Η αεριοχρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) ανήκει στις μεθόδους διαχωρισμού πτητικών ενώσεων ή ενώσεων που έχουν την ικανότητα να καθίστανται πτητικές. Συνεπώς, στόχος της είναι να διαχωρίσει τις ενώσεις ώστε να προσδιορίσει την ταυτότητά τους (ποιοτική ανάλυση) και την ποσότητά τους (ποσοτική ανάλυση) [122].

Η GC για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων είναι συνήθως συνδεδεμένη με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (Flame Ionization Detector, FID) (εικόνα 5-12). Ο εν λόγω ανιχνευτής χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία, χαμηλό θόρυβο, ανθεκτικότητα και ευκολία στη χρήση του. Οι οργανικές ενώσεις παράγουν ιόντα και ηλεκτρόνια όταν πυρολυθούν από τη φλόγα υδρογόνου/αέρα, με αποτέλεσμα να άγουν τον ηλεκτρισμό μέσω της φλόγας δημιουργώντας ηλεκτρικό ρεύμα. Ο FID ανιχνεύει τη διαφορά δυναμικού μεταξύ του ακροφυσίου του καυστήρα και ενός ηλεκτροδίου-συλλέκτη που βρίσκεται ακριβώς πάνω από τη φλόγα [122].

Συνθήκες λειτουργίας

Για την GC-FID μοντέλου Agilent 6890 και στήλης DB-23 το πρόγραμμα ξεκίνησε με θερμοκρασία τους 100°C στα 0 min. Στη συνέχεια αυξήθηκε από τους 100°C έως τους 150°C με ρυθμό 10°C/min και διατηρήθηκε σταθερή στους 150°C για 0 min, μετά αυξήθηκε από τους 150°C στους 195°C με ρυθμό 2°C/min και διατηρήθηκε στους 195°C για 5min. Ακολούθησε αύξηση από τους 195°C στους 210°C με ρυθμό 1°C/min Διατηρήθηκε στους 210°C για 0 min και τέλος, αυξήθηκε από τους 210°C στους 240°C με ρυθμό 10°C/min όπου διατηρήθηκε σε αυτήν τη θερμοκρασία για 5min. Η ανάλυση διήρκησε περίπου 5min. [170].

Για την GC-FID μοντέλου Agilent 7890A και στήλης DB-WAX το πρόγραμμα ξεκίνησε με θερμοκρασία τους 160°C στα 0 min. Στη συνέχεια αυξήθηκε από τους 160°C έως τους 200°C με ρυθμό 10.6°C/min και διατηρήθηκε σταθερή στους 200°C για 0.3min, μετά αυξήθηκε στους 220°C με ρυθμό 10.6°C/min και διατηρήθηκε εκεί για 1 min. Ακολούθησε αύξηση ως τους 240°C με ρυθμό 10.6°C/min και παρέμεινε για 3.8 min. Χρησιμοποιήθηκε “split ratio” 1:25 [173].

Εικόνα 5-12: Αεριοχρωματογράφος (GC-FID)

Εικόνα 5-13: Αυτόματος δειγματολήπτης

5.7.6 Προσδιορισμός καροτενοειδών με HPLC-DAD

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ταυτοποίηση διαφόρων ενώσεων καροτενοειδών ολικού λίπους με χρήση υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συνδεδεμένη με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (Diode Array Detector, DAD) [174].

Αντιδραστήρια

- Αέριο άζωτο
- Ακετόνη
- n-εξάνιο
- Διάλυμα κινητής φάσης (ακετονιτρίλιο,1-βουτανόλη, μεθυλενοχλωρίδιο)

Πρότυπα διαλύματα καροτενοειδών

- Ασταξανθίνη
- Ζεαξανθίνη
- Κανθαξανθίνη
- Λουτεΐνη
- Εστέρες της ασταξανθίνης
- α- κρυπτοξανθίνη
- β-κρυπτοξανθίνη

Όργανα και σκεύη

- Αναλυτικό ζυγός
- Φιαλίδια HPLC
- Φίλτρα

- Στήλη C30 (250×4.6 mm I.D., 5μm σωματιδίου) της YMC (Tokyo, Japan)
- Υγροχρωματογράφος υψηλής απόδοσης HPLC (Hewlett Packard Series 1100, Waldbronn, Germany)
- Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (HP 1100 Series Diode Array Detector)
- Τεταρτοταγής αντλία (HP 1100 Quaternary Pump)
- Μικροαπαερωτής κενού (Agilent 1100 Series Micro Vacuum Degasser)
- Εγχυτήρας δείγματος (Rheodyne model 7010 Sample Injector)
- Λογισμικό ChemStation με LC 3D λογισμικό (Agilent Technologies 1999-2000, Waldbronn, Germany)

Αναλυτική πορεία

Δείγμα λιπιδίων έως 100 mg εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και αναδιαλύεται σε διάλυμα ακετόνης-εξανίου (2:3 v/v). Στη συνέχεια το δείγμα φιλτράρεται μέσω μιας μεμβράνης 0.45 μm, ώστε να αφαιρεθούν σωματιδιακά κατάλοιπα πριν την ένεση. Εγχύονται 20 μL διαλύματος στην HPLC-DAD ανάλυση. Ο προσδιορισμός των καροτενοειδών του δείγματος γίνεται συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησης και τα φάσματα απορρόφησης με τα πρότυπα αναφοράς και τα χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης. Στη συνέχεια, τα καροτενοειδή υπολογίζονται σε επί τοις εκατό ποσοστά [174].

5.7.6.1 Περιγραφή και χρήση της HPLC-DAD

Αρχή μεθόδου

Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (εικόνα 5-14) στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ δύο φάσεων, μιας ακίνητης (stationary phase) και μιας κινητής (mobile phase). Η κινητή φάση μετακινεί τα συστατικά του μίγματος επί της ακίνητης με διαφορετική ταχύτητα. Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές τεχνικές, η συγκεκριμένη τεχνική είναι πιο γρήγορη, με μεγαλύτερη

Εικόνα 5-14: Συνδεσμολογία HPLC-DAD

ευαισθησία, με καλύτερη διαχωριστική ικανότητα και με δυνατότητα πολλαπλής χρήσης της ίδιας στήλης [122].

Ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (Diode Array Detector, DAD) κρίνεται κατάλληλος ανιχνευτής για τον προσδιορισμό των καροτενοειδών του λίπους γιατί θεωρείται από τους αποτελεσματικότερους φασματοφωτομετρικούς ανιχνευτές υπεριώδους φάσματος (εικόνα 5-14). Έχει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει την επιλογή διαφορετικών μηκών κύματος για κάθε κορυφή, κάτι που είναι χρήσιμο όταν δεν υπάρχουν πληροφορίες για τη μοριακή απορροφητικότητα του δείγματος [122].

Συνθήκες λειτουργίας

Η HPLC που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από στήλη C30 (250×4.6 mm I.D., 5μm), ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD), τεταρτοταγή αντλία, μικροαπαερωτή κενού και εγχυτήρα δείγματος.

Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο (A), 1-βουτανόλη (B) και μεθυλενο-χλωρίδιο (C). Η σειρά έκλουσης ήταν: 69.3% A, 29.7% B και 1.0% αρχικά, μετά από 10 min ήταν 67.2% A, 28.8% B και 4% C, στα 20 min 61.6% A, 26.4% B και 12% C, στα 40 min 49% A, 21% B και 30% C και στα 50 min έφτασε πάλι στο 69.3% A, 29.7% B και 1% C. Ο ρυθμός ροής διατηρήθηκε στα 2 μL/min. Το μήκος κύματος μελέτης ήταν τα 250-600 nm [174].

5.7.7 Ανάλυση αρσενολιπιδίων με HPLC-ICPMS

Αρχή μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην εκχύλιση των αρσενολιπιδίων με οργανικούς διαλύτες και χρήση HPLC-ICPMS.

Αντιδραστήρια

- n-επτάνιο (C_7H_{16})
- Μεθανόλη (MeOH)
- Μυρμηκικό οξύ (CH_2O_2)
- Απιονισμένο νερό
- Αέριο άζωτο

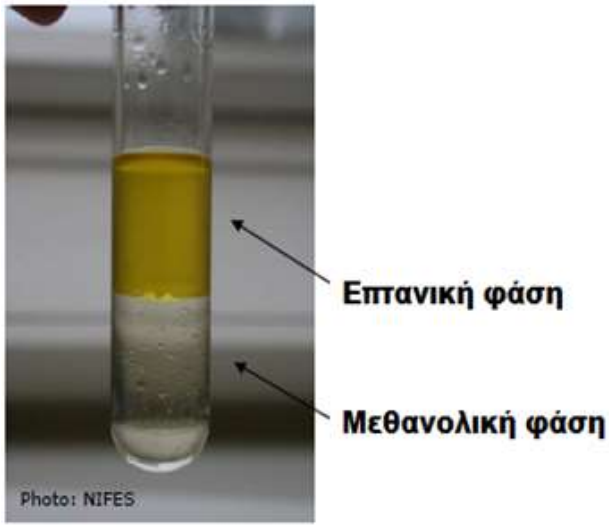
Όργανα και σκεύη

- Πλαστικοί σωλήνες

- Δοκιμαστικοί σωλήνες με καπάκι
- Πιπέτες Pasteur
- Κυκλοαναδευτήρας
- Φυγόκεντρος
- HPLC-ICPMS

Αναλυτική πορεία

Ζυγίζεται 1 g λίπους σε πλαστικό σωλήνα. Προστίθενται 7.5 mL επτανίου και το δείγμα αναδεύεται για 10 min σε κυκλοαναδευτήρα. Προστίθενται 3.75 mL MeOH/H_2O (9/1 v/v). Στη συνέχεια γίνεται ανάδευση του δείγματος για 15 min. Φυγοκεντρείται για 5 min σε 3000rpm. Δημιουργείται διφασικό σύστημα. Μεταφέρεται η κάτω φάση (μεθανολική φάση) (εικόνα 5-15) με πιπέτα Pasteur σε γυάλινο σωλήνα. Ξαναπροσθέτουμε 3.75 mL MeOH/H2O (9/1 v/v) στον αρχικό σωλήνα που περιέχει την επτανική φάση. Αναδεύουμε ξανά το δείγμα για 15 min και φυγοκεντρούμε για 5 min σε 3000rpm. Δημιουργείται διφασικό σύστημα. Μεταφέρεται η κάτω φάση (μεθανολική φάση) με πιπέτα Pasteur στον γυάλινο σωλήνα που περιέχει την πρώτη μεθανολική φάση. Ακολουθεί εξάτμιση των δύο φάσεων με άζωτο μέχρι ξηρού. Αναδιαλύονται με προσθήκη 0.5-1 mL επτανίου για την επτανική φάση και 0.5-1 mL μεθανόλης για την μεθανολική φάση. Τα διαλύματα σφραγίζονται και αποθηκεύονται στην κατάψυξη για να μελετηθούν στη συνέχεια με HPLC-ICPMS.



Εικόνα 5-15: Διφασικό σύστημα για ανάλυση αρσενολιπιδίων

Συνθήκες λειτουργίας

Οι συνθήκες λειτουργίας της HPLC-ICPMS που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση αρσενολιπιδίων ήταν: στήλη waters acquity BEH C_{18} (2.1x100mm, 1.7μm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA), μέθοδος βαθμιδωτή έκλουση (gradient), όγκος έκχυσης (injection vol.) 3 μl, ροή (flow) 0.14 mL/min, θερμοκρασία στήλης (temperature column) 30°C, κινητή φάση A (mobile phase A) 0.1% μυρμηκικό οξύ σε νερό και κινητή φάση B (mobile phase B) 0.1% μυρμηκικό οξύ σε μεθανόλη. Πρόγραμμα έκλουσης: 0-2 min 30-100%B, 2-52 min 100%B, 53-60 min 30%B.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΛΙΠΙΔΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΜΥΩΝ ΚΑΙ ΚΕΦΑΛΟΘΩΡΑΚΩΝ ΤΩΝ ΚΟΚΚΙΝΩΝ ΚΑΙ ΡΟΖ ΓΑΡΙΔΩΝ (*A. FOLIACEA* ΚΑΙ *P. LONGIROSTRIS*)

6.1 Εισαγωγή

Οι γαρίδες είναι ανάμεσα στους πιο διαδεδομένους θαλάσσιους οργανισμούς στη Μεσόγειο όπου και καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες γιατί αποτελούν σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών για τη διατροφή του ανθρώπου. Είναι πλούσιες σε πρωτεΐνες και μέταλλα, ενώ ταυτόχρονα περιέχουν χαμηλό ποσοστό λίπους (~1-2% νωπού ιστού).

Οι γαρίδες *A. foliacea* (Risso 1827) (εμπορική ονομασία: γιγαντιαία κόκκινη γαρίδα της οικογένειας Aristeidae) είναι ευρέως διαδεδομένες στον ανατολικό και δυτικό Ατλαντικό, στον Ειρηνικό, τον Ινδικό ωκεανό και τη Μεσόγειο θάλασσα. Απαντώνται σε βάθη από 250 έως 1300 m., ως επί το πλείστον στα 500-700 m. [18]. Οι *P. longirostris* (Lucas 1846, εμπορική ονομασία: ροζ γαρίδα βαθέων υδάτων) της οικογένειας Penaeidae ζουν σε βάθη που κυμαίνονται από 20 έως 700 m. Απαντώνται συνήθως σε όλη τη Μεσόγειο και τον Ατλαντικό, καθώς και στη Δύση (από τη Μασαχουσέτη έως τη Γουιάνα) και την Ανατολή (από την Πορτογαλία έως την Αγκόλα) [18].

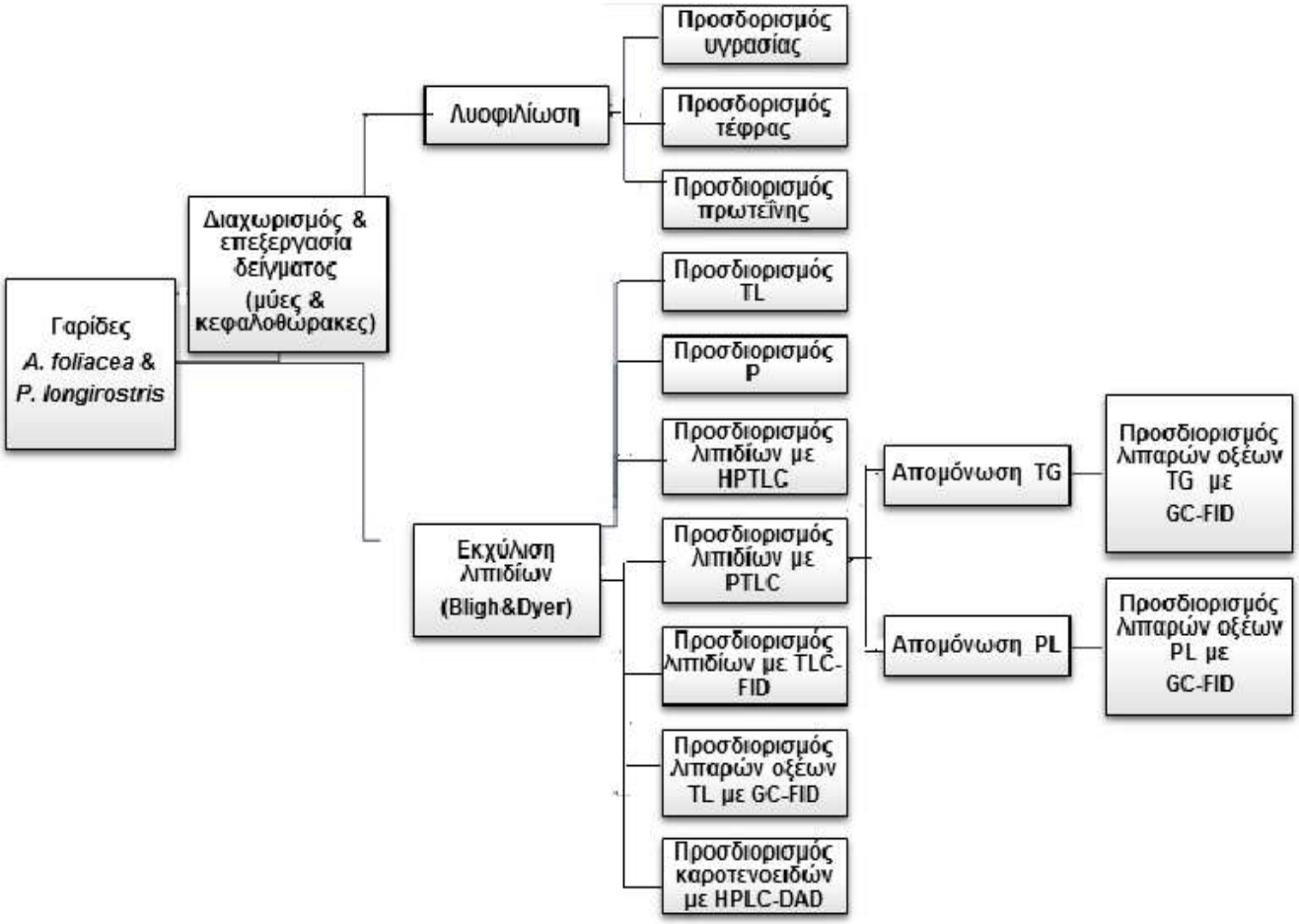
Οι *A. foliacea* χαρακτηρίζονται από έντονο κόκκινο χρώμα και θεωρούνται μεγάλου μεγέθους (13-20 cm), ενώ οι *P. longirostris* διακρίνονται από ένα χαρακτηριστικό ροζ χρώμα και το μήκος τους κυμαίνεται από 8 έως 16 cm. [175]. Το χρώμα των γαρίδων οφείλεται στα καροτενοειδή, τα οποία προσδίδουν το χαρακτηριστικό κόκκινο-πορτοκαλί χρώμα [176].

Οι βιολογικές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των γαρίδων οφείλονται σε ποικίλους παράγοντες όπως στις διατροφικές τους συνήθειες, την ηλικία, την εποχή αλίευσης τους και τη μεταβλητότητα των θαλάσσιων ωκεανογραφικών δεδομένων. Γι' αυτό μια αναλυτική και συγκριτική μελέτη από χημικής άποψης μεταξύ των *A. foliacea* και *P. longirostris* θεωρήθηκε χρήσιμη ώστε να παρατηρηθεί αν οι φαινομενικά βιολογικές τους διαφορές, αντικατοπτρίζονταν ποιοτικά και ποσοτικά στη σύσταση των λιπιδίων και των επιμέρους τάξεων.

Σκοπός αυτού του κεφαλαίου ήταν να συγκριθεί και να αξιολογηθεί το προφίλ των βιοδραστικών λιπιδικών συστατικών μυών και κεφαλοθωράκων των δύο ειδών και να εκτιμηθεί η διατροφική τους αξία. Πραγματοποιήθηκε ξεχωριστή ανάλυση μυών και κεφαλοθωράκων, καθώς δεν υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία σχετική με τα βιοδραστικά λιπιδικά συστατικά των κεφαλοθωράκων.

Ο προσδιορισμός των λιπιδίων πραγματοποιήθηκε με διαφορετικές μεθόδους TLC, συγκεκριμένα με HPTLC, PTLC και TLC-FID. Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε με GC-FID, ενώ ο προσδιορισμός των καροτενοειδών με HPLC-DAD. Η πειραματική πορεία των μεθόδων περιγράφεται αναλυτικότερα στο κεφάλαιο 5.

Παρακάτω παρατίθεται συνοπτικό διάγραμμα (σχήμα 6-1) της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε για τη μελέτη των γαρίδων *A. foliacea* (κόκκινες γαρίδες) και *P. longirostris* (ροζ γαρίδες).



Σχήμα 6-1: Πειραματική πορεία ανάλυσης λιπιδίων των γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris*

6.2 Πειραματική πορεία

6.2.1 Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια

Τα πρότυπα διαλύματα λιπιδίων για ανάλυση Iatroscan TLC-FID ήταν η χοληστερόλη, η φωσφατιδυλοχολίνη, η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, η λυσοφωσφατιδυλοαιθανο-λαμίνη, η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, ο φωσφατιδυλοϊνοσίτης, η φωσφατιδυλοσερίνη, τα τριγλυκερίδια, τα διγλυκερίδια, τα μονογλυκερίδια, η σφιγγομυελίνη, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (Sigma-Aldrich Company, Dorset, Great Britain and St. Louis, MO). Πρότυπο δείγμα για την ανάλυση λιπαρών οξέων με GC-FID χρησιμοποιήθηκε το Supelco TM 37 Component FAME Mix C4-C24, 100mg Neat, Catalog No: 18919-1AMP **(**Merck, Darmstadt, Germany). Για την ανάλυση των καροτενοειδών, τα πρότυπα δείγματα ήταν το λυκοπένιο, το β-καροτένιο, η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη, κανθαξανθίνη, α- και β- κρυπτοξανθίνη, ασταξανθίνη, όλα αγορασμένα από την Sigma Chemical Co (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, USA). Όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από την Mallinckrodt Chemical Works (St. Louis, MO) και την Sigma Chemical Co (Sigma-Aldrich Company, UK).

6.2.2 Στάδια πειραματικής πορείας

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη είναι τα ακόλουθα:

- **Δειγματοληψία**
- **Λυοφιλίωση**
- **Εκχύλιση ολικού λίπους με Bligh-Dyer**
- **Προσδιορισμός υγρασίας, τέφρας, πρωτεϊνών και ολικού λίπους**
- **Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου**
- **Ποιοτικός προσδιορισμός των επιμέρους τάξεων των ολικών λιπιδίων με HPTLC σε ουδέτερο και πολικό σύστημα ανάπτυξης**
- **Ποιοτικός προσδιορισμός των επιμέρους τάξεων των ολικών λιπιδίων με PTLC σε ουδέτερο και πολικό σύστημα ανάπτυξης. Απομόνωση της ζώνης των τριγλυκεριδίων και πολικών λιπιδίων**
- **Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους τάξεων των ολικών λιπιδίων με TLC/FID (Iatroscan) σε ουδέτερο και πολικό σύστημα ανάπτυξης**
- **Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων ολικού λίπους, τριγλυκεριδίων και πολικών λιπιδίων με GC-FID**

- **Υπολογισμός διατροφικών δεικτών**
- **Προσδιορισμός καροτενοειδών ολικού λίπους με HPLC-DAD**

6.2.3 Στατιστική ανάλυση

Οι μετρήσεις ελήφθησαν εις τριπλούν για δείγματα αλιευμένα Μάρτιο-Μάιο και για δύο συνεχόμενα έτη (N=6) και υπολογίστηκαν ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των τιμών αυτών (standard deviation, SD). Όλοι οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με SPSS (IBM SPSS Statistics, έκδοση 19.0, Chicago, IL, USA) στατιστικό λογισμικό για Windows.

6.3 Αποτελέσματα

Στη συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα των *A. foliacea* και *P. longirostris* και γίνεται μια συγκριτική μελέτη της χημικής σύστασης των δύο ειδών γαρίδων τόσο μεταξύ τους όσο και με την αντίστοιχη σχετική βιβλιογραφία.

6.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Αρχικά μετρήθηκε το συνολικό μήκος των γαρίδων και το ολικό τους βάρος. Στη συνέχεια τα δύο είδη διαχωρίστηκαν σε μύες και κεφαλοθώρακες. Όπως παρατηρήθηκε, οι *A. foliacea* ήταν μεγαλύτερες σε μέγεθος και βάρος σε σύγκριση με τις *P. longirostris* και τα επιμέρους τμήματα (μύες και κεφαλοθώρακες) των κόκκινων γαρίδων βρέθηκαν πολύ βαρύτερα από τα αντίστοιχα των ροζ. Στον παρακάτω πίνακα 6-1 παρατίθενται οι μέσες τιμές αυτών των προσδιορισμών.

Πίνακας 6-1: Μέσος όρος μήκους των γαρίδων, ολικού βάρους και επιμέρους βάρους ιστών (μύες-κεφαλοθώρακες)

Είδος γαρίδων	***A. foliacea*** **(κόκκινες γαρίδες)**	***P. longirostis*** **(ροζ γαρίδες)**
Μήκος γαρίδας (cm)	15.3±2.57a	9.80±1.63b
Ολικό βάρος γαρίδας (g)	24.98±9.41a	7.26±2.07b
Βάρος κεφαλοθωράκων (g)	12.11±5.27a	3.09±1.38b
Βάρος μυών (g)	9.40±3.30a	3.13±1.16b

- Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για κάθε στάθμη εμπιστοσύνης 95% (N=6)

6.3.2 Προσδιορισμός υγρασίας, πρωτεϊνων, τέφρας και ολικού λίπους

Όπως έχει αναφερθεί, οι γαρίδες όταν παραλήφθηκαν διαχωρίστηκαν σε μύες και κεφαλοθώρακες. Ένα υποσύνολο απομονώθηκε και επεξεργάστηκε για την πραγματοποίηση των προσδιορισμών της υγρασίας, των πρωτεϊνών, της τέφρας και του ολικού λίπους. Στη συνέχεια παρατίθεται πίνακας με τα ποσοστά αυτών των προσδιορισμών σε νωπό ιστό (wet weight, ww) (πίνακας 6-2).

Πίνακας 6-2: Ποσοστά υγρασίας, τέφρας, πρωτεϊνών και ολικού λίπους σε νωπό ιστό (ww) (μυών και κεφαλοθωράκων) κόκκινων και ροζ γαρίδων

Παράμετροι	***A. foliacea* (κόκκινες γαρίδες)**		***P. longirostris* (ροζ γαρίδες)**	
	μύες	**κεφαλοθώρακες**	**μύες**	**κεφαλοθώρακες**
Υγρασία	78.97±1.46a	72.80±1.84b	76.98±0.90c	71.70±0.87b
Τέφρα	1.13±0.02a	2.77±0.39b	2.39±0.32c	5.44±0.41d
Πρωτεΐνες	17.75±0.11a	9.69±0.29b	18.72±0.10c	5.26±0.08d
Ολικό λίπος	0.74±0.04a	7.82±0.37b	1.04±0.14c	4.66±0.35d

- Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για κάθε στάθμη εμπιστοσύνης 95% (N=6).

Από τον πίνακα φαίνεται ότι τα δυο είδη γαρίδων είχαν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ τους. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι στους μύες των κόκκινων γαρίδων μόνο το ποσοστό της υγρασίας ήταν υψηλότερο, σε σύγκριση με το αντίστοιχο ποσοστό των ροζ γαρίδων, ενώ τα υπόλοιπα ποσοστά (πρωτεΐνες, τέφρα και ολικό λίπος) βρέθηκαν χαμηλότερα. Στους κεφαλοθώρακες το γενικό χημικό προφίλ παρουσίασε διαφορετική εικόνα, σε σύγκριση με αυτό που παρατηρήθηκε στους μύες. Ειδικότερα, το ποσοστό της υγρασίας των κόκκινων γαρίδων δεν παρουσίασε σημαντική στατιστική διαφορά με το αντίστοιχο ποσοστό των ροζ. Τα ποσοστά των πρωτεϊνών και του ολικού λίπους των κόκκινων γαρίδων βρέθηκαν σχεδόν στο διπλάσιο από τα αντίστοιχα ποσοστά των ροζ, ενώ εξαίρεση αποτέλεσε το ποσοστό της τέφρας, το οποίο παρατηρήθηκε στις κόκκινες γαρίδες να είναι μικρότερο από αυτό των ροζ.

Συγκρίνοντας όμως τους μύες με τους κεφαλοθώρακες των δύο ειδών, παρατηρήθηκε ότι τα ποσοστά των πρωτεϊνων των μυών ήταν αρκετά υψηλότερα από τα αντίστοιχα ποσοστά των κεφαλοθωράκων ξεπερνώντας και το τριπλάσιο, όπως προσδιορίστηκε στην περίπτωση των ροζ γαρίδων. Το γεγονός ότι οι μύες βρέθηκαν τόσο πλούσιοι σε

πρωτεΐνες, οφείλεται στο ότι οι μύες είναι δομικός ιστός και αποτελούν τον χώρο αποθήκευσης των πρωτεϊνών [175]. Οι γαρίδες λόγω των υψηλών ποσοστών πρωτεϊνών που παρέχουν στον άνθρωπο, μπορούν να θεωρηθούν πλούσια πηγή πρόσληψης πρωτεϊνών [76], καθώς ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να βιοσυνθέσει συγκεκριμένα αμινοξέα και πρέπει να τα προσλαμβάνει μέσω της διατροφής [86]. Σε αντίθεση με τους μύες, στο ηπατοπάγκρεας λαμβάνουν χώρα πολλές βιοχημικές αντιδράσεις, όπως η βιοσύνθεση των λιπιδίων [177], εξού και η παρουσία υψηλών ποσοστών λίπους στους κεφαλοθώρακες (>4%). Τα ποσοστά της υγρασίας των κεφαλοθωράκων παρατηρήθηκαν ελαφρώς χαμηλότερα έναντι αυτών των μυών. Τέλος, τα ποσοστά της τέφρας που προσδιορίστηκαν στους κεφαλοθώρακες ήταν αρκετά υψηλά, σχεδόν στο διπλάσιο σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά των μυών και των δύο ειδών γαρίδας. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι α) οι κεφαλοθώρακες έρχονται σε άμεση επαφή με το θαλάσσιο περιβάλλον και μέσω των βραγχίων απορροφούν διάφορα συστατικά συμπεριλαμβανομένων και των μετάλλων και β) στην παρουσία του ηπατοπαγκρέατος. Είναι γνωστό ότι στο ηπατοπάγκρεας πραγματοποιείται η βιοσυσσώρευση και η αποτοξίνωση των βαρέων μετάλλων, ενώ παράλληλα παρατηρείται ότι οι μύες δεν συμμετέχουν ενεργά στη βιοσυσσώρευση των μετάλλων [178].

Στη συνέχεια, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του πίνακα 6-2 με την αντίστοιχη βιβλιογραφία, τα ποσοστά που προσδιορίστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη έρχονται σε συμφωνία (με μικρές αποκλίσεις) με αυτά που αναφέρονται από έρευνες για διαφορετικά είδη γαρίδων. Γενικότερα, παρατηρείται οι μύες των γαρίδων αποτελούνται από ~75% νερό, ~20% πρωτεΐνες [86], 0.5-2% λίπος [77] και ≤2% τέφρα [86], ποσοστά που συμφωνούν με τον πίνακα 6-2.

Αναλυτικότερα, τα ποσοστά της υγρασίας των μυών όπως αναφέρονται για τις *A. antennatus* (μωβ-κόκκινες γαρίδες) και *P. longirostris* από τους Nunes και Rosa (2003), ήταν ~74% ww [76], ενώ στις υπό μελέτη γαρίδες τα ποσοστά που προσδιορίστηκαν ήταν ελαφρώς υψηλότερα (78.97% ww και 76.98% ww για τις *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα). Παρόμοια ποσοστά παρατηρήθηκαν στις *Penaeus monodon* (black tiger shrimp) και *Penaeus vannamei* (white shrimp) (80.47% ww και 77.21% ww αντίστοιχα) [81].

Στην ίδια έρευνα των Nunes και Rosa (2003), τα ποσοστά πρωτεϊνών των μυών που αναφέρθηκαν για τις *A. antennatus* και *P. longirostris* κυμαίνονταν από 20.8-22% [76], ποσοστά υψηλότερα από αυτά που προσδιορίστηκαν στις υπό μελέτη *A. foliacea* και *P. longirostris* (17.75% ww και 18.72% ww αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα όμως που δόθηκαν για τις *P. monodon* και *P. vannamei* έρχονται σε συμφωνία με τα δεδομένα του πίνακα 6-2. Συγκεκριμένα στις *P. monodon* το ποσοστό των πρωτεϊνών βρέθηκε 17.1% ww και των *P. vannamei* 18.72% ww [82]. Αρκετά χαμηλότερα ποσοστά πρωτεϊνών βρέθηκαν στις γαρίδες *P. martia* (14.2% ww) [116].

Συγκρίνοντας τα ποσοστά της τέφρας της συγκεκριμένης μελέτης με την έρευνα των Nunes και Rosa (2003) παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ειδών. Ειδικότερα, το ποσοστό τέφρας που βρέθηκε στις μωβ-κόκκινες γαρίδες, *A. antennatus*, των Nunes και Rosa (2003) ήταν το διπλάσιο από το αντίστοιχο ποσοστό των υπό μελέτη κόκκινων γαρίδων, *A. foliacea*, ενώ το ποσοστό των ροζ γαρίδων που δόθηκε από τους Nunes και Rosa (2003) ήταν ελαφρώς χαμηλότερο από αυτό των υπό μελέτη ροζ γαρίδων (~2% ww των *P. longirostris* των Nunes και Rosa (2003) και ~2.4% των υπό μελέτη *P. longirostris*) [76].

Τέλος, τα ποσοστά ολικού λίπους όπως δίνονται για τις *A. antennatus* και *P. longirostris* από τους Nunes και Rosa (2003) ήταν πολύ χαμηλότερα (0.1-0.3%) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά που βρέθηκαν στις *A. foliacea* και *P. longirostris* της παρούσας μελέτης (0.74% και 1.04% αντίστοιχα) [76]. Τα ποσοστά όμως ολικού λίπους που δίνονται από την Yerlikaya και την ομάδα της (2013) για τα ίδια είδη γαρίδων (*A. foliacea* και *P. longirostris*) ήταν αρκετά υψηλότερα (2.21% και 1.81% αντιστοίχως) [84].

Σε αυτό το σημείο είναι σκόπιμο να τονισθεί, ότι η σχετική βιβλιογραφία για τους συγκεκριμένους προσδιορισμούς στους κεφαλοθώρακες των γαρίδων είναι περιορισμένη. Ωστόσο, μια σύγκριση με τα αποτελέσματα που δόθηκαν από την Βαλαβανίδου (2013) στη μεταπτυχιακή της μελέτη πάνω στους κεφαλοθώρακες των *A.foliacea* (κατεψυγμένες γαρίδες), θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί [179]. Ειδικότερα, η Βαλαβανίδου (2013) προσδιόρισε χαμηλότερα ποσοστά υγρασίας (67.22% ww) και ολικού λίπους (6.5% ww) στους κεφαλοθώρακες των *A.foliacea* σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά των υπό μελέτη *A.foliacea*. Το ποσοστό της τέφρας που προσδιόρισε στους κεφαλοθώρακες των *A.foliacea*, η Βαλαβανίδου (2013), βρέθηκε σχεδόν στο διπλάσιο (5.50% ww) [179] από αυτό που προσδιορίστηκε

στις υπό μελέτη *A.foliacea* (πίνακας 6-2), αλλά πλησιέστερο του αντίστοιχου ποσοστού των υπό μελέτη ροζ γαρίδων, *P. longirostris* (5.44%ww) (πίνακας 6-2).

6.3.3 Προσδιορισμός ολικού φωσφόρου

Όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 5.7.3, για τον προσδιορισμό του ολικού φωσφόρου, πραγματοποιείται πλήρης καύση του ολικού λίπους με υπερχλωρικό οξύ ώστε να μετατραπεί ο οργανικός φωσφόρος (φωσφολιπίδια) σε ανόργανο. Με τη χρήση κατάλληλων αντιδραστηρίων σχηματίζεται ένα σύμπλοκο κυανούν χρώματος, το οποίο φωτομετρείται στα 820 nm. Στη συνέχεια, με τον συντελεστή $\Sigma_{ψάρια}$=26, υπολογίζεται το ποσοστό των φωσφολιπιδίων των ολικών λιπιδίων και η συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων σε mg ανά 100 g νωπού ιστού. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών αυτών παρατίθενται στον πίνακα 6-3 που ακολουθεί.

Πίνακας 6-3: Ποσοστό φωσφολιπιδίων των ολικών λιπιδίων και συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων σε mg ανά 100 g νωπού ιστού (ww)

Είδος	Ιστός	% φωσφολιπιδίων (w/w) των ολικών λιπιδίων	Φωσφολιπίδια (mg/100g ww)
A. foliacea	**μύες**	81.08±0.02a	591.5±0.02a
(κόκκινες)	**κεφαλοθώρακες**	17.73±1.15b	1386.3±1.15b
P. longirostris	**μύες**	83.67±0.06c	917.2±0.06c
(ροζ)	**κεφαλοθώρακες**	35.38±0.05d	1648.5±0.05d

- Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς (P<0.05) για κάθε στάθμη εμπιστοσύνης 95% (N=6)

Σύμφωνα με τον πίνακα 6-3, οι κόκκινες γαρίδες (μύες και κεφαλοθώρακες) βρέθηκαν να περιέχουν μικρότερα ποσοστά φωσφολιπιδίων σε σύγκριση με τις ροζ. Στην περίπτωση των μυών δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των ειδών, ενώ στους κεφαλοθώρακες το ποσοστό που προσδιορίστηκε στις κόκκινες γαρίδες, βρέθηκε σχεδόν στο μισό. Συγκρίνοντας όμως τα ποσοστά (επί τοις %) φωσφολιπιδίων (ww) των ολικών λιπιδίων των μυών με των κεφαλοθωράκων των δύο ειδών, παρατηρήθηκε ότι οι μύες περιείχαν σημαντικά υψηλότερα (P<0.05) ποσοστά από αυτά των κεφαλοθωράκων και κυμαινόταν από 81.08-83.67% στους μύες, ενώ 17.73-35.38% στους κεφαλοθώρακες. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα, καθώς οι μύες απαιτούν μεγάλα ποσά φωσφολιπίδιων, ώστε να καλύψουν τις δομικές

ανάγκες των κυττάρων και κατ' επέκταση των γαρίδων. Υπολογίζοντας όμως τις ποσότητες των φωσφολιπιδίων σε mg ανά 100 g νωπού ιστού (ww) και παρατηρώντας περαιτέρω τον πίνακα 6-3, φαίνεται ότι οι κεφαλοθώρακες περιείχαν υψηλότερη (P<0.05) ποσότητα φωσφολιπιδίων από τους μύες. Αυτό εξηγείται από τη μεγάλη περιεκτικότητα λίπους των κεφαλοθωράκων (7.82 g λίπους/100 g νωπού ιστού στις *A. foliacea* και 4.66 λίπους/100 g νωπού ιστού στις *P. longirostris*) και τη μικρή περιεκτικότητα λίπους των μυών (0.74 g λίπους/100 g νωπού ιστού και 1.04 g λίπους/100 g νωπού ιστού στις *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα).

6.3.4 Ποιοτικός προσδιορισμός των επιμέρους τάξεων των ολικών λιπιδίων με HPTLC σε ουδέτερο και πολικό σύστημα ανάπτυξης

Με τη χρήση της HPTLC σε ουδέτερο και πολικό σύστημα ανάπτυξης προσδιορίστηκε ποιοτικά η σύσταση του ολικού λίπους των μυών και των κεφαλοθωράκων των *A.foliacea* και των *P. longirostris*. Με τον τρόπο αυτόν επετεύχθη ο διαχωρισμός των επιμέρους τάξεων των ουδετέρων και πολικών λιπιδίων.

Για την εμφάνιση των λιπιδίων έγινε έκθεση των χρωματογραφημάτων σε ατμούς ιωδίου. Στη συνέχεια για την ανίχνευση των αμινομάδων πραγματοποιήθηκε ψεκασμός με αντιδραστήριο νινυδρίνης, ενώ ο φωσφόρος προσδιορίστηκε με αντιδραστήριο Dittmer-Lester. Η αναλυτική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.7.4.1.1.1.

Στη συνέχεια παρατίθενται χαρακτηριστικά χρωματογράφηματα σε ουδέτερο (εικόνα 6-1) και πολικό ((εικόνα 6-2) σύστημα ανάπτυξης των ολικών λιπιδίων κόκκινων και ροζ γαρίδων αντίστοιχα.

Ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης:

- πετρελαϊκός αιθέρας- διαιθυλαιθέρας-οξικό οξύ 70:30:1 (v/v/v)

Πολικό σύστημα ανάπτυξης:

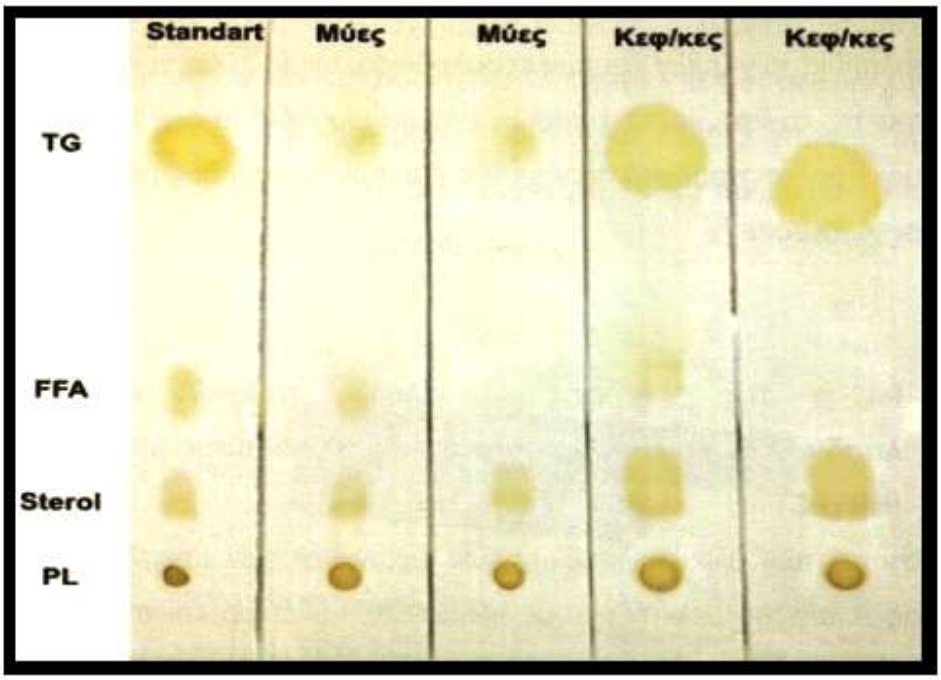
- χλωροφόρμιο-μεθανόλη-οξικό οξύ- νερό 50:25:6:2 (v/v/v/v).

Πρότυπο διάλυμα:

- λιπίδια κρόκου αυγού

Αντιδραστήριο εμφάνισης:

- ατμοί ιωδίου

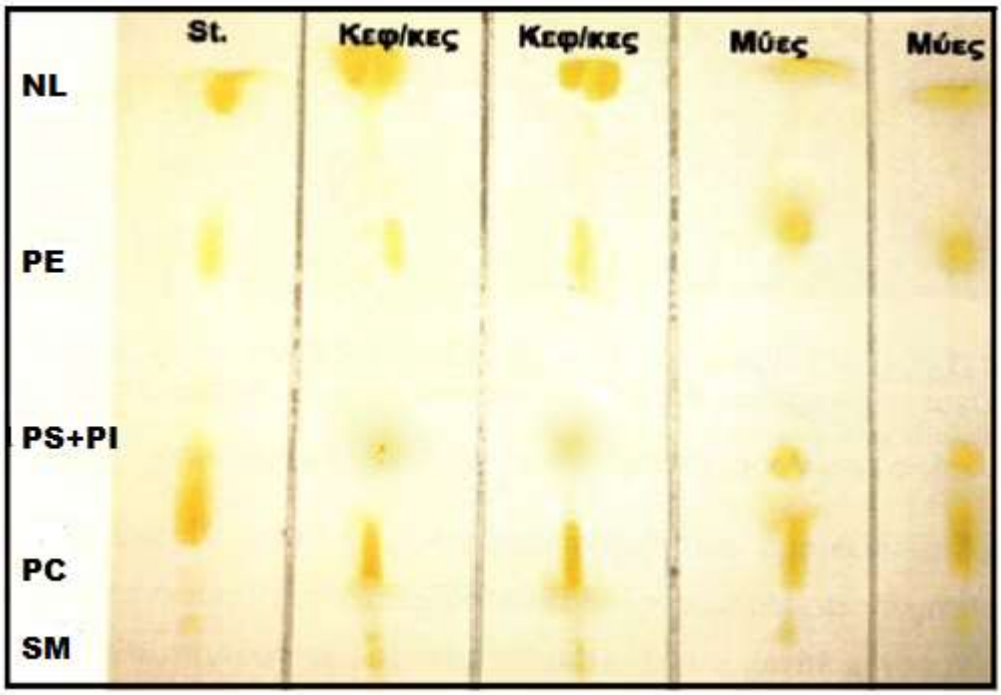


Εικόνα 6-1: Χρωματογράφημα των επιμέρους τάξεων ολικού λίπους των γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα σε ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης

Όπως φαίνεται από το χρωματογράφημα 6-1, με το συγκεκριμένο ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης, το ολικό λίπος των κόκκινων γαρίδων διαχωρίστηκε σε τέσσερα συστατικά (4 κηλίδες), ενώ των ροζ γαρίδων σε τρία συστατικά (3 κηλίδες). Τα συστατικά που προσδιορίστηκαν αρχίζοντας από τη γραμμή βάσης προς τα άνω, ήταν τα πολικά λιπίδια (PL), οι στερόλες (sterols), τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και τα τριγλυκερίδια (TG). Τα κλάσματα των μονογλυκεριδίων και διγλυκεριδίων δεν εμφανίστηκαν στο χρωματογράφημα, διότι πιθανόν να βρίσκονταν σε πολύ μικρά ποσοστά και να επικαλύφθηκαν από άλλες επιμέρους τάξεις όπως την τάξη των στερολών. Το ίδιο πιθανόν να ισχύει και για τους εστέρες χοληστερόλης, οι οποίοι πιθανόν να επικαλύφθηκαν από την τάξη των TG και γι'αυτό να μην εμφανίστηκαν ως κηλίδες. Ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε το λίπος κρόκου αυγού.

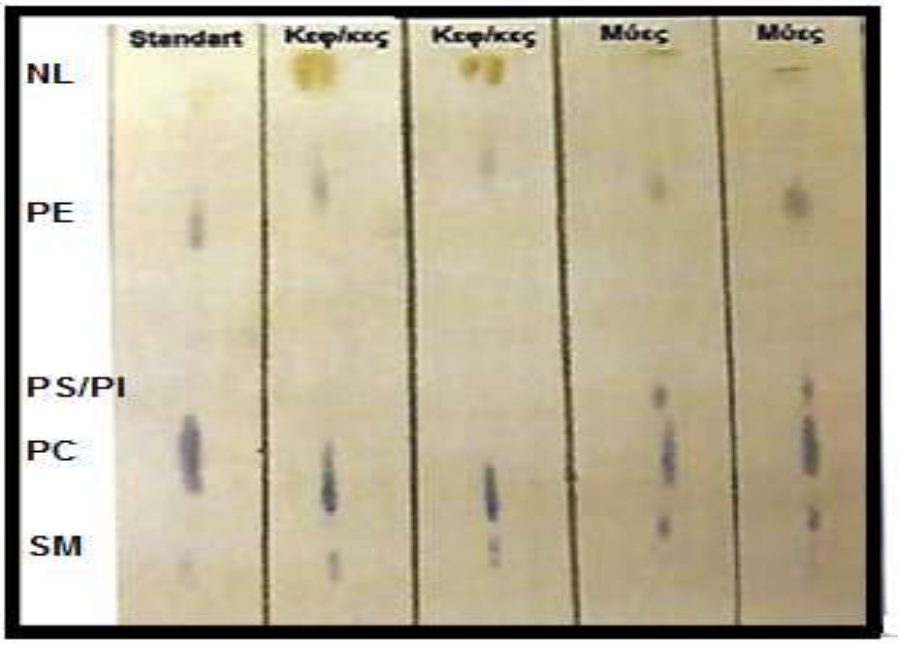
Παρατηρώντας το χρωματογράφημα 6-1 φαίνεται ότι οι γαρίδες μπορούν να θεωρηθούν καλή πηγή ουδετέρων λιπιδίων. Οι στερόλες εμφανίζονται να είναι το κύριο ουδέτερο συστατικό των μυών, τα τριγλυκερίδια ακολουθούν σε μικρότερα ποσοστά, ενώ τα ελεύθερα λιπαρά οξέα φαίνεται να περιέχονται μόνο στους μύες των κόκκινων γαρίδων. Σε αντίθεση με τους μύες, στους κεφαλοθώρακες, το κυρίαρχο ουδέτερο συστατικό φαίνεται να είναι τα τριγλυκερίδια και μάλιστα σε υψηλά ποσοστά.

Οι στερόλες εμφανίζονται σε πολύ χαμηλά ποσοστά και στα δύο είδη, ενώ τα ελεύθερα λιπαρά οξέα φαίνεται να υπάρχουν μόνο στις κόκκινες γαρίδες. Τα αποτελέσματα αυτά βρέθηκαν να έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που διεξήχθηκαν από την ανάλυση με Iatroscan (TLC-FID), όπως θα παρουσιαστούν στη συνέχεια στον πίνακα 6-4.

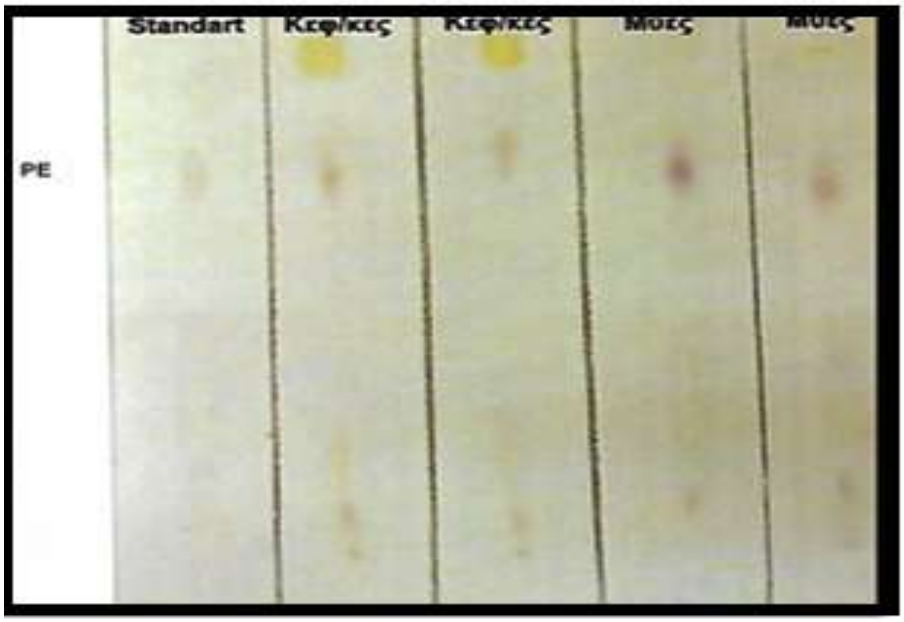


Εικόνα 6-2: Χρωματογράφημα των επιμέρους τάξεων ολικού λίπους των γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα σε πολικό σύστημα ανάπτυξης

Στο συγκεκριμένο πολικό σύστημα ανάπτυξης (εικόνα 6-2), τα ολικά λιπίδια των υπό μελέτη γαρίδων διαχωρίστηκαν σε πέντε τάξεις από τη γραμμή βάσης προς τα πάνω, δηλ. στην τάξη της σφιγγομυελίνης (SM), της φωσφατιδυλοχολίνης (PC), του φωσφατιδυλοϊνοσίτη (PI) ή/και της φωσφατιδυλοσερίνης (PS), της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE) και των ουδετέρων λιπιδίων (NL). Όπως φαίνεται από το χρωματογράφημα οι μύες περιείχαν μεγαλύτερο ποσοστό πολικών λιπιδίων έναντι των κεφαλοθωράκων. Εντούτοις και στους δύο ιστούς κυρίαρχο πολικό λιπίδιο φαίνεται να είναι η PC, ακολουθεί η PE, ενώ τα υπόλοιπα πολικά λιπίδια εμφανίζονται σε μικρότερες ποσότητες. Τα αποτελέσματα αυτά επίσης έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανάλυσης με Iatroscan (TLC-FID).



Εικόνα 6-3: Χρωματογράφημα εμφάνισης φωσφο(νο)λιπιδίων ολικών λιπιδίων των γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα σε πολικό σύστημα ανάπτυξης με αντιδραστήριο Dittmer-Lester



Εικόνα 6-4: Χρωματογράφημα εμφάνισης αμινομάδων ολικών λιπιδίων των γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα σε πολικό σύστημα ανάπτυξης με αντιδραστήριο νινυδρίνης

Από το χρωματογράφημα (εικόνα 6-3) φαίνεται ότι, θετική αντίδραση στο Dittmer-Lester έδωσαν και τα 4 συστατικά (SM, PC, PS+PI και PE) στους μύες και στους κεφαλοθώρακες και των δύο ειδών γαρίδων, ενώ από το χρωματογράφημα εικόνας 6-4 φαίνεται να αντιδρά με την νινυδρίνη μόνο η PE, η οποία περιέχει αμινομάδα.

6.3.5 Ποιοτικός προσδιορισμός των επιμέρους τάξεων των ολικών λιπιδίων με PTLC σε ουδέτερο και πολικό σύστημα ανάπτυξης. Απομόνωση της ζώνης των τριγλυκεριδίων και των πολικών λιπιδίων

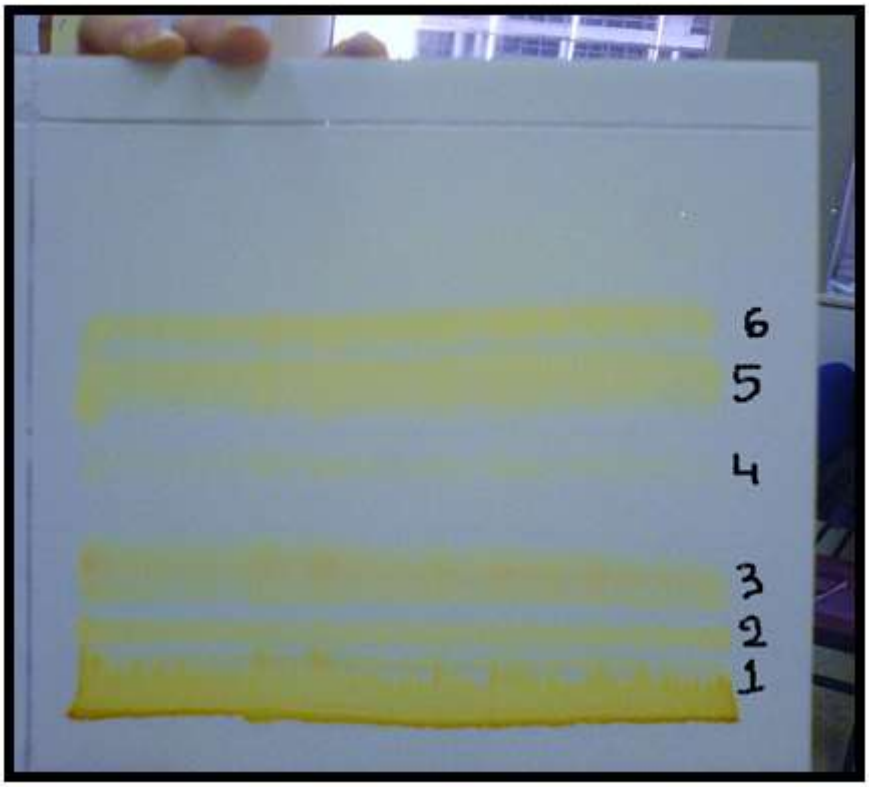
Το ολικό λίπος των δειγμάτων των γαρίδων τοποθετήθηκε σε παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (PTLC) ώστε να διαχωρισθούν οι επιμέρους τάξεις του λίπους.

Παρατίθενται ενδεικτικά δύο χρωματογραφήματα παρασκευαστικής χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (PTLC). Στο χρωματογράφημα της εικόνας 6-5, φαίνεται ο διαχωρισμός των ολικών λιπιδίων στις επιμέρους ζώνες των κεφαλοθωράκων των κόκκινων γαρίδων, σε ουδέτερο σύστημα ανάπτυξης (πετρελαικός αιθέρας-διαιθυλαιθέρας-οξικό οξύ 70:30:1 (v/v/v)). Στο χρωματογράφημα της εικόνα 6-6 φαίνεται ο διαχωρισμός των ολικών λιπιδίων στις επιμέρους ζώνες μυών των κόκκινων γαρίδων, σε πολικό σύστημα ανάπτυξης (χλωροφόρμιο-μεθανόλη-οξικό οξύ-νερό 50:25:6:2 (v/v/v/v)). Ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε λίπος κρόκου αυγού. Η έκθεση των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε σε ατμούς ιωδίου. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για όλα τα δείγματα.

Εικόνα 6-5: Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας ολικού λίπους των κεφαλοθωράκων κόκκινων γαρίδων σε ουδέτερο σύστημα

Παρατηρώντας την PTLC (εικόνα 6-5), διακρίνονται 6 ζώνες. Η σειρά με την οποία διαχωρίστηκαν τα συστατικά είναι η εξής: 1η ζώνη πολικά λιπίδια (PL), 2η μόνο-διγλυκερίδια (MG/DG), 3η στερόλες (sterols), 4η ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA), 5η τριγλυκερίδια (TG) και 6η εστέρες στερολών (sterol esters).

Με τη χρήση PLTC και το συγκεκριμένο σύστημα ανάπτυξης επετεύχθη διαχωρισμός της ζώνης των μονο-δι-γλυκεριδίων και της ζώνης των εστέρων στερολών, σε αντίθεση με το χρωματογράφημα της HPTLC (εικόνα 6-1). Στους μύες και των δύο ειδών γαρίδων, αλλά και στους κεφαλοθώρακες των ροζ γαρίδων, δεν εμφανίστηκε η ζώνη των εστέρων στερολών, πράγμα που έρχεται σε συμφωνία με την ανάλυση του Iatroscan (πίνακας 6-6). Τα αποτελέσματά μας έρχονται επίσης σε συμφωνία με έρευνα που πραγματοποιήθηκε στις γαρίδες, *Litopenaeus vannamei*, όπου επίσης δεν ανιχνεύτηκαν εστέρες στερολών, στους μύες, αλλά μόνο στο ηπατοπάγκρεας. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν εστέρες χοληστερόλης (cholesterol esters) [180].



Εικόνα 6-6: Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας ολικού λίπους των μυών κόκκινων γαρίδων σε πολικό σύστημα

Παρατηρώντας την PTLC (εικόνα 6-6), διακρίνονται πάλι 6 ζώνες. Η σειρά με την οποία διαχωρίστηκαν τα συστατικά είναι η εξής: 1η ζώνη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (L-PC), 2η σφιγγομυελίνη (SM), 3η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), 4η φωσφατιδυλοσερίνη ή/και

φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PS/PI), 5η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE) και 6η ουδέτερα λιπίδια (NL).

Περαιτέρω στόχος της χρήσης PTLC ήταν η απομόνωση της ζώνης των τριγλυκεριδίων (TG) και των πολικών λιπιδίων (PL) ώστε να πραγματοποιηθεί ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των συγκεκριμένων ζωνών με χρήση της GC-FID. Τα αποτελέσματα της GC-FID δίνονται στους πίνακες 6-8 και 6-9.

6.3.6 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους τάξεων των ολικών λιπιδίων με TLC/FID (Iatroscan) σε ουδέτερο και πολικό σύστημα ανάπτυξης

Τα αποτελέσματα του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των επιμέρους τάξεων του ολικού λίπους με τη χρήση του Iatroscan (TLC/FID) παρουσιάζονται στον πίνακα 6-4.

Πίνακας 6-4: Επιμέρους τάξεις ουδετέρων και πολικών λιπιδίων %(w/w) ολικού λίπους μυών και κεφαλοθωράκων των δύο ειδών γαρίδων

Λιπίδια	***A. foliacea* (κόκκινες γαρίδες)**		***P. longirostis* (ροζ γαρίδες)**	
	μύες	**κεφαλοθώρακες**	**μύες**	**κεφαλοθώρακες**
NL%TL	12.58±0.77a	80.68±0.63b	11.85±0.53a	63.06±0.61c
Sterol esters	n.d	0.32±0.03	n.d	n.d.
TG	3.30±0.23a	77.82±0.56b	3.35±0.22a	60.10±0.53c
FFA	0.84±0.04a	0.49±0.04b	n.d.	n.d.
Cholesterol	7.60±0.41a	1.53±0.05b	8.50±0.49a	2.96±0.16c
DG	0.83±0.03a	0.52±0.03b	n.d	n.d
PL%TL	87.42±0.77a	19.32±0.63b	88.15±0.53a	36.94±0.61c
PE	19.04±0.45a	2.48±0.23b	17.13±0.35c	5.74±0.15d
PS	2.39±0.04a	0.39±0.02b	2.94±0.03a	0.43±0.03b
PI	1.57±0.03a	0.21±0.02b	1.40±0.05c	0.23±0.02b
PC	61.16±0.69a	15.17±0.10b	63.17±0.49c	29.43±0.45d
SM	3.26±0.13a	1.07±0.05b	3.51±0.15a	1.09±0.03b

- Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95% (N=6)

Όπως παρατηρούμε από τον πίνακα 6-4, στους μύες των δύο ειδών δεν βρέθηκαν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των ποσοστών των ολικών ουδετέρων (NL) και των ολικών πολικών λιπιδίων (PL). Παρατηρήθηκαν όμως διαφορές μεταξύ των επιμέρους τάξεών τους. Οι κεφαλοθώρακες σε αντίθεση, παρουσίασαν ποικιλία διαφοροποιήσεων στο λιπιδικό τους προφίλ.

Οι μύες και των δύο ειδών ήταν πλούσιοι σε PL και κυμαίνονταν από 87.42-88.15%TL, ενώ το ποσοστό των NL ήταν χαμηλό και κυμαινόταν από 11.85-12.58% TL. Συγκρίνοντας τους μύες των *Penaeus aztecus* [182] με τις υπό μελέτη γαρίδες παρατηρήθηκε χαμηλότερο ποσοστό PL στις *P. aztecus* (62.1% of TL) και υψηλότερο ποσοστό NL (36% of TL). Από την ομάδα των NL πηγάζει το συμπέρασμα ότι στους μύες και των δύο ειδών κυρίαρχο ουδέτερο λιπίδιο ήταν η χοληστερόλη (cholesterol). Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται να συμπληρώσει το χρωματογράφημα (εικόνα 6-1), ότι δηλ. κύριο συστατικό της τάξης των στερολών είναι η χοληστερόλη. Το Iatroscan TLC-FID, δίνοντας αναλυτικά τα ποσοστά των επιμέρους τάξεων, συμπληρώνει τα αποτελέσματα των χρωματογραφημάτων, εικόνες 6-1 έως 6-4.

Σύμφωνα με τον πίνακα 6-4 οι επιμέρους τάξεις των NL των μυών των δύο ειδών δεν παρουσίασαν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ τους. Εξαίρεση αποτέλεσαν μόνο οι τάξεις των FFA και DG. Συγκεκριμένα, στους μύες τα ποσοστά της χοληστερόλης κυμαίνονταν από 7.61-8.50% TL και ακολουθούσαν τα τριγλυκερίδια (TG) σε ποσοστά που δεν ξεπέρασαν το 4%. Εστέρες στερολών δεν βρέθηκαν ούτε στους μύες των *A. foliacea*, αλλά ούτε στους μύες των *P. longirostris.* Ενδιαφέρον όμως παρουσίασε η εμφάνιση FFA και DG μόνο στις *A. foliacea*. Η παρουσία των FFA και DG μόνο στις *A. foliacea*, πιθανόν να οφείλεται στο ότι τα λιπίδια τω κόκκινων γαρίδων υδρολύονται πιο εύκολα από λιπάσες και φωσφολιπάσες [30].

Τα ποσοστά των ολικών PL των μυών δεν παρουσίασαν σημαντικές ($P<0.05$) διαφορές μεταξύ τους (>87%), σε αντίθεση με κάποιες από τις επιμέρους τάξεις των PL. Συγκεκριμένα στους μύες και των δύο ειδών γαρίδων κυρίαρχα PL ήταν οι PC και PE αποτελώντας το ~80% των ολικών λιπιδίων και σε αναλογία 3:1 (w/w), ενώ οι PI, PS και SM προσδιορίστηκαν σε χαμηλότερα ποσοστά. Αναλυτικότερα, τα ποσοστά των PE, PI προσδιορίστηκαν υψηλότερα στους μύες των *A. foliacea*, ενώ το ποσοστό της PC βρέθηκε μεγαλύτερο στις *P. longirostris*. Τα ποσοστά των PS και SM δεν παρουσίασαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των μυών των ειδών και βρέθηκαν μικρότερα του <4% των TL. Η PI, παρόλο που προσδιορίστηκε σε αρκετά χαμηλά

ποσοστά στους μύες, πιθανόν να είναι ένα σημαντικό φωσφολιπιδικό συστατικό των θαλάσσιων οργανισμών. Πιστεύεται ότι τα EPA και DHA λιπαρά οξέα, τα οποία προέρχονται από την PI, είναι πρόδρομα μόρια στην παραγωγή προσταγλανδινών [182].

Οι κεφαλοθώρακες (πίνακας 6-4) ήταν πλούσιοι σε NL και κυμαίνονταν από 63.06-80.68% επί των TL, ενώ τα ποσοστά των PL βρέθηκαν από 19.32-36.94% επί των TL. Αναλυτικότερα, το ποσοστό των NL βρέθηκε να είναι υψηλότερο στους κεφαλοθώρακες των κόκκινων γαρίδων *(A. foliacea*), ενώ το ποσοστό των PL ήταν υψηλότερο στις ροζ *(P. longirostris*).

Μελετώντας τις επιμέρους τάξεις των NL των κεφαλοθωράκων, παρατηρήθηκε ότι, όπως και στην περίπτωση των μυών, κυρίαρχα NL ήταν τα TG (>60%) και η χοληστερόλη (1.5-2.96%) στους κεφαλοθώρακες και των δύο ειδών γαρίδων. Το ποσοστό των TG στους κεφαλοθώρακες των κόκκινων γαρίδων, βρέθηκε υψηλότερο από το αντίστοιχο των ροζ, ενώ το ποσοστό της χοληστερόλης βρέθηκε υψηλότερο στις ροζ. Ενδιαφέρον προκάλεσε η εμφάνιση των FFA και DG μόνο στις κόκκινες γαρίδες και στους κεφαλοθώρακες, που πιθανόν να οφείλεται στην ευκολότερη υδρόλυση των *A. foliacea*. Επίσης στους κεφαλοθώρακες των κόκκινων γαρίδων προσδιορίστηκαν και εστέρες στερολών, ενώ στους κεφαλοθώρακες των ροζ δεν προσδιορίστηκαν, αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με τα χρωματογραφήματα από PTLC.

Στη συνέχεια μελετώντας τις επιμέρους τάξεις των PL των κεφαλοθωράκων, παρατηρήθηκε ότι κυρίαρχα PL ήταν οι PC και PE σε ποσοστά που κυμαίνονταν από 15-29% και 2.48-5.74% αντιστοίχως. Όμως τα ποσοστά που προσδιορίστηκαν στους κεφαλοθώρακες των ροζ γαρίδων βρέθηκαν σχεδόν στο διπλάσιο από τις κόκκινες. Σε αντίθεση όμως, τα ποσοστά των PS, PI και SM δεν παρουσίασαν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των κεφαλοθωράκων των δύο ειδών. Η έρευνα του Billah et al. (1989) αναφέρει ότι η PC υδρολύεται σε φωσφατιδικό οξύ (phosphatidic acid, PA) το οποίο αμέσως μετατρέπεται σε DG [183]. Πιθανόν ίδιος μηχανισμός να λειτουργεί και στις κόκκινες γαρίδες, γι'αυτό παρατηρούνται μικρότερα ποσοστά PC (61.16% TL στους μύες και 15.17% TL στους κεφαλοθώρακες) σε σύγκριση με τις ροζ γαρίδες (63.17% TL στους μύες και 29.43% TL στους κεφαλοθώρακες) και προσδιορισμό DG μόνο στις κόκκινες γαρίδες.

Συγκρίνοντας τους μύες με τους κεφαλοθώρακες των δύο ειδών παρατηρήθηκε ότι οι μύες ήταν πλούσιοι σε PL, ενώ οι κεφαλοθώρακες σε NL. Το συμπέρασμα αυτό ήταν αναμενόμενο διότι οι μύες απαιτούν μεγάλα ποσά PL, με κύρια τα φωσφολιπίδια, καθώς αυτά συμβάλλουν στη δομή των κυττάρων και κατ' επέκταση των ιστών [82], ενώ ταυτόχρονα, οι κεφαλοθώρακες, επειδή συμπεριλαμβάνουν το ηπατοπάγκρεας, απαιτούν υψηλά ποσά ενέργειας (κυρίως τριγλυκερίδια) για την κάλυψη των βιολογικών αναγκών τους.

Στον πίνακα 6-5 παρατίθεται η σύσταση των τάξεων των ουδετέρων και πολικών λιπιδίων των ιστών των *A. foliacea* και *P. longirostis* εκφρασμένη σε mg λιπιδίων/100 g νωπού ιστού.

Πίνακας 6-5: Σύσταση επιμέρους ουδετέρων και πολικών λιπιδίων σε mg λιπιδίων/100 g νωπού ιστού

Λιπίδια	***A. foliacea* (κόκκινες γαρίδες)**		***P. longirostis* (ροζ γαρίδες)**	
	μύες	**κεφαλοθώρακες**	**μύες**	**κεφαλοθώρακες**
NL %TL	92.73±5.61a	6310.20±49.29b	122.94±6.49c	2937.20±28.44d
Sterol esters	n.d.	25.26±1.86a	n.d.	n.d.
TG	24.35±1.44a	6112.35±43.99b	34.39±1.14c	2797.96±24.68d
FFA	6.17±0.58a	38.51±2.54b	n.d.	n.d.
Cholesterol	56.12±3.86a	119.53±2.98b	88.23±4.39c	139.39±27.13d
DG	6.09±0.52a	40.36±1.75b	n.d.	n.d.
PL %TL	647.27±44.39a	1509.80±47.75b	917.06±7.92c	1722.80±28.50d
PE	140.94±9.94a	193.46±9.90b	178.36±6.65c	267.61±25.26d
PS	17.67±1.18a	29.61±0.50b	30.58±1.07c	21.04±1.31d
PI	11.63±0.80a	17.19±1.15b	14.62±0.36c	10.22±0.67d
PC	452.95±34.18a	1186.04±48.29b	656.89±7.08c	1373.06±24.42d
SM	24.05±1.20a	83.48±1.39b	36.59±1.57c	51.08±1.85d

- Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95% (N=6)

Δίνοντας τη σύσταση των επιμέρους ουδετέρων και πολικών λιπιδίων σε mg/100 g νωπού ιστού (ww), παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές μεταξύ των ειδών. Αυτό εξηγείται από τη διαφορά των ποσοστών του ολικού λίπους.

Ειδικότερα, βρέθηκε ότι τα NL και PL των μυών των κόκκινων γαρίδων ήταν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα των ροζ, με εξαίρεση μόνο τα FFA και DG, τα οποία δεν προσδιορίστηκαν καθόλου στις ροζ γαρίδες. Στους κεφαλοθώρακες, τα NL βρέθηκαν υψηλότερα στις κόκκινες γαρίδες, ενώ τα PL βρέθηκαν υψηλότερα στις ροζ. Από την ομάδα των NL των κεφαλοθωράκων των κόκκινων γαρίδων, όλες οι συγκεντρώσεις των επιμέρους λιπιδίων προσδιορίστηκαν υψηλότερες με εξαίρεση τη χοληστερόλη που βρέθηκε υψηλότερη στους κεφαλοθώρακες των ροζ γαρίδων. Στην ομάδα των PL των κεφαλοθωράκων υπήρξε ποικιλία μεταξύ των ειδών. Αναλυτικότερα, οι PE και PC προσδιορίστηκαν χαμηλότερες στις κόκκινες γαρίδες, ενώ οι PS, PI και SM βρέθηκαν υψηλότερες.

Η περιεκτικότητα των NL στους κεφαλοθώρακες παρατηρήθηκε έως και 67 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με αυτή των μυών (τα NL στους κεφαλοθώρακες κυμαίνονταν από 2937-6310 mg/100 g νωπού ιστού, ενώ στους μύες 92.7-123 mg/100 g νωπού ιστού). Τα PL επίσης βρέθηκαν αρκετά υψηλότερα στους κεφαλοθώρακες από τα αντίστοιχα των μυών (1509.8-1722.8 mg/100 g νωπού ιστού και 647.3-917.1 mg/100 g νωπού ιστού στους κεφαλοθώρακες και μύες αντίστοιχα). Πολύ υψηλά επίπεδα TG προσδιορίστηκαν στους κεφαλοθώρακες (2798-6112 mg/100 g), ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα στο βρώσιμο μέρος των δύο ειδών γαρίδων, βρέθηκαν πολύ χαμηλά (24.4-34.4 mg TG/100 g νωπού ιστού), γεγονός ευνοϊκό για την ανθρώπινη υγεία. Επίσης, η περιεκτικότητα της χοληστερόλης των μυών των *A. foliacea* και *P. longirostris* προσδιορίστηκε πολύ χαμηλή (56.12 και 88.23 mg/100g νωπού ιστού αντίστοιχα) γεγονός που καθιστά τις γαρίδες κατάλληλες προς κατανάλωση, καθώς η ημερήσια πρόσληψη χοληστερόλης συνιστάται έως 300 mg για τους άνδρες και 225 mg για τις γυναίκες. Χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης βρέθηκαν και στους κεφαλοθώρακες (119.53 και 139.39 mg/100g νωπού ιστού στις *A. foliacea* και *P. longirostris*, αντιστοίχως).

Τα επίπεδα της χοληστερόλης που προσδιορίστηκαν στις υπό μελέτη *A. foliacea* και *P. longirostris* παρουσίασαν διαφορές με αυτά που προσδιορίστηκαν στις *A. antennatus* και στις *P. longirostris* σύμφωνα με τη μελέτη των Rosa and Nunes (2003) [76]. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα χοληστερόλης στους μύες των *A. antennatus* βρέθηκαν 60.8 mg/100g νωπού ιστού και 72.4 mg/100g νωπού ιστού (αλιευμένες καλοκαίρι και

χειμώνα αντίστοιχα). Στις δε ροζ γαρίδες των Rosa and Nunes (2003), βρέθηκαν 57.8 mg chol /100g νωπού ιστού και 68.98 mg chol /100g νωπού ιστού για την περίοδο του καλοκαιριού και του χειμώνα αντίστοιχα [76]. Διαφορές των υπό μελέτη γαρίδων παρατηρήθηκαν και με άλλες μελέτες όπως αυτή του Turan και της ομάδας του (2011) για τις γαρίδες *Crangon crangon*, οι οποίοι προσδιόρισαν τα επίπεδα χοληστερόλης αρκετά υψηλά (173.56 mg/100 g ww) [184]. Υψηλότερα επίπεδα χοληστερόλης βρέθηκαν και στα είδη γαρίδων, *Penaeus brasiliensis, Penaeus schimitti* και *Xiphopenaeus kroyeri*, τα οποία κυμαίνονταν από 114-134 mg/100 g ww [78]. Πιθανόν οι διαφορές των επιπέδων χοληστερόλης μεταξύ των ειδών, να οφείλονται στην περίοδο αλίευσης των γαρίδων. Είναι γνωστό ότι τα επίπεδα της χοληστερόλης αλλάζουν πριν και μετά την ωοτοκία [185], αφού η χοληστερόλη αποτελεί πρόδρομο ένωση των στεροειδών ορμονών [26].

Σημαντικό είναι το αποτέλεσμα ότι τα επίπεδα της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) είναι υψηλά. Η χολίνη θεωρείται απαραίτητο θρεπτικό συστατικό με συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη (ΣΗΠ) τα 550 mg για τους άνδρες και τα 450 mg για τις γυναίκες [186]. Εκτιμώντας ότι η PC αποτελείται από ~13% χολίνη κατά βάρος, συνεπάγεται ότι οι μύες και οι κεφαλοθώρακες των *A. foliacea* και *P. longirostris* αποτελούν μια εξαιρετική πηγή ημερήσιας πρόσληψης χολίνης, παρέχοντας 59-85 και 154-178 mg χολίνης ανά 100 g νωπού ιστού αντίστοιχα. Επίσης, τα ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα της PC στους κεφαλοθώρακες των υπό μελέτη γαρίδων, καθιστά τους κεφαλοθώρακες κατάλληλη πηγή για την παρασκευή λεκιθίνης στη βιομηχανία.

6.3.7 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων του ολικού λίπους (TL) με χρήση GC-FID

Τα λιπαρά οξέα του ολικού λίπους (TL) των μυών και των κεφαλοθωράκων των γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris* προσδιορίστηκαν με αεριοχρωματογραφία (GC-FID), αφού πρώτα μετατράπηκαν στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες με ήπια αλκαλική μεθανόλυση (υποκεφάλαιο 5.7.5). Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών αυτών δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 6-6).

Σύμφωνα με τον πίνακα 6-6 προσδιορίστηκαν συνολικά 40 λιπαρά οξέα με 10 έως 24 άτομα άνθρακα και με 0 έως 6 διπλούς δεσμούς και στα δύο είδη γαρίδων, τόσο σε μύες όσο και σε κεφαλοθώρακες. Με έντονη γραμματοσειρά τονίζονται τα λιπαρά οξέα που παρουσιάζουν μεγαλύτερο διατροφικό ενδιαφέρον. Παρατηρώντας τον πίνακα, φαίνεται ότι το προφίλ των λιπαρών οξέων των TL των υπό μελέτη γαρίδων δεν

παρουσιάζει τόσο στατιστικές διαφορές μεταξύ των ειδών, αλλά όσο μεταξύ των επιμέρους ιστών (σύγκριση των μυών με τους κεφαλοθώρακες). Σύμφωνα με τον Ayas και την ομάδα του (2013), η σύνθεση των λιπαρών οξέων στα καρκινοειδή έχει σχέση με τον κύκλο ζωής τους και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως τη θερμοκρασία, την αλατότητα του νερού, την τροφή στην περιοχή, αλλά και την εποχή αλίευσης [187].

Πίνακας 6-6: Σύσταση λιπαρών οξέων % των ολικών λιπιδίων (%TL) με GC-FID

Λιπαρά οξέα	***A. foliacea*** **μύες**	**(κόκκινες γαρίδες) κεφαλοθώρακες**	***P. longirostis*** **μύες**	**(ροζ γαρίδες) κεφαλοθώρακες**
C10:0	0.36±0.00a	0.70±0.00b	n.d.	0.67±0.01c
C12:0	n.d.	0.13±0.00a	n.d.	0.14±0.00b
C14:0	1.18±0.02a	1.75±0.02b	1.25±0.00c	1.79±0.00cd
C14:1	0.07±0.00a	0.23±0.00b	0.16±0.00c	0.22±0.00d
C15:0	0.52±0.00a	0.56±0.00b	0.88±0.00c	0.57±0.00bd
C15:1ω-5	0.07±0.00a	0.20±0.00b	0.29±0.00c	0.20±0.00b
C16:0	17.67±0.05a	20.23±0.06b	18.46±0.10c	18.65±0.11d
iso-C16:0	0.41±0.00a	0.83±0.01b	0.37±0.01c	0.78±0.01d
C16:1ω-9	4.03±0.01a	9.27±0.03b	4.13±0.01c	8.79±0.03d
iso-C17:0	0.81±0.01a	0.51±0.00b	1.26±0.01c	0.47±0.01d
cyclo-C17:0	0.18±0.00a	0.20±0.00b	0.10±0.00c	0.47±0.01d
C17:0	0.92±0.01a	1.12±0.01b	1.13±0.01b	1.10±0.01c
C17:1ω-7	0.28±0.00a	0.47±0.00b	0.50±0.01c	0.30±0.01d
C18:0	5.74±0.06a	4.28±0.05b	5.25±0.06c	4.19±0.04b
C18:1ω-9 trans	0.20±0.00a	0.18±0.00b	0.36±0.01c	0.33±0.00d
C18:1ω-9 cis	18.46±0.18a	25.45±0.25b	15.75±0.16c	24.66±0.25d
C18:1ω-7	3.42±0.02a	7.73±0.05b	5.03±0.03c	7.39±0.04d
C18:2ω-6 trans	0.24±0.00a	0.33±0.00b	0.66±0.01c	0.36±0.01d
C18:2ω-6 cis	1.31±0.01a	1.10±0.01b	1.36±0.01c	1.09±0.01b
C18:3ω-6	0.32±0.00a	0.46±0.01b	0.49±0.01c	0.91±0.01d
C18:3ω-3	0.49±0.01a	0.92±0.01b	0.39±0.00c	0.55±0.01d
C18:4ω-3	0.21±0.00a	0.29±0.00b	0.18±0.00c	0.22±0.00d
C19:0	0.17±0.00a	0.50±0.00b	0.69±0.01c	1.11±0.01d
C20:0	2.32±0.03a	4.90±0.07b	2.74±0.04c	5.38±0.08d
C20:1ω-9	0.34±0.00a	1.02±0.02b	0.65±0.01c	1.17±0.02d
C20:2ω-6	0.56±0.01a	0.53±0.01b	0.88±0.01c	0.58±0.01a
C20:3ω-6	0.08±0.00a	0.78±0.01b	0.17±0.00c	0.17±0.00c
C20:4ω-6	**4.75±0.09a**	**2.25±0.04b**	**5.56±0.10c**	**2.73±0.05d**

C20:3ω-3	0.26±0.01a	0.45±0.01b	0.18±0.00c	0.28±0.00d
C20:5ω-3 (EPA)	12.82±0.18a	3.76±0.05b	12.68±0.18a	4.00±0.06c
C22:0	0.25±0.01a	0.13±0.00b	0.61±0.01c	0.16±0.00d
C22:1ω-11	0.67±0.01a	0.21±0.00b	0.14±0.00c	0.30±0.01d
C22:1ω-9	0.23±0.00a	0.19±0.00b	0.09±0.00c	0.23±0.00d
C22:2ω-6	0.10±0.00a	0.14±0.00b	0.11±0.00c	0.08±0.00d
C22:4ω-6	n.d.	1.20±0.01a	0.49±0.00b	1.50±0.01c
C22:5ω-6	0.32±0.00a	0.56±0.00b	0.64±0.01c	0.63±0.01c
C22:5ω-3	0.66±0.00a	n.d.	0.55±0.00b	0.63±0.01c
C24:0	0.62±0.01a	0.46±0.01b	1.39±0.03c	0.59±0.01d
C22:6ω-3 (DHA)	18.62±0.34a	5.71±0.10b	14.28±0.26c	6.28±0.11d
C24:1ω-9	0.34±0.01a	0.27±0.01b	0.15±0.00c	0.35±0.01a
Σω:0 (SFA)	31.15±0.18a	36.30±0.22b	34.13±0.22c	36.07±0.22b
Σω:1 (MUFA)	28.11±0.25a	45.22±0.36b	27.25±0.23c	43.92±0.35d
Σω:n (PUFA)	40.74±0.65a	18.48±0.26b	38.62±0.59c	20.00±0.28d
Σω:3	33.06±0.53a	11.13±0.17b	28.25±0.45c	11.95±0.18d
Σω:6	7.44±0.12a	7.03±0.09b	9.71±0.15c	7.69±0.10d
ω-3/ω-6	4.44±0.01a	1.58±0.01b	2.91±0.01c	1.55±0.01b
MUFA/SFA	0.90±0.01a	1.25±0.01b	0.80±0.01c	1.22±0.01d
PUFA/SFA	1.31±0.01a	0.51±0.01b	1.13±0.01c	0.55±0.04b
TFA*	0.56	6.57	0.79	3.73
SFA*	0.17	2.38	0.27	1.35
MUFA*	0.16	2.97	0.22	1.63
PUFA*	0.23	1.22	0.30	0.75
Σω:3*	0.19	0.73	0.22	0.45
Σω:6*	0.04	0.46	0.08	0.29

- Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95% (N=6)
- n.d.: not detected (δεν ανιχνεύτηκαν)
- * εκφράστηκαν σε g ανά 100 g νωπού ιστού

Τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα τόσο σε μύες όσο και σε κεφαλοθώρακες ήταν τα C16:0 (παλμιτικό), C18:0 (στεατικό) και C20:0 (αραχιδικό) από την ομάδα των SFA, τα C16:1 ω-9 (παλμιτελαϊκό),C18:1 ω-9 cis (ελαϊκό) και C18:1 ω-7 (βακενικό) από την ομάδα των MUFA και τα C20:4 ω-6 (αραχιδονικό), C20:5 ω-3 (EPA) και C22:6 ω-3 (DHA)

από την ομάδα των PUFA. Τα λοιπά λιπαρά οξέα προσδιορίστηκαν σε μικρότερα ποσοστά.

Από την ομάδα των SFA, στους μύες των γαρίδων το κυρίαρχο λιπαρό οξύ ήταν το C16:0, με ποσοστό μικρότερο στις κόκκινες γαρίδες, 17.67% των ολικών λιπαρών οξέων (total fatty acids, TFA) σε σύγκριση με των ροζ το οποίο ήταν 18.46%TFA. Ακολουθούσε το C18:0 σε ποσοστά 5.25-5.74% TFA, με ποσοστό ελαφρώς μεγαλύτερο στις κόκκινες και στη συνέχεια το C20:0 σε ποσοστά παρόμοια και στα δύο είδη (2.32-2.74% TFA).

Συγκρίνοντας τις υπό μελέτη γαρίδες με τις αντίστοιχες της Yerlikaya και της ομάδας της (2013), παρατηρήθηκε ότι όντως το C16:0 και το C18:0 ήταν τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα στο βρώσιμο τμήμα των γαρίδων, αν και τα ποσοστά που ανέφεραν η Yerlikaya et al. (2013) ήταν υψηλότερα σε σύγκριση με αυτά των υπό μελέτη γαρίδων. Συγκεκριμένα αναφέρει ότι το C16:0 βρέθηκε 19.51% και 21.16% των TFA στις *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα και το C18:0 βρέθηκε 6.44% και 8.75% των TFA, αντιστοίχως [84]. Ομοίως οι Rosa και Nunes (2003) αναλύοντας το βρώσιμο τμήμα των *A. antennatus* και *P. longirostris* [76] και οι Bragagnolo και Rodriguez-Amaya (2001) μελετώντας τους μύες των *P. brasiliensis, P. schimitti, P. vannamei, P. monodon* και *X. Kroyeri* παρατήρησαν επίσης ως κυρίαρχα SFA τα C16:0 και C18:0 [78]. Εξετάζοντας όμως τους κεφαλοθώρακες των υπό μελέτη γαρίδων η σειρά των SFA ήταν η εξής: C16:0>C20:0>C18:0, ενώ στους κεφαλοθώρακες των *M. kerathurus* [82] και των κατεψυγμένων *A. foliacea*, η σειρά που ακολουθήθηκε ήταν C16:0>C18:0>C20:0 [179].

Από την ομάδα των MUFA, το κυρίαρχο λιπαρό οξύ και στα δύο είδη γαρίδων, τόσο σε μύες όσο και σε κεφαλοθώρακες ήταν το C18:1 ω-9 cis (ελαϊκό). Στις κόκκινες γαρίδες τα ποσοστά βρέθηκαν υψηλότερα έναντι των ροζ (18.46% και 15.75% TFA στους μύες των *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα και 25.45% και 24.66% TFA στους κεφαλοθώρακες αντίστοιχα). Υπολογίζοντας όμως το C18:1 ω-9 cis σε g ανά 100 g νωπού ιστού, παρατηρήθηκε ότι η ποσότητα του C18:1 ω-9 cis στους μύες των ροζ γαρίδων ήταν 0.12 g/100 g νωπού ιστού, ελαφρώς υψηλότερη από την αντίστοιχη ποσότητα των κόκκινων γαρίδων που ήταν 0.10 g/100 g νωπού ιστού. Το ποσοστό του C18:1 ω-9 cis των μυών των δύο υπό μελέτη ειδών παρατηρήθηκε παρόμοιο με αυτό που προσδιορίστηκε στο βρώσιμο τμήμα άλλων ειδών γαρίδων όπως στις *M. monoceros, P. semisulcatus, P. kerathurus* και *P. japonicus*, το οποίο κυμαινόταν από

15.80-19.43% TFA [85]. Το ποσοστό του C18:1 ω-9 των κεφαλοθωράκων των υπό μελέτη *A. foliacea* και *P. longirostris* βρέθηκε παρόμοιο με το αντίστοιχο ποσοστό των κατεψυγμένων *A. foliacea* [179], αλλά πολύ υψηλότερο από το αντίστοιχο ποσοστό των *M. kerathurus* το οποίο προσδιορίστηκε 9.41%των TFA [82].

Το C16:1 ω-9 βρέθηκε σε ποσοστό ~4% στους μύες και των δύο γαρίδων, ποσοστό παρόμοιο με το αντίστοιχο των κατεψυγμένων *A. foliacea* που μελέτησε η Βαλαβανίδου (2013). Στους κεφαλοθώρακες το C16:1 ω-9 βρέθηκε υψηλότερο στις υπό μελέτη κόκκινες γαρίδες (9.27%TFA) συγκριτικά με τις υπό μελέτη ροζ και τις κατεψυγμένες κόκκινες (8.79% και 7.37% των TFA, αντίστοιχα) [179]. Το C18:1 ω-7 βρέθηκε υψηλότερο στους μύες των υπό μελέτη ροζ γαρίδων συγκριτικά με τις κόκκινες, αλλά και τα δύο ποσοστά έρχονται σε συμφωνία με τα ποσοστά που δίνονται για τις γαρίδες *A. antennatus, M. kerathurus, A. foliacea, P. longirostris και P. edwardsi* τα οποία κυμαίνονταν από 3.46-6.17% των TFA [84]. Στους κεφαλοθώρακες των υπό μελέτη *A. foliacea,* το ποσοστό του C18:1 ω-7 βρέθηκε παρόμοιο με το αντίστοιχο ποσοστό που προσδιορίστηκε στις κατεψυγμένες κόκκινες γαρίδες [179], αλλά υψηλότερο από αυτό των υπό μελέτη *P. longirostris*.

Από την ομάδα των PUFA κυρίαρχα ήταν τα C20:5 ω-3 (EPA), C22:6 ω-3 (DHA) και C20:4 ω-6 (αραχιδονικό οξύ) στους μύες και στους κεφαλοθώρακες. Όμως και στους μύες και στους κεφαλοθώρακες των δύο ειδών γαρίδων, το DHA βρέθηκε σχεδόν κατά 1.3 φορές υψηλότερο από το αντίστοιχο EPA.

Αναλυτικά, το EPA δεν παρουσίασε διαφορές μεταξύ των μυών των δύο ειδών γαρίδων σε αντίθεση με τους κεφαλοθώρακες. Το EPA στους κεφαλοθώρακες προσδιορίστηκε χαμηλότερο από αυτό των μυών. Το DHA προσδιορίστηκε υψηλότερο στους μύες των *A. foliacea,* ενώ στους κεφαλοθώρακες βρέθηκε χαμηλότερο σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά των *P. longirostris*. Τα ποσοστά DHA των κεφαλοθωράκων και των δύο ειδών ήταν αρκετά χαμηλότερα από αυτά των μυών.

Το C20:4 ω-6 τόσο στους μύες όσο και στους κεφαλοθώρακες προσδιορίστηκε σε χαμηλότερα ποσοστά στις κόκκινες έναντι των ροζ γαρίδων (4.75% και 5.56% TFA στους μύες των *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα και 2.25% και 2.73%TFA στους κεφαλοθώρακες αντίστοιχα). Τα λοιπά PUFA προσδιορίστηκαν σε ποσοστά <2% TFA.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των υπό μελέτη γαρίδων με τα αντίστοιχα της Yerlikaya (2013) παρατηρήθηκαν διαφορές. Πιο αναλυτικά, τα αποτελέσματα που αναφέρει η Yerlikaya (2013) για τους μύες στις *A. foliacea* ήταν: 10.37 EPA %TFA, 18.30 DHA %TFA και 3.24 αραχιδονικό %TFA και για τις *P. longirostris* ήταν 11.71 EPA %TFA, 15.01 DHA %TFA και 5.44 αραχιδονικό %TFA [84], ποσοστά μικρότερα από τα δεδομένα του πίνακα 6-6 με εξαίρεση μόνο το DHA των υπό μελέτη *P. longirostris*, το οποίο ήταν 14.28%TFA. Εντούτοις τα ποσοστά που επισημαίνουν οι Rosa και Nunes (2003) για τις *A. antennatus* και *P. longirostris* [76] ήταν υψηλότερα από τα αντίστοιχα ποσοστά των υπό μελέτη *A. foliacea* και *P. longirostris*. Συγκρίνοντας τους κεφαλοθώρακες των υπό μελέτη *A. foliacea* και *P. longirostris* με τους κεφαλοθώρακες των *M. kerathurus* [82], τα ποσοστά των EPA, DHA και αραχιδονικού οξέος των *M. kerathurus* βρέθηκαν αρκετά υψηλότερα, συγκεκριμένα 10.70 EPA %TFA,10.38 DHA %TFA και 8.65 αραχιδονικού %TFA αντίστοιχα [83].

Μελετώντας τα σύνολα των λιπαρών οξέων (SFA, MUFA και PUFA), βλέπουμε ότι οι μύες και των δύο ειδών ήταν πλούσιοι σε PUFA, ξεπερνώντας το 38% των TFA, ενώ στους κεφαλοθώρακες κυρίαρχα ήταν τα MUFA (>43% των TFA). Συγκεκριμένα η σειρά των συνόλων των λιπαρών οξέων που παρατηρήθηκε στους μύες ήταν PUFA> SFA>MUFA, ενώ στους κεφαλοθώρακες, MUFA>SFA>PUFA. Οι κεφαλοθώρακες (ηπατοπάγκρεας), ήταν αναμενόμενο να έχουν υψηλότερα ποσοστά MUFA διότι περιείχαν υψηλά ποσοστά τριγλυκεριδίων, τα οποία αποτελούνται κυρίως από κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα.

Τα SFA στους μύες των ροζ γαρίδων βρέθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό έναντι των κόκκινων. Συγκρίνοντάς τα όμως με τα ποσοστά αντίστοιχων ειδών, οι τιμές βρέθηκαν παρόμοιες (31.19%TFA στις *A. foliacea* [84] και 35.73%TFA στις *P. longirostris* [84]). Σε αντίθεση, τα ποσοστά των SFA των κεφαλοθώρακων των δύο ειδών δεν παρουσίασαν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ τους, όμως βρέθηκαν αρκετά υψηλότερα από αυτά των κατεψυγμένων *A. foliacea* (29.62 %TFA) [179]. Τα υψηλά ποσοστά των ακόρεστων λιπαρών οξέων σε γαρίδες βαθέων υδάτων πιθανόν να οφείλονται στη χαμηλότερη θερμοκρασία του νερού που υπάρχει στα μεγάλα βάθη [188].

Τα MUFA στους μύες και στους κεφαλοθώρακες των κόκκινων γαρίδων βρέθηκαν υψηλότερα από των ροζ. Τα ποσοστά του πίνακα 6-6 όμως και των δύο ειδών γαρίδων προσδιορίστηκαν χαμηλότερα από αυτά που αναφέρονται από την Yerlikaya et al.

(2013) για τις *A. antennatus, A. foliacea, P. martia, P. longirostris* και *P. edwardsi*, τα οποία κυμαίνονταν από 30.32-38.89%TFA [84], αλλά υψηλότερα από τα αντίστοιχα των *M. kerathurus* και *M. monoceros* (24.84% και 23.97% TFA αντίστοιχα) [84]. Στους κεφαλοθώρακες το ποσοστό των MUFA των κατεψυγμένων *A. foliacea* [181] βρέθηκε 48.83% TFA, ποσοστό υψηλότερο από το αντίστοιχο ποσοστό του πίνακα 6-6.

Το ποσοστό των PUFA στις υπό μελέτη κόκκινες γαρίδες ήταν υψηλότερο από το αντίστοιχο ποσοστό των ροζ, ενώ στους κεφαλοθώρακες παρατηρήθηκε το αντίστροφο. Τα αποτελέσματα των μυών (πίνακα 6-6) έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των *P. japonicas* (38.25%TFA) και των *M. kerathurus* (41.57%TFA) [84], ενώ τα PUFA των κεφαλοθώρακων που βρέθηκαν στις κατεψυγμένες *A. foliacea* [179] ήταν ελαφρώς υψηλότερα (21.55% TFA) από τα αντίστοιχα των υπό μελέτη γαρίδων.

Υπολογίζοντας τα PUFA και τα ω-3 λιπαρά οξέα σε g ανά 100 g νωπού ιστού (πίνακας 6-6), βρέθηκε ότι η περιεκτικότητα των PUFA στους κεφαλοθώρακες ήταν υψηλότερη από την αντίστοιχη περιεκτικότητα των μυών. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι τα 100 g κεφαλοθωράκων των *A. foliacea* και *P. longirostris* παρέχουν 1.22 και 0.75 g PUFA, και 0.73 και 0.45 g ω-3 λιπαρών οξέων αντίστοιχα, ενθαρρύνοντας την πλήρη αξιοποίηση αυτού του υποπροϊόντος ως μια εξαιρετική πηγή των PUFA λιπαρών οξέων.

Τέλος, από τον συγκεκριμένο πίνακα φαίνεται ότι οι μύες των γαρίδων ήταν σημαντική πηγή ω-3 και οι τιμές κυμαινόταν από 28.25-33.05% των TFA. Η αναλογία ω-3/ω-6 των μυών και των δύο ειδών γαρίδων (>2.9) βρέθηκε μεγαλύτερη από την συνιστώμενη αναλογία για μια ισορροπημένη διατροφή [189,190]. Τα αποτελέσματα των αναλογιών ω-3/ω-6 των υπό μελέτη ειδών, έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων ειδών γαρίδων, όπως των *M. rosenbergii, P. brasiliensis*, *P. schimitti* και *X. Kroyeri*, οι αναλογίες των οποίων κυμαίνονταν από 1.7-4.0 [78]. Στην περίπτωση των κεφαλοθωράκων, το Σω:3 βρέθηκε να κυμαίνεται από 11.13-11.95% TFA και το Σω-6 από 7.36-8.05% TFA και συνεπώς η αναλογία ω-3/ω-6 προσδιορίστηκε χαμηλή (1.48-1.51). Ο υπολογισμός της αναλογίας αυτής είναι σημαντικός γιατί πρέπει να υπάρχει μια ισορροπία της πρόσληψης των ω-3 και των ω-6 λιπαρών οξέων. Η μείωση της πρόσληψης των ω-6 και η ταυτόχρονη αύξηση της πρόσληψης των ω-3 πιθανόν να συμβάλουν στη μείωση του κινδύνου καρδιακών παθήσεων [189,190]. Επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζει ο υπολογισμός του λόγου

PUFA/SFA, καθώς κρίνεται σημαντικός για μια ισορροπημένη διατροφή και συνιστάται ο λόγος PUFA/SFA να είναι ≥ 0.45 [191]. Στα συγκεκριμένα είδη γαρίδων, όντως παρατηρήθηκε ότι ο λόγος PUFA/SFA ήταν υψηλότερος από τον προτεινόμενο και στους μύες και στους κεφαλοθώρακες (πίνακας 6-6). Τέλος υπολογίσθηκε και ο λόγος PUFA/SFA, ο οποίος ήταν 2-2.6 φορές μεγαλύτερος των μυών από αυτόν των κεφαλοθωράκων.

6.3.8 Υπολογισμός διατροφικών δεικτών

Σύμφωνα με τον Dayal et al. (2013), οι διαιτολόγοι και οι καταναλωτές είναι επιφυλακτικοί όσο αφορά την πραγματική διατροφική αξία των γαρίδων, λόγω της σχετικά υψηλής περιεκτικότητας σε χοληστερόλη [86]. Ως εκ τούτου, ο υπολογισμός των διατροφικών δεικτών για την αξιολόγηση της ποιότητας των λιπιδίων κρίνεται απαραίτητος και παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον, ώστε να προσδιοριστεί η επίδραση των χοληστερολαιμικών λιπαρών οξέων της γαρίδας. Συνεπώς συχνά χρησιμοποιούνται κάποιοι δείκτες για τον σκοπό αυτό και είναι οι εξής:

- ο αθηρογενετικός δείκτης (atherogenic index, AI) και ο θρομβογενετικός δείκτης (thrombogenic index, TI) οι οποίοι υπολογίστηκαν σύμφωνα με τους προτεινόμενους τύπους των Ulbricht και Southgate (1991):

AI = [12:0+(4×14:0)+16:0]/(ω-3PUFA+ω-6PUFA+MUFA) και

TI = (14:0+16:0+18:0)/(0.5MUFA+0.5 ω-6PUFA+3 ω-3PUFA+ω-3PUFA/ω-6 PUFA) [192]

- ο λόγος υποχοληστερολαιμικών (hypocholesterolaemic) και υπερχοληστερολαιμικών (hypercholesterolaemic) λιπαρών οξέων **(h/H)**, ο οποίος υπολογίστηκε σύμφωνα με τον προτεινόμενο τύπο των Santos-Silva et al. (2002):

h/H=(C18:1ω9+C18:2ω6+C18:3ω3+C20:4ω6+C20:5ω3+C22:5ω3+C22:6ω3)/(C14:0+C16:0) [193]

- ο χοληστερινικός δείκτης (cholesterol index, CI), ο οποίος υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο του Zilversmit (1979):

CI = 1.01(g of SFA/100 g νωπού ιστού–0.5xg of PUFA/100 g νωπού ιστού) + (0.06xmg χοληστερόλης/100 g νωπού ιστού) [194]

- και ο δείκτης χοληστερόλης-κορεσμένου λίπους (cholesterol-saturated fat, CSI), ο οποίος υπολογίστηκε σύμφωνα με τον προτεινόμενο τύπο του Connor (1986):

CSI = (1.01 × g SFA/100 g νωπού ιστού) + (0.05 × mg χοληστερόλης/ 100 g νωπού ιστού) [195]

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης (πίνακας 6-7), ο αθηρογενετικός δείκτης (atherogenic index, AI) βρέθηκε 0.33 και 0.36 στους μύες των *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα, ενώ ο θρομβογενετικός δείκτης (thrombogenic index, TI) 0.20 και 0.24 αντίστοιχα. Χαμηλές τιμές των AI και TI υπολογίστηκαν και στους κεφαλοθώρακες. Οι τιμές των εν λόγω δεικτών τόσο σε μύες όσο και κεφαλοθώρακες προσδιορίστηκαν πολύ χαμηλότερες σε σύγκριση με αντίστοιχες τιμές τροφίμων ζωικής προέλευσης [191,196].

Ο υψηλός λόγος υποχοληστερολαιμικών-υπερχοληστερολαιμικών λιπαρών οξέων (h/H) και οι χαμηλές τιμές των δεικτών χοληστερόλης (CI) και χοληστερόλης-κορεσμένων λιπαρών οξέων (CSI) των μυών των γαρίδων δείχνουν τον προστατευτικό χαρακτήρα τους έναντι του κινδύνου καρδιακών νοσημάτων.

Πίνακας 6-7: Δείκτες αθηρογένεσης (AI), θρομβογένεσης (TI), υποχοληστερολαιμικών-υπερχοληστερολαιμικών λιπαρών οξέων (h/H), χοληστερόλης (CI) και χοληστερόλης-κορεσμένων λιπαρών οξέων (CSI) ολικού λίπους των μυών και κεφαλοθωράκων των *A. foliacea* και *P. longirostris*

Δείκτες	***A. foliacea*** **μύες**	**(κόκκινες γαρίδες) κεφαλοθώρακες**	***P. longirostis*** **μύες**	**(ροζ γαρίδες) κεφαλοθώρακες**
AI	0.33±0.01a	0.43±0.02b	0.36±0.01a	0.41±0.02b
TI	0.20±0.00a	0.43±0.02b	0.24±0.01c	0.39±0.01d
h	57.11±0.36a	39.19±0.42b	50.57±0.57c	39.94±0.48b
H	18.85±0.17a	21.98±0.26b	19.71±0.19c	20.44±0.24d
h/H	3.03±0.02a	1.78±0.03b	2.57±0.02c	1.95±0.01d
CI	3.42±0.07a	8.96±0.09b	5.42±0.14c	9.35±0.21d
CSI	2.98±0.05a	8.38±0.16b	4.68±0.10c	8.33±0.11b

- Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95% (N=6)

6.3.9 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων (TG) με GC-FID

Ύστερα από την απομόνωση της ζώνης των τριγλυκεριδίων (TG) με χρήση PLTC, στη συνέχεια προσδιορίστηκαν τα λιπαρά οξέα των TG των μυών και των κεφαλοθωράκων των δύο ειδών γαρίδων με GC-FID, αφού πρώτα μετατράπηκαν στους αντίστοιχους

μεθυλεστέρες με ήπια αλκαλική μεθανόλυση (υποκεφάλαιο 5.7.5) Παρατίθεται ο αντίστοιχος πίνακας 6-8.

Σύμφωνα με τον πίνακα προσδιορίστηκαν συνολικά 40 λιπαρά οξέα τριγλυκεριδίων με 10 έως 24 άτομα άνθρακα και με 0 έως 6 διπλούς δεσμούς και στα δύο είδη γαρίδων, τόσο σε μύες όσο και σε κεφαλοθώρακες. Με έντονη γραμματοσειρά τονίζονται τα λιπαρά οξέα που παρουσιάζουν μεγαλύτερο διατροφικό ενδιαφέρον. Παρατηρώντας τον πίνακα, φαίνεται ότι το προφίλ των λιπαρών οξέων των TG των υπό μελέτη γαρίδων δεν παρουσιάζει τόσο διαφορές μεταξύ των ειδών, αλλά όσο μεταξύ των επιμέρους ιστών (μύες-κεφαλοθώρακες).

Πίνακας 6-8: Σύσταση % λιπαρών οξέων των τριγλυκεριδίων (TG) των μυών και κεφαλοθωράκων των *A. foliacea* και *P. longirostris* με GC-FID

Λιπαρά οξέα	***A. foliacea* (κόκκινες γαρίδες)**		***P. longirostis* (ροζ γαρίδες)**	
	μύες	**κεφαλοθώρακες**	**μύες**	**κεφαλοθώρακες**
C10:0	n.d.	0.46±0.00a	1.20±0.00b	0.14±0.00c
C14:0	2.62±0.00a	1.90±0.00b	3.15±0.00c	3.62±0.00d
C14:1	0.18±0.00a	0.22±0.00b	0.63±0.00c	0.91±0.00d
iso-C15:0	n.d.	0.05±0.00a	1.20±0.00b	0.18±0.00c
C15:0	n.d.	0.54±0.00a	2.24±0.0b	1.38±0.00c
C15:1 ω-5	n.d.	0.24±0.00a	1.30±0.00b	1.20±0.00c
C16:0	26.26±0.08a	21.73±0.06b	21.69±0.07c	21.07±0.06d
iso-C16:0	1.29±0.00a	1.26±0.00b	3.26±0.02c	1.50±0.00d
C16:1 ω-9	8.04±0.03a	9.20±0.03b	8.85±0.03c	9.56±0.03d
iso-C17:0	0.66±0.00a	0.63±0.00b	1.15±0.00c	1.43±0.00d
cyclo-C17:0	0.77±0.00a	0.43±0.00b	1.21±0.00c	1.24±0.00d
C17:0	1.26±0.01a	1.24±0.01b	1.21±0.01c	1.82±0.02d
C17:1 ω-7	n.d.	0.62±0.00a	0.39±0.00b	1.05±0.00c
C18:0	6.56±0.07a	5.30±0.06b	4.85±0.05c	4.08±0.04d
C18:1 ω-9 trans	n.d.	n.d.	0.94±0.00a	0.68±0.00b
C18:1 ω-9 cis	29.28±0.29a	31.17±0.3b	19.21±0.19c	19.13±0.19d
C18:1 ω-7	7.92±0.05a	7.83±0.05a	7.71±0.05b	7.40±0.04c
C18:2 ω-6 trans	0.43±0.00a	0.50±0.00b	1.63±0.02c	0.86±0.00d
C18:2 ω-6 cis	1.78±0.02a	1.02±0.00b	1.38±0.01c	1.58±0.02d
C18:3 ω-6	0.96±0.00a	0.99±0.00b	0.81±0.00c	1.16±0.01d
C18:3 ω-3	n.d.	0.15±0.00a	0.32±0.00b	0.23±0.00c

C18:4 ω-3	n.d.	0.05±0.00a	n.d.	0.17±0.00b
C19:0	0.30±0.00a	0.39±0.00b	0.41±0.00c	0.34±0.00d
C20:0	0.43±0.00a	0.63±0.00b	1.53±0.02c	1.72±0.02d
C20:1 ω-9	5.33±0.08a	6.02±0.08b	4.82±0.07c	5.24±0.08d
C20:2 ω-6	0.42±0.00a	0.53±0.00b	0.67±0.00c	0.84±0.01d
C20:3 ω-6	0.48±0.00a	0.93±0.00b	1.76±0.02c	2.42±0.03d
C20:4 ω-6	0.51±0.00a	0.14±0.00b	n.d.	0.22±0.00c
C20:3 ω-3	n.d.	0.08±0.00a	n.d.	0.11±0.00b
C20:5 ω-3 (EPA)	0.65±0.00a	1.17±0.02b	1.78±0.03c	2.46±0.03d
C22 :0	n.d.	0.14±0.00a	0.31±0.00b	0.37±0.00c
C22 :1 ω-11	0.52±0.00a	0.33±0.00b	n.d.	0.18±0.00c
C22 :1 ω-9	n.d.	0.30±0.00a	0.31±0.00b	0.31±0.00c
C22 :2 ω-6	n.d.	0.29±0.00a	n.d.	0.13±0.00b
C22 :4 ω-6	1.09±0.00a	0.28±0.00b	0.80±0.00c	0.14±0.00d
C22 :5 ω-6	1.43±0.00a	0.54±0.00b	0.80±0.00c	1.26±0.00d
C22 :5 ω-3	n.d.	0.14±0.00a	0.27±0.00b	0.40±0.00c
C24 :0	n.d.	0.30±0.00a	n.d.	0.52±0.00b
C22 :6 ω-3 (DHA)	0.82±0.02a	2.14±0.04b	2.23±0.04c	2.81±0.05d
C24:1 ω-9	n.d.	0.14±0.00a	n.d.	0.14±0.00a
Σω:0 (SFA)	40.15±0.19a	34.99±0.17b	43.41±0.21c	39.41±0.20d
Σω:1 (MUFA)	51.28±0.45a	56.07±0.49b	44.16±0.35c	45.80±0.36d
Σω:n (PUFA)	8.58±0.09a	8.95±0.11a	12.45±0.15b	14.79±0.18c
Σω:3	1.47±0.02a	3.73±0.06b	4.60±0.07c	6.18±0.09d
Σω:6	7.10±0.07a	5.22±0.05b	7.85±0.08c	8.61±0.09d
ω-3/ω-6	0.21±0.00a	0.71±0.00b	0.59±0.00c	0.72±0.00b

- Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95% (N=6), n.d (not detected)

Από τον πίνακα 6-8 φαίνεται ότι στην ομάδα των SFA, τόσο στους μύες όσο και στους κεφαλοθώρακες, τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα ήταν τα C16:0 (παλμιτικό) και C18:0 (στεατικό) και κυμαίνονταν από 21.07-26.26% TFA των TG και 4.08-6.56% TFA των TG αντίστοιχα. Μεγαλύτερα ποσοστά λιπαρών οξέων παρατηρήθηκαν στους μύες και τους κεφαλοθώρακες των κόκκινων γαρίδων. Τα υπόλοιπα SFA βρέθηκαν σε χαμηλότερα ποσοστά (<4%TFA των TG). Συγκρίνοντας τα C16:0 και C18:0 των υπό μελέτη γαρίδων με τις κατεψυγμένες κόκκινες γαρίδες [179], παρατηρήθηκαν ότι τα

ποσοστά των δύο κόκκινων γαρίδων ήταν παρόμοια, αλλά υψηλότερα από αυτά των ροζ.

Από την ομάδα των MUFA, κυρίαρχο λιπαρό οξύ βρέθηκε το C18:1 ω-9 cis σε ποσοστά 19.21-29.28% TFA των TG στους μύες και 19.13-31.17% TFA των TG στους κεφαλοθώρακες. Ακολούθησαν το C16:1 ω-9 σε ποσοστά 8.04-8.85% TFA των TG στους μύες και 9.20-9.56% TFA των TG στους κεφαλοθώρακες και το C18:1 ω-7 σε ποσοστά 7.71-7.92% TFA των TG στους μύες και 7.40-7.83% TFA των TG στους κεφαλοθώρακες. Τα C18:1 ω-9 cis και C18:1 ω-7 προσδιορίστηκαν υψηλότερα και στους μύες και τους κεφαλοθώρακες των κόκκινων γαρίδων, ενώ το C16:1 ω-9 προσδιορίστηκε χαμηλότερο. Παρόμοιες τιμές με τα αποτελέσματα των υπό μελέτη κόκκινων γαρίδων είχαν οι κατεψυγμένες κόκκινες γαρίδες, *A. foliacea* [179]. Ενδιαφέρον προκάλεσαν τα υψηλά ποσοστά του C20:1 ω-9 τα οποία ξεπέρασαν το 4% TFA των TG, ενώ στην ανάλυση των ολικών λιπιδίων το ποσοστό δεν ξεπερνούσε το 1.2% TFA των TL.

Αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός ότι προσδιορίστηκαν χαμηλά ποσοστά EPA και DHA (<3% TFA των TG), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά που προσδιορίστηκαν στο ολικό λίπος (πίνακα 6-6). Μείωση των ποσοστών του EPA και του DHA ύστερα από αποθήκευση και συντήρηση των δειγμάτων στον πάγο ανέφερε και η Takeungwongtrakul et al. (2012), η οποία μελέτησε τις γαρίδες *L. Vannamei* [197]. Τη μείωση των ποσοστών EPA και DHA την απέδωσαν στην ευαισθησία υδρόλυσης των συγκεκριμένων λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια παρατεταμένης αποθήκευσης των δειγμάτων [197]. Παρόμοιο φαινόμενο πιθανόν να έλαβε χώρα και στα υπό μελέτη δείγματα, καθώς υπέστησαν αρχική επεξεργασία με PTLC, αποθήκευση σε ψύξη και ύστερα ανάλυση των λιπαρών οξέων με GC-FID. Επίσης η μείωση των ποσοστών των EPA και DHA ήταν αναμενόμενη καθώς τα τριγλυκερίδια αποτελούνται κυρίως από κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, και όχι τόσο από πολυακόρεστα.

Από τα σύνολα των λιπαρών οξέων (SFA, MUFA και PUFA) παρατηρήθηκε ότι τα ποσοστά των MUFA ήταν υψηλά τόσο σε μύες όσο και σε κεφαλοθώρακες και στα δύο υπό μελέτη ειδών γαρίδων, δεύτερα στη σειρά βρέθηκαν τα SFA, ενώ τα PUFA προσδιορίστηκαν σε πολύ μικρά ποσοστά. Τα τόσο χαμηλά επίπεδα των PUFA επηρεάστηκαν από τα πολύ χαμηλά επίπεδα των EPA και DHA (< 3% TFA των TG).

6.3.10 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των πολικών λιπιδίων (PL) με χρήση GC-FID

Τα λιπαρά οξέα των PL των μυών και των κεφαλοθωράκων των γαρίδων *A. foliacea* και *P. longirostris* προσδιορίστηκαν με αεριοχρωματογραφία (GC-FID), αφού πρώτα μετατράπηκαν στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες με ήπια αλκαλική μεθανόλυση, (υποκεφάλαιο 5.7.5) Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών αυτών δίνονται στον παρακάτω πίνακα 6-9.

Πίνακας 6-9: Σύσταση λιπαρών οξέων % ολικών πολικών λιπιδίων με GC-FID

Λιπαρά οξέα	***A. foliacea* (κόκκινες γαρίδες)**		***P. longirostis* (ροζ γαρίδες)**	
	μύες	**κεφαλοθώρακες**	**μύες**	**κεφαλοθώρακες**
C10:0	0.63±0.00a	n.d.	0.40±0.00b	0.09±0.00c
C14:0	0.96±0.00a	2.95±0.00b	1.44±0.00c	1.10±0.00d
C14:1	0.07±0.00a	0.09±0.00b	0.13±0.00c	0.17±0.00d
iso-C15:0	0.05±0.00a	n.d.	0.07±0.00b	0.08±0.00c
C15:0	0.79±0.00a	0.52±0.00b	1.30±0.00c	1.01±0.00d
C15:1 ω-5	0.12±0.00a	n.d.	0.27±0.00b	0.34±0.00c
C16:0	29.99 ±0.09a	23.19±0.14b	29.72±0.09c	20.28±0.06d
iso-C16:0	0.71±0.00a	0.61±0.00b	0.71±0.00a	0.68±0.00c
C16:1 ω-9	6.02±0.02a	5.32±0.03b	4.84±0.02c	5.46±0.02d
iso-C17:0	0.35±0.00a	0.29±0.00b	0.33±0.00c	0.48±0.00d
cyclo-C17:0	1.36±0.00a	0.91±0.00b	1.98±0.01c	1.58±0.00d
C17:0	1.39±0.01a	0.75±0.00b	1.54±0.01c	1.17±0.02d
C17:1 ω-7	0.63±0.00a	0.38±0.00b	0.63±0.00c	0.65±0.00d
C18:0	7.73±0.08a	8.02±0.08b	7.04±0.07c	5.73±0.06d
C18:1 ω-9 trans	n.d.	n.d.	0.21±0.00a	0.37±0.00b
C18:1 ω-9 cis	25.59±0.26a	30.06±0.18b	19.45±0.19c	19.08±0.19c
C18:1 ω-7	**4.03±0.02a**	**4.58±0.47b**	**5.22±0.02c**	**4.62±0.03b**
C18:2 ω-6 trans	n.d.	0.25±0.00a	0.37±0.00b	0.54±0.00c
C18:2 ω-6 cis	1.45±0.01a	1.06±0.01b	1.71±0.02c	1.33±0.01d
C18:3 ω-6	0.49±0.00a	0.40±0.00a	0.59±0.00b	0.70±0.00c
C18:3 ω-3	n.d.	n.d.	0.19±0.00a	0.21±0.00b
C18:4 ω-3	n.d.	n.d.	n.d.	0.07±0.00a
C19:0	0.13±0.00a	0.31±0.00b	0.08±0.00c	0.63±0.00d

C20:0	0.16±0.00a	0.30±0.00b	0.20±0.00c	0.65±0.00d
C20:1 ω-9	1.91±0.05a	3.90±0.05b	1.96±0.03a	2.74±0.04c
C20:2 ω-6	0.46±0.00a	0.44±0.00a	0.72±0.01b	0.75±0.01c
C20:3 ω-6	2.32±0.02a	0.19±0.00b	2.34±0.03a	6.45±0.07c
C20:4 ω-6	0.17±0.00a	2.34±0.040b	0.13±0.00c	0.18±0.00a
C20:3 ω-3	0.91±0.00a	0.32±0.00b	1.19±0.00c	0.18±0.00d
C20:5 ω-3 cis (EPA)	5.15±0.07a	4.46±0.06b	6.68±0.09c	9.21±0.13d
C22:0	0.12±0.00a	0.65±0.01b	0.38±0.00c	0.61±0.00d
C22:1 ω-11	0.18±0.00a	0.32±0.00b	0.10±0.00c	n.d.
C22:1 ω-9	0.11±0.00a	0.32±0.00b	0.09±0.00c	0.20±0.00d
C22:2 ω-6	n.d.	0.49±0.00a	0.28±0.00b	0.12±0.00c
C22:4 ω-6	0.15±0.00a	0.44±0.00b	n.d.	0.07±0.00c
C22:5 ω-6	0.23±0.00a	0.19±0.00b	0.62±0.00c	0.85±0.00d
C22:5 ω-3	n.d.	0.29±0.00a	0.27±0.00b	0.44±0.00c
C24:0	0.22±0.00a	0.20±0.02b	0.31±0.00c	0.81±0.02d
C22:6 ω-3 (DHA)	5.08±0.09a	4.50±0.08b	6.25±0.11c	9.91±0.18d
C24:1 ω-9	0.35±0.00a	0.96±0.02b	0.26±0.00c	0.46±0.00d
Σω:0 (SFA)	44.59±0.21a	38.70±0.21b	45.50±0.21a	34.90±0.20c
Σω:1 (MUFA)	39.01±0.34a	45.93±0.32b	33.16±0.28c	34.09±0.29d
Σω:n (PUFA)	16.40±0.23a	15.37±0.17b	21.34±0.30c	31.01±0.43d
Σω:3	11.36±0.17a	9.57±0.09b	14.58±0.21c	20.02±0.32d
Σω:6	5.04±0.06a	5.8±0.07b	6.76±0.08c	10.99±0.12d
ω-3/ω-6	2.25±0.00a	1.65±0.00b	2.16±0.00c	1.82±0.00d

- Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για στάθμη εμπιστοσύνης 95% (N=6), n.d. (not detected)

Σύμφωνα με τον πίνακα 6-9 προσδιορίστηκαν επίσης συνολικά 40 λιπαρά οξέα στα PL με 10 έως 24 άτομα άνθρακα και με 0 έως 6 διπλούς δεσμούς και στα δύο είδη γαρίδων, τόσο σε μύες όσο και σε κεφαλοθώρακες. Με έντονη γραμματοσειρά τονίζονται τα λιπαρά οξέα που παρουσιάζουν μεγαλύτερο διατροφικό ενδιαφέρον. Παρατηρώντας τον πίνακα, φαίνεται ότι το προφίλ των λιπαρών οξέων των PL των υπό μελέτη γαρίδων δεν παρουσιάζει τόσο διαφορές μεταξύ των ειδών, αλλά όσο μεταξύ των επιμέρους ιστών (σύγκριση των μυών με τους κεφαλοθώρακες).

Κυρίαρχα λιπαρά οξέα ήταν τα C16:0 και C18:0 από την ομάδα των SFA σε όλους τους ιστούς, με υψηλότερα ποσοστά στις κόκκινες γαρίδες. Από την ομάδα των MUFA,

κυρίαρχο λιπαρό οξύ βρέθηκε το C18:1 ω-9 cis σε ποσοστά 19.45-25.59% TFA των PL στους μύες και 19.08-30.06% TFA των PL στους κεφαλοθώρακες, με τα υψηλότερα ποσοστά στις κόκκινες γαρίδες. Ακολουθούσαν τα C16:1 ω-9 και C18:1 ω-7 σε ποσοστά <6% TFA των PL. Τα EPA και DHA (5.08-6.68% TFA στους μύες και 4.46-9.91% TFA στους κεφαλοθώρακες) στη ζώνη των PL δεν παρατηρήθηκαν σε τόσο χαμηλά ποσοστά όσο παρατηρήθηκαν στη ζώνη των TG (0.65-2.23% TFA στους μύες και 1.17-2.81% TFA στους κεφαλοθώρακες) (πίνακας 6-8), αλλά βρέθηκαν χαμηλότερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά των TL (πίνακας 6-7). Αυτό ίσως πάλι να οφείλεται στην επεξεργασία που υπέστησαν τα PL και την παρατεταμένη αποθήκευσή τους. Ο Clarke (1979), σε έρευνα που πραγματοποίησε σε αρσενικά άτομα γαρίδων *Pandalus montagui* [198], χρησιμοποιώντας TLC (20x20), παρατήρησε ότι τα τριγλυκερίδια (TAG) περιείχαν μικρότερα ποσοστά EPA και DHA, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ποσοστά των πολικών λιπιδίων (PL), αποτέλεσμα που συμφωνεί με τους πίνακες 6-8 και 6-9. Συγκεκριμένα, για γαρίδες που αλιεύτηκαν από τον ποταμό Crouch, τα ποσοστά των EPA και DHA που βρέθηκαν ήταν 17.83% TFA των TAG και 7.44% TFA των TAG αντίστοιχα και από τον ποταμό Lynn Well 5.78% TFA των TAG και 4.21% TFA των TAG αντίστοιχα. Τα EPA και DHA των PL που βρέθηκαν ήταν 26.68% TFA των PL και 15.50% TFA των PL (από τον ποταμό Crouch) και 17.99% TFA των PL και 14.16% TFA των PL (από τον ποταμό Lynn Well) [198]. Ίσως τελικά η τροφή και οι συνθήκες περιβάλλοντος να είναι οι πιο βασικοί παράγοντες από τους οποίους επηρεάζονται σημαντικά τα ποσοστά των λιπαρών οξέων τόσο στο ολικό λίπος, όσο και στις επιμέρους τάξεις του λίπους.

Τέλος από τον πίνακα φαίνεται ότι και στην περίπτωση των PL τα SFA και MUFA προσδιορίστηκαν σε υψηλότερα ποσοστά από αυτά των PUFA και στους μύες και τους κεφαλοθώρακες, όπως παρατηρήθηκε και στα τριγλυκερίδια (πίνακας 6-8), λόγω των χαμηλών ποσοστών EPA και DHA, ενώ η σειρά των συνόλων στο ολικό λίπος ήταν PUFA>SFA>MUFA στους μύες και MUFA>SFA>PUFA στους κεφαλοθώρακες και των δύο ειδών.

6.3.11 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός καροτενοειδών στο ολικό λίπος

Τα καροτενοειδή (κύριες χρωστικές ενώσεις) των γαρίδων μελετήθηκαν ποιοτικά και ποσοτικά με την HPLC-DAD ανάλυση. Στη συνέχεια παρατίθεται ο πίνακας 6-10 δίνοντας τη σύσταση των επιμέρους καροτενοειδών (% w/w) του λίπους των μυών και

των κεφαλοθωράκων της *A. foliacea* και *P. longirostris* και τα mg των ολικών καροτενοειδών ανά 100 g νωπού ιστού.

Η ανάλυση HPLC-DAD των καροτενοειδών προσδιόρισε την παρουσία επτά συστατικών καροτενοειδών (πίνακας 6-10). Η σύγκριση μεταξύ των καροτενοειδών των μυών και των κεφαλοθωράκων των δύο υπό μελέτη ειδών γαρίδων έδειξε ότι η ελεύθερη ασταξανθίνη είναι το κυρίαρχο συστατικό και στους δύο ιστούς και ακολουθεί η λουτεΐνη. Η ζεαξανθίνη, κανθαξανθίνη, α- και β-κρυπτοξανθίνη και οι εστέρες της ασταξανθίνης προσδιορίστηκαν σε μικρότερες ποσότητες σε όλους τους ιστούς. Μαλακόστρακα, όπως οι γαρίδες, περιέχουν ασταξανθίνη ως κύρια χρωστική ένωση, η οποία σχηματίζεται κυρίως από β-καροτένιο ή ζεαξανθίνη μέσω οξειδωτικής μετατροπής [199,200].

Πίνακας 6-10: Σύσταση επιμέρους καροτενοειδών % των ολικών καροτενοειδών με HPLC-DAD

Καροτενοειδή	***A. foliacea* (κόκκινες γαρίδες)**		***P. longirostis* (ροζ γαρίδες)**	
	μύες	**κεφαλοθώρακες**	**μύες**	**κεφαλοθώρακες**
ασταθανθίνη	34.73±0.87a	37.55±0.64b	34.32±0.58a	49.08±0.82c
ζεαξανθίνη	9.55 ±0.12a	16.48±0.26b	10.39±0.32c	11.82±0.27d
κανθαξανθίνη	10.34±0.29a	8.23±0.16b	12.31±0.43c	7.68±0.26d
λουτεΐνη	23.84±0.54a	29.59±0.69b	22.12±0.42c	18.64±0.37d
εστέρες ασταξανθίνης	16.24±0.39a	7.15±0.22b	12.25±0.17c	9.58±0.24d
a- κρυπτοξανθίνη	3.20±0.11a	0.65±0.06b	4.53±0.14c	1.67±0.08d
b- κρυπτοξανθίνη	2.10±0.05a	0.35±0.04b	4.08±0.12c	1.53±0.09d
Ολικά καροτενο-ειδή mg/100 ww	4.49±0.09a	28.24±0.67b	2.12±0.06c	10.08±0.23d

- Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς (P<0.05) για στάθμη εμπιστοσύνης 95% (N=6)

Από διατροφικής άποψης, το ποσοστό των καροτενοειδών του TL των μυών και των κεφαλοθωράκων των *A. foliacea* βρέθηκε σχεδόν διπλάσιο από το αντίστοιχο ποσοστό των καροτενοειδών του TL των ιστών των *P. longirostris* (πίνακας 6-10). Αυτό πιθανόν να επεξηγεί τον έντονο χρωματισμό των *A. foliacea.*

Τα 100 g μυών των *A. foliacea* παρέχουν 1.56 mg ασταξανθίνη και 1.07 mg λουτεΐνη, ενώ τα 100 g μυών των *P. longirostris* δίνουν 0.73 mg ασταξανθίνη και 0.47 mg λουτεΐνη (δεδομένα που υπολογίζονται από τον πίνακα 6-10). Τα υψηλά επίπεδα της ασταξανθίνης στους κεφαλοθώρακες, τους καθιστούν μια εξαιρετική φυσική πηγή καροτενοειδών. Η ασταξανθίνη που λαμβάνεται από απόβλητα γαρίδων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χρωστικό πρόσθετο σε τρόφιμα ή σκευάσματα ζωοτροφών ιχθυοκαλλιέργειας, αλλά και σε ιατρικές και βιοϊατρικές εφαρμογές ή ως ένα φυσικό συμπλήρωμα διατροφής [201]. Η αναζήτηση για φυσικές πηγές ασταξανθίνης αυξάνεται επειδή είναι μία σταθερή, ακίνδυνη ένωση για την υγεία του ανθρώπου, δεδομένου ότι δεν προκαλεί αλλεργικές αντιδράσεις σε αντίθεση με τη συνθετική μορφή της. Συνεπώς κρίνεται κατάλληλο και για τη χρήση του σε παρασκευή καλλυντικών [202]. Ως εκ τούτου, πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί για την εκχύλιση της ασταξανθίνης από απόβλητα γαρίδων χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους [201].

Η ασταξανθίνη και οι εστέρες ασταξανθίνης, η κανθαξανθίνη, η ελεύθερη και εστεροποιημένη μορφή λουτεΐνης, η ζεαξανθίνη και το β-καροτένιο αναφέρονται ως οι σημαντικότερες χρωστικές ουσίες σε ποικίλα είδη γαρίδων (*Crangon crangon*, *Solonocera indica*, *Aristeus alcocki*, *Penaeus monodon*, *Penaeus indicus*, *Metapenaeus dobsonii* και *Parapenaeopsis stylifera)* [188,199]. Όπως αναφέρθηκε από τον Manjabhat et al. (2006) αλλά και την Sachindra et al. (2005), η παρουσία και το ποσοστό των καροτενοειδών στις γαρίδες είναι στενά συνδεδεμένα με το φυσικό τους περιβάλλον και την τροφή, επειδή οι γαρίδες λαμβάνουν τα καροτενοειδή μέσω της διατροφής, καθώς δεν μπορούν να τα συνθέσουν de novo. Η γεωγραφική θέση είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει το ποιοτικό και ποσοτικό προφίλ των καροτενοειδών των γαρίδων [203,204]. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι γαρίδες βαθέων υδάτων, όπως οι υπό μελέτη γαρίδες, παρουσιάζουν εντονότερο χρώμα σε σύγκριση με γαρίδες που ζουν σε ρηχά νερά, διότι περιέχουν υψηλότερες ποσότητες ολικών καροτενοειδών [182].

6.4 Συμπεράσματα

Στη συγκεκριμένη έρευνα κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν οι γαρίδες *A. foliacea* και *P. longirostris* καθώς χρήζουν μεγάλης εμπορικής, αλιευτικής αξίας στη Μεσόγειο, καταλαμβάνοντας εξέχουσα θέση στη διατροφή.

Από διατροφικής άποψης, αποδείχθηκε ότι οι μύες ήταν πλούσιοι σε πρωτεΐνες, περιείχαν χαμηλά ποσοστά λίπους και τέφρας. Σε αντίθεση, οι κεφαλοθώρακες,

περιείχαν υψηλότερα ποσοστά λίπους και τέφρας, αλλά χαμηλότερα ποσοστά πρωτεϊνών. Τα υψηλότερα ποσοστά λίπους και τέφρας ήταν αναμενόμενα καθώς οι κεφαλοθώρακες περιείχαν το ηπατοπάγκρεας. Στο ηπατοπάγκρεας πραγματοποιείται η σύνθεση των λιπιδίων και η βιοσυσσώρευση των μετάλλων, αντιθέτως οι μύες περιείχαν υψηλότερα ποσοστά πρωτεϊνών διότι αποτελούν δομικό ιστό.

Μελετώντας εκτενέστερα το ολικό λίπος με τη χρήση του Iatroscan TLC-FID, παρατηρήθηκε ότι οι μύες και των δύο ειδών ήταν πλούσιοι σε πολικά λιπίδια (PL) ξεπερνώντας τα 85% TL, ενώ οι κεφαλοθώρακες βρέθηκαν πλούσιοι σε ουδέτερα λιπίδια (NL) και κυμαινόταν από 63-80% TL. Ως κύρια PL τόσο σε μύες όσο και κεφαλοθώρακες βρέθηκαν η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και η φωσφατιδυλοαιθανο-λαμίνη (PE). Τα μεγάλα ποσοστά της PC είναι ικανά να παρέχουν σημαντική ποσότητα χολίνης στον ανθρώπινο οργανισμό, καθιστώντας έτσι τους μύες κατάλληλους για την κάλυψη μεγάλου ποσοστού της συνιστώμενης ημερήσιας πρόσληψης (ΣΗΠ) μέσω της διατροφής και τους κεφαλοθώρακες κατάλληλους για τη χρήση τους στην παρασκευή συμπληρωμάτων λεκιθίνης. Ως κύρια NL μυών και κεφαλοθωράκων βρέθηκαν η χοληστερόλη (chol) και τα τριγλυκερίδια (TG). Επειδή συχνά οι γαρίδες ενοχοποιούνται για τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης, κρίθηκε απαραίτητο ο υπολογισμός της περιεκτικότητάς της σε mg/100 g νωπού ιστού. Συνεπώς υπολογίζοντας την περιεκτικότητα των μυών σε χοληστερόλη, παρατηρήθηκε ότι τόσο οι μύες των *A. foliacea* όσο και των *P. longirostris* ήταν πολύ χαμηλή, 56.12 και 88.23 mg/100 g γεγονός που καθιστά τις γαρίδες κατάλληλες προς κατανάλωση, καθώς ως ημερήσια πρόσληψη συνιστώνται τα 300 mg για τους άνδρες και 225 mg για τις γυναίκες. Χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης βρέθηκαν και στους κεφαλοθώρακες. Τέλος, από τα αποτελέσματα του Iatroscan TLC-FID, παρατηρήθηκε ότι οι γαρίδες *A. foliacea* περιείχαν διγλυκερίδια (DG) και ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ευκολότερη υδρόλυση των λιπιδίων των κόκκινων γαρίδων από λιπάσες και φωσφολιπάσες.

Χρησιμοποιώντας αεριοχρωματογράφο με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (GC-FID) προσδιορίστηκαν τα λιπαρά οξέα του ολικού λίπους, των τριγλυκεριδίων (TG) και των πολικών λιπιδίων (PL) των γαρίδων. Το ολικό λίπος των γαρίδων βρέθηκε πλούσιο σε λιπαρά οξέα, με κύριο το C16:0 (παλμιτικό), C18:0 (στεατικό), C18:1 ω-9 (ελαϊκό), C20:5 ω-3 (EPA) και C22:6 ω-3 (DHA). Εντούτοις σημαντική παρατήρηση ήταν η μείωση των ποσοστών EPA και DHA στη ζώνη των TG και των PL. Η μείωση των

ποσοστών των EPA και DHA οφείλεται στους εξής παράγοντες: α) τα τριγλυκερίδια αποτελούνται κυρίως από κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, β) στη χρήση της παρασκευαστικής πλάκας (PTLC), η οποία χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της ζώνης των TG και PL, αλλά και γ) στη μεγάλη ευαισθησία υδρόλυσης των συγκεκριμένων λιπαρών οξέων ύστερα από παρατεταμένη επεξεργασία και αποθήκευση των δειγμάτων.

Υπολογίζοντας διάφορους διατροφικούς παράγοντες όπως τους AI, TI, h/H, CI και CSI, παρατηρήθηκε ότι οι εν λόγω γαρίδες θεωρούνται κατάλληλες προς κατανάλωση μειώνοντας τον κίνδυνο καρδιακών νοσημάτων, ενώ ταυτόχρονα οι κεφαλοθώρακες θα μπορούσαν κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν από τη βιομηχανία για την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής.

Χρησιμοποιώντας υγροχρωματογραφία (HPLC-DAD) για τον προσδιορισμό των καροτενοειδών, προσδιορίστηκαν επτά ενώσεις καροτενοειδών με κύρια την ασταξανθίνη. Η ασταξανθίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χρωστικό πρόσθετο σε τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής, καλλυντικά και σκευάσματα ζωοτροφών ιχθυοκαλλιέργειας καθώς αποδεδειγμένα δεν προκαλεί αλλεργικές αντιδράσεις. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση των καροτενοειδών ολικού λίπους των κόκκινων γαρίδων, επεξηγεί και τον εντονότερο χρωματισμό τους σε σύγκριση με αυτό των ροζ γαρίδων.

Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι δεν παρατηρήθηκαν τόσο μεγάλες διαφορές μεταξύ των δύο ειδών γαρίδων, όσο μεταξύ των ιστών των γαρίδων. Οι διαφορές όμως που παρατηρήθηκαν μεταξύ των συγκεκριμένων ειδών και άλλων ειδών γαρίδων της σχετικής βιβλιογραφίας, οφείλονται στις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες, την εποχή αλίευσης, το γεωγραφικό πλάτος, την αλατότητα των περιοχών αλίευσης, την περίοδο έκδυσης, την ηλικία και το φύλο.

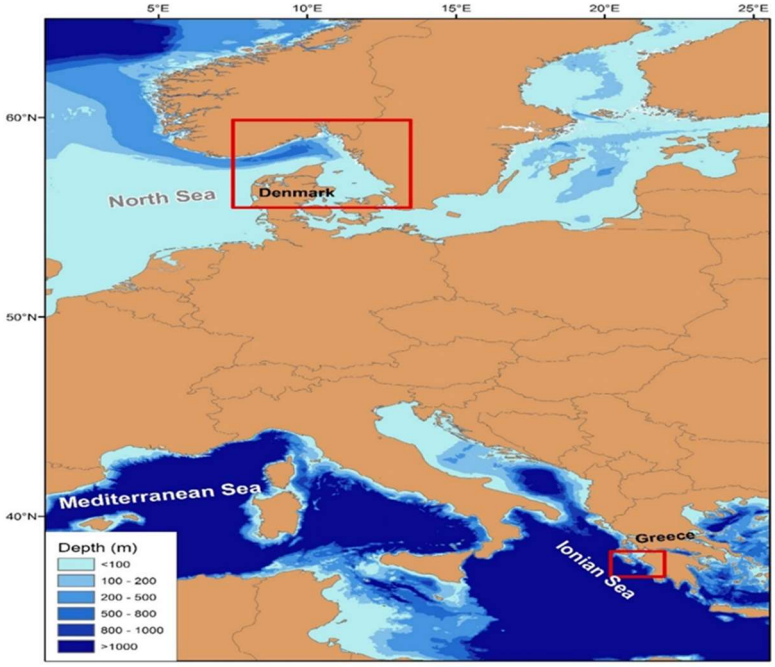
Εν κατακλείδι, η παρουσία βιοδραστικών λιπιδικών συστατικών όπως των ω-3 λιπαρών οξέων, της χολίνης και της ασταξανθίνης στους μύες των γαρίδων ήταν σε επιθυμητά επίπεδα και γι’αυτό τις καθιστά ωφέλιμες και με ευεργετική δράση στην ανθρώπινη υγεία. Ομοίως και οι κεφαλοθώρακες καθίστανται κατάλληλοι για διάφορες χρήσεις από τις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ Pb, Hg, Cd, As ΚΑΙ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ *P. LONGIROSTRIS* (ΜΕΣΟΓΕΙΟΣ ΘΑΛΑΣΣΑ-ΚΥΛΛΗΝΗ) ΚΑΙ *P. BOREALIS* (ΒΟΡΕΙΑ ΘΑΛΑΣΣΑ-SKAGERRAK): ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΕΙΔΩΝ

7.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό μελετώνται και συγκρίνονται τα εξής στοιχεία: μόλυβδος (Pb), υδράργυρος (Hg), κάδμιο (Cd) και αρσενικό (As) καθώς και το προφίλ των λιπαρών οξέων των μυών και κεφαλοθωράκων δύο ειδών γαρίδων, της *P. longirostris* (Μεσόγειος θάλασσα-Κυλλήνη) και της *P. borealis* (Βόρεια θάλασσα-Skagerrak). Οι γαρίδες *P. longirostris* καταναλώνονται συστηματικά από τους λαούς των μεσογειακών χωρών, ενώ οι *P. borealis* καταναλώνονται κυρίως από τους λαούς χωρών της Βορείου Ευρώπης, καθώς είναι και το επικρατέστερο είδος γαρίδων του Βόρειου Ατλαντικού. Οι *P. longirostris* (Lucas 1846, στα ελληνικά είναι γνωστές ως ροζ γαρίδες βαθέων υδάτων/διεθνώς ως deep water rose shrimps) απαντώνται σε βάθη από 20 μέχρι 750 m [205], ενώ οι *P. borealis* (Krφyer 1838, στα ελληνικά είναι γνωστές ως γαρίδα της Αρκτικής/διεθνώς ως northern shrimps) απαντώνται σε βάθη από 20 έως 1330 m (εικόνα 7-1) [206]. Τα συγκεκριμένα είδη γαρίδων έχουν χαρακτηριστικό ροζ-πορτοκαλί χρώμα, είναι μικρά σε μέγεθος και καταναλώνονται ευρέως, παρέχοντας σημαντικά ποσά θρεπτικών συστατικών στον άνθρωπο.



Εικόνα 7-1: Σημεία δειγματοληψίας γαρίδων *P. longirostris* και *P. borealis*

Οι γαρίδες μπορούν να βλάψουν τον ανθρώπινο οργανισμό διότι απορροφούν ρύπους (τοξικά στοιχεία και απόβλητα) μέσω της τροφής τους. Τα τοξικά στοιχεία υπάρχουν φυσικά στο θαλάσσιο περιβάλλον, όμως τα επίπεδά τους έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια λόγω ανθρώπινης παρέμβασης, όπως της ραγδαίας ανάπτυξης της βιομηχανίας, μεταλλουργίας και χρήσης φυτοφαρμάκων [104,207]. Επομένως με την κατανάλωση των γαρίδων και των θαλάσσιων ειδών γενικότερα, μπορούν να βιοσυσσωρευτούν αυτές οι τοξικές ουσίες στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας και να προκαλέσουν ανεπανόρθωτες και μη ανατρέψιμες βλάβες στον οργανισμό, αυξάνοντας τη θνησιμότητα. Σύμφωνα με τον Dökmeci et al. (2014) οι γαρίδες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων των ρύπων στη θάλασσα [207].

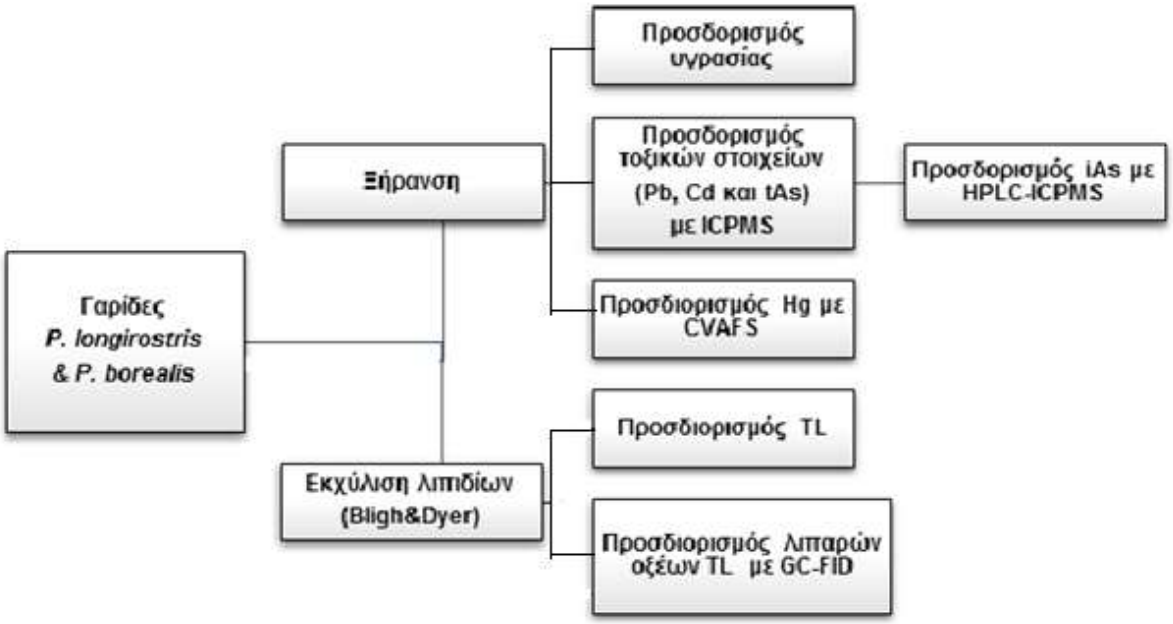
Παρόλα αυτά, οι γαρίδες ως τρόφιμο έχουν υψηλή διατροφική αξία για τον ανθρώπινο οργανισμό, διότι περιέχουν χαμηλά ποσοστά λίπους (1-2%) και υψηλή περιεκτικότητα σε ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) [86]. Τα ω-3 PUFA είναι ζωτικής σημασίας για την ανθρώπινη υγεία και ισορροπία καθώς με τη δράση τους μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιακών νοσημάτων. Δεδομένου ότι μπορούν να βιοσυντίθενται στον οργανισμό μόνο από το α-λινολενικό οξύ σε περιορισμένη ποσότητα, πρέπει να προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής [189,190].

Ο προσδιορισμός των Pb, Cd και As πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS), ενώ για τον προσδιορισμό του Hg χρησιμοποιήθηκε φασματομετρία ατομικού φθορισμού ψυχρού ατμού (Cold Vapour Atomic Fluoresence Spectrometry, CVAFS). Για τον διαχωρισμό του ολικού αρσενικού (tAs) σε οργανικό και ανόργανο As χρησιμοποιήθηκε υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography) σε συνδυασμό με ICPMS (HPLC-ICPMS). Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων του ολικού λίπους πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αεριοχρωματογράφιας με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (Gas Chromatography-Flame Ionization Detector, GC-FID) ύστερα από μετατροπή των λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Εκτενής περιγραφή των μεθόδων αυτών γίνεται στο υποκεφάλαιο 5.7.5.

Τα συγκεκριμένα είδη γαρίδων επιλέχθηκαν για μελέτη και σύγκριση μεταξύ τους, λόγω: α) των κοινών φαινομενικών χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν (ροζ-πορτοκαλί χρώμα, μικρό μέγεθος), β) των διαφορετικών κλιματολογικών συνθηκών

στις οποίες αναπτύσσονται (θερμό μεσογειακό κλίμα και ψυχρό κλίμα βόρειας θάλασσας αντιστοίχως) και γ) της οικονομικής σημασίας και μακράς παράδοσής τους στην τοπική αλιεία. Ο κύριος στόχος αυτού του πειραματικού μέρους ήταν να παρατηρηθεί αν τα συγκεκριμένα είδη γαρίδων είναι κατάλληλα προς κατανάλωση από διατροφικής άποψης και αν αυτές οι γεωγραφικές διαφορές επηρεάζουν ποιοτικά και ποσοτικά τη συγκέντρωση των στοιχείων και τη σύσταση των λιπαρών οξέων. Οι κεφαλοθώρακες επίσης κρίθηκε απαραίτητο να μελετηθούν για την παραλαβή των λειτουργικών τους συστατικών, μέσω της διαχείρισής τους ως αποβλήτων, ώστε να χρησιμοποιηθούν από φαρμακοβιομηχανίες και βιομηχανίες τροφίμων για την παρασκευή φαρμάκων και συμπληρωμάτων διατροφής [201].

Παρακάτω παρατίθεται συνοπτικό διάγραμμα (σχήμα 7-1) της πειραματικής πορείας της μελέτης των γαρίδων *P. longirostris* (αρίδες Μεσογείου) και *P. borealis* (γαρίδες Δανίας).



Σχήμα 7-1: Πειραματική πορεία ανάλυσης των γαρίδων *P. longirostris* (γαρίδες Μεσογείου) και *P. borealis* (γαρίδες Βόρειας θάλασσας)

7.2 Πειραματική πορεία

7.2.1 Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν υψηλού βαθμού καθαρότητας. Συμπυκνωμένο HNO_3 (Merck, Darmstadt, Γερμανίας) και 30% w/w H_2O_2 (Merck, Darmstadt, Γερμανία) χρησιμοποιήθηκαν για την υγρή χώνευση και

την εκχύλιση των στοιχείων Pb, Cd και As. Για την παρασκευή των πρότυπων καμπυλών αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα Pb Cd και As (πλάσμα CAL, SCP Science, Γαλλίας). Για την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη (MeOH) αναλυτικής καθαρότητας HPLC (Rathburn, Walkerburn, Σκωτίας, Ηνωμένου Βασιλείου), 25% αμμωνία (NH_3) (Suprapure, Merck) και ανθρακικό αμμώνιο ($(NH_4)_2CO_3$)) (Alfa Aesar, Karlsruhe, Γερμανίας). Για τον προσδιορισμό του Hg εφαρμόστηκε χώνευση με HNO_3/H_2S0_4 (7:3 v/v) και στη συνέχεια προστέθηκε BrCl (0.02N) για την οξείδωση των δειγμάτων (όλα τα αντιδραστήρια από τη Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO). Τα πρότυπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των λιπαρών οξέων με GC-FID ήταν από την Merck (Darmstadt, Γερμανία) ή την Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO). Τέλος το νερό που χρησιμοποιήθηκε σε όλη την αναλυτική πορεία ήταν υπερκάθαρο.

7.2.2 Στάδια πειραματικής πορείας

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη αναφέρονται στη συνέχεια.

- **Δειγματοληψία**
- **Ξήρανση δείγματος**
- **Εκχύλιση ολικού λίπους με Bligh-Dyer**
- **Προσδιορισμός υγρασίας**
- **Προσδιορισμός στοιχείων Pb, Cd και As με ICP-MS**
- **Προσδιορισμός ανόργανου As (iAs) με HPLC-ICP-MS**
- **Προσδιορισμός Hg με CVAFS**
- **Υπολογισμός εκτιμώμενης εβδομαδιαίας πρόσληψης**
- **Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων ολικού λίπους με GC-FID**

7.2.3 Στατιστική ανάλυση

Οι μετρήσεις των στοιχείων και των λιπαρών οξέων διεξήχθησαν εις τριπλούν (N=3). Υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική τους απόκλιση (Standard Deviation, S.D.) Τα δεδομένα αναλύθηκαν με One-Way ANOVA Test. Στατιστικά αποτελέσματα χαμηλότερα από 0.05 ($P<0.05$), θεωρήθηκαν σημαντικά. Οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με πακέτο SigmaStat στατιστικού λογισμικού, έκδοση 3.5-2007.

7.3 Αποτελέσματα

Στη συνέχεια παρατίθενται τα αποτελέσματα των *P. longirostris* και *P. borealis* και γίνεται μια συγκριτική μελέτη της χημικής σύστασης των δύο ειδών γαρίδων τόσο μεταξύ τους όσο και με την αντίστοιχη σχετική βιβλιογραφία.

7.3.1 Μελέτη των στοιχείων Pb, Cd, Hg και As

Οι συγκεντρώσεις του μολύβδου (Pb), υδραργύρου (Hg), καδμίου (Cd) και ολικού αρσενικού (tAs) (mg/kg νωπού ιστού, wet weight, ww) προσδιορίστηκαν σε μύες και κεφαλοθώρακες στα δύο είδη γαρίδων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7-1. Σύμφωνα με τον πίνακα, η συγκέντρωση των Pb, Hg και Cd προσδιορίστηκε υψηλότερη στους κεφαλοθώρακες και στα δύο είδη, σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή για τους μύες. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο καθώς οι κεφαλοθώρακες περιείχαν το ηπατοπάγκρεας. Το ηπατοπάγκρεας είναι το όργανο/στόχος στη βιοσυσσώρευση και αποτοξίνωση τοξικών στοιχείων. Σε αντίθεση, ο μυϊκός ιστός δεν παίζει τόσο ενεργό ρόλο στη βιοσυσσώρευση των στοιχείων [208]. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικά θαλάσσια είδη αναφέρουν ότι τα επίπεδα των τοξικών στοιχείων στο ήπαρ ήταν υψηλότερα από ότι στους μύες [208,209], κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του πίνακα 7-1.

Από τον πίνακα 7-1 φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις του Pb και του Hg ήταν υψηλότερες στις *P. longirostris* απ' ότι στις *P. borealis*. Αυτές οι διαφορές οφείλονται σε ποικίλους παράγοντες όπως στο γεωγραφικό πλάτος (ηφαιστειογενής ή μη περιοχή), στη ρύπανση των συγκεκριμένων περιοχών, στη διάρκεια έκθεσης των γαρίδων σε τοξικά στοιχεία και στο στάδιο έκδυσής τους. Εντούτοις, τόσο οι μύες όσο και οι κεφαλοθώρακες και των δύο ειδών γαρίδων περιείχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις Pb και Hg από τα ανώτερα επιτρεπτά όρια (0.5 mg/kg νωπού ιστού) της ευρωπαϊκής νομοθεσίας 1881/2006 [114].

Πολύ ενδιαφέρον παρουσίασαν τα αποτελέσματα του Cd. Όπως φαίνεται στον πίνακα 7-1, οι συγκεντρώσεις του Cd στους μύες και τους κεφαλοθώρακες των γαρίδων Βόρειας θάλασσας ήταν 10 και 4 φορές, αντιστοίχως, υψηλότερες από αυτές των μεσογειακών γαρίδων. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με έρευνα που πραγματοποιήθηκε στις *P. borealis* από τη θάλασσα Barents (Αρκτική), οι οποίες επίσης περιείχαν υψηλή συγκέντρωση καδμίου (0.7-4.7 mg/kg ξηρού ιστού). Όσο πιο βόρεια ήταν τα σημεία αλίευσης των γαρίδων στη θάλασσα Barents, τόσο υψηλότερες

ήταν και οι συγκεντρώσεις Cd. Η ίδια έρευνα προσδιόρισε, υψηλές συγκεντρώσεις Cd και στο ζωοπλακτόν της ίδιας περιοχής (0.2 έως 10.5 mg/kg ξηρού ιστού), γεγονός που δικαιολογεί τα υψηλά επίπεδα Cd στις γαρίδες. Λόγω των παράδοξα υψηλών επιπέδων Cd στην περιοχή αυτή, οι ερευνητές ονόμασαν το φαινόμενο "ανωμαλία-Cd" (Cd-anomaly) [210]. Στην ίδια έρευνα, ο Zauke και ο Schmalenbach (2006) προσδιόρισαν και τον χαλκό (Cu) και παρατήρησαν χαμηλές συγκεντρώσεις, οι οποίες πιθανόν να επηρεάζονταν από τις υψηλές συγκεντρώσεις Cd [210]. Γι'αυτό ο Zauke και Schmalenbach προσπαθώντας να δώσουν μια πιθανή εξήγηση στο φαινόμενο της ανωμαλίας Cd, υπέθεσαν ότι επειδή ο βόρειος πόλος δεν είναι πλούσιος σε ιχνοστοιχεία, οι οργανισμοί ανέπτυξαν αποτελεσματικούς μηχανισμούς πρόσληψης στοιχείων, αλλά όχι επιλεκτικούς κατά τη διάρκεια της εξέλιξής τους. Αυτοί οι μηχανισμοί δεν αναπτύχθηκαν ειδικά για την πρόσληψη απαραίτητων στοιχείων όπως του Cu και Zn, συνεπώς οι οργανισμοί απορροφούσαν και Cd, μαζί με τα απαραίτητα μέταλλα. Η έρευνα αυτή επεκτάθηκε και σε άλλα θαλάσσια είδη, από τον νότιο πόλο [210].

Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, καθώς οι τιμές Cu ήταν σχεδόν 3 και 2 φορές χαμηλότερες στους μύες και κεφαλο-θώρακες των γαρίδων Βόρειας θάλασσας (4.74±0.07 και 28.19±1.02 mg/kg ww, αντίστοιχα), σε σύγκριση με τους ιστούς των μεσογειακών γαρίδων (12.32±0.84 και 42.99±1.15 mg/kg ww στους μύες και κεφαλοθώρακες αντίστοιχα). Σημαντικό όμως ήταν ότι παρόλο που τα επίπεδα του Cd στις *P. borealis* προσδιορίστηκαν αρκετά υψηλά, κυρίως στους κεφαλοθώρακες, εντούτοις δεν ξεπέρασαν τα ανώτερα επιτρεπτά όρια της ευρωπαϊκής νομοθεσίας 1881/2006 (0.5 mg kg^{-1} ww) [114].

Ένα επιπλέον ενδιαφέρον αποτέλεσμα ήταν ότι η συγκέντρωση του ολικού αρσενικού (total As, tAs) ήταν αρκετά υψηλή, κυμαινόμενη από 29.1 έως 62.4 mg kg/kg ww και στα δύο είδη γαρίδων. Η παρουσία τόσο υψηλών συγκεντρώσεων As, παρατηρήθηκε και σε άλλα θαλάσσια είδη, συμπεριλαμβανομένων και των γαρίδων, σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποίησαν οι Francesconi και Edmonds (1996). Οι Francesconi και Edmonds προσδιόρισαν As από 1-100 mg/kg ww σε μεγάλη ποικιλία θαλάσσιων ειδών [133]. Ο Julshamn και η ομάδα του (2004b) από την άλλη, παρατήρησαν μεγάλες διακυμάνσεις στη συγκέντρωση του ολικού αρσενικού, όχι μόνο σε διαφορετικά θαλάσσια είδη, αλλά και στο ίδιο είδος (πχ μπακαλιάρο). Συγκεκριμένα παρατήρησαν ότι η συγκέντρωση του tAs κυμαινόταν από 0.4 έως 52 mg/kg ww [211].

Η τόση υψηλή συγκέντρωση As στο θαλάσσιο περιβάλλον οφείλεται κυρίως σε φυσικές δραστηριότητες όπως ηφαίστεια και λιγότερο σε ανθρώπινους παράγοντες (χρήση φυτοφαρμάκων και ζιζανιοκτόνων, κάψιμο ξύλων, μεταλλουργία) [123,124].

Τα επίπεδα As που βρέθηκαν στους μύες των μεσογειακών γαρίδων ήταν παρόμοια με τα επίπεδα As που βρέθηκαν στους κεφαλοθώρακες των μεσογειακών γαρίδων (29.9 και 29.1 mg/kg ww, αντίστοιχα). Στις γαρίδες από την Skagerrak, η συγκέντρωση As στους μύες ήταν σχεδόν διπλάσια από αυτή των κεφαλοθωράκων (62.50 και 33.40 mg/kg ww, αντίστοιχα). Παρόμοιες συγκεντρώσεις ολικού αρσενικού βρέθηκαν στους μύες και στο ηπατοπάγκρεας του αστακού *Cancer pagurus* (22-28 και 19-20 mg/kg, αντιστοίχως) [212]. Αυτό που παρατηρούμε και από τη δική μας έρευνα, αλλά και από την έρευνα στον αστακό *Cancer pagurus*, είναι ότι οι μύες περιέχουν ίσες ή αρκετά υψηλότερες συγκεντρώσεις As από αυτές των κεφαλοθωράκων. Αυτό που θα ήταν αναμενόμενο είναι οι κεφαλοθώρακες να περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση As, από αυτή των μυών, λόγω της βιοσυσσώρευσης των τοξικών στοιχείων στο ηπατοπάγκρεας. Τέτοιο φαινόμενο όμως δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση του As και πιθανόν να οφείλεται στην ιδιαίτερη φύση και δράση του συγκεκριμένου στοιχείου στο θαλάσσιο περιβάλλον [132].

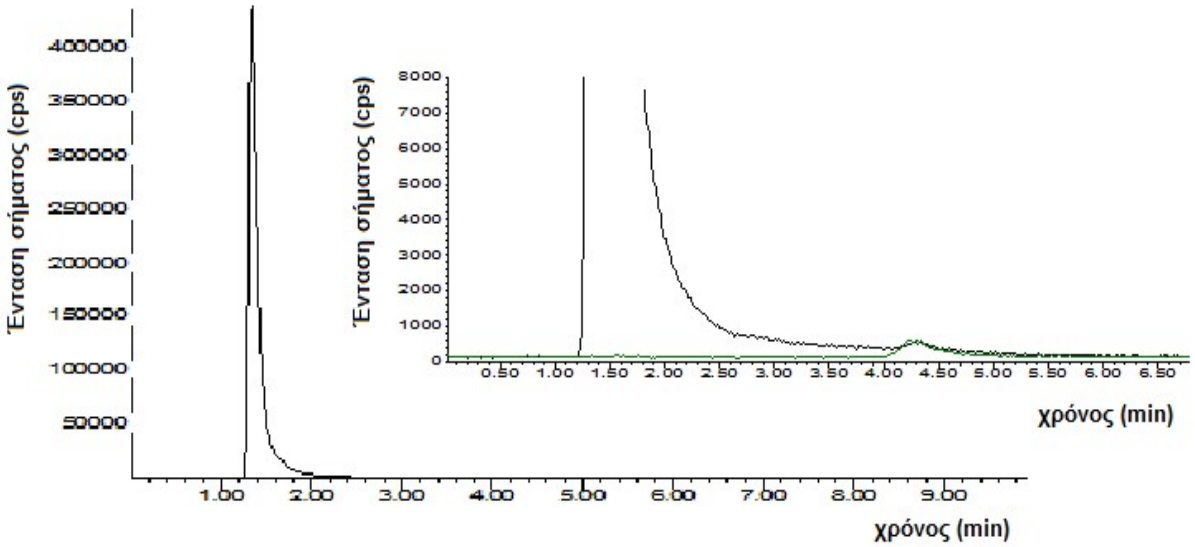
Το As όπως έχουμε επισημάνει και στην εισαγωγή (κεφάλαιο 4) υπάρχει στη φύση σε οργανική (org-As) ή ανόργανη μορφή (iAs). Η οργανική μορφή του ανιχνεύεται συνήθως σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα θαλάσσια είδη και θεωρείται μη τοξική ή λιγότερο τοξική. Η ανόργανη μορφή του θεωρείται άκρως τοξική και γι'αυτό δίνεται έμφαση στον προσδιορισμό του iAs για την αξιολόγηση της διασφάλισης ποιότητας των τροφίμων [110,111]. Όμως τα ψάρια, τα οστρακοειδή και τα μαλακόστρακα περιέχουν χαμηλές συγκεντρώσεις iAs, γεγονός που δε σηματοδοτεί κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία [213].

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, στην εν λόγω μελέτη παρατηρήθηκε ότι η κύρια μορφή As ήταν η οργανική μορφή αρσενικού (org-As). Συγκεκριμένα προσδιορίστηκε iAs μόνο στους κεφαλοθώρακες των δύο ειδών γαρίδας (πίνακας 7-1), ενώ στους μύες οι συγκεντρώσεις iAs ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης του οργάνου (πίνακας 7-1). Στη συνέχεια δίνονται δύο χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα από την ανάλυση των ενώσεων αρσενικού σε δείγμα κεφαλοθωράκων (σχήμα 7-2) και μυών (σχήμα 7-3) *P. borealis* με χρήση HPLC-ICPMS.

Πίνακας 7-1: Συγκέντρωση (mg/kg νωπού ιστού) Pb, Hg, Cd, iAs και tAs στους μύες και κεφαλοθώρακες των *P. longirostris* και *P. borealis*

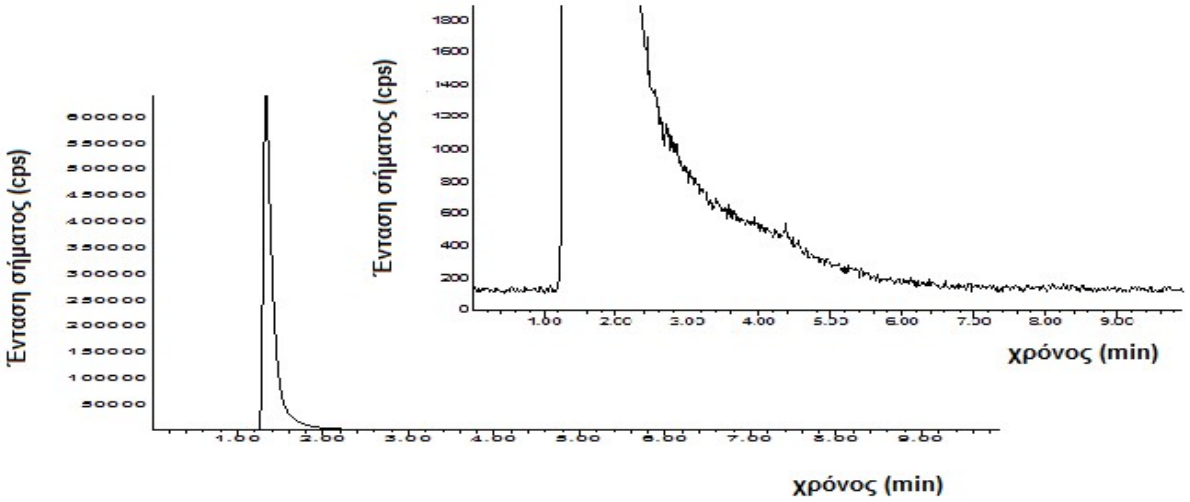
	P. longirostris **μύες**	***P. borealis*** **μύες**	***P. longirostris*** **κεφαλοθώρακες**	***P. borealis*** **κεφαλοθώρακες**
Pb	0.012±0.001a	0.005±0.002b	0.090±0.002c	0.035±0.016d
Hg	0.097±0.014a	0.020±0.009b	0.114±0.025c	0.032±0.018b
Cd	0.012±0.005a	0.129±0.038b	0.120±0.045c	0.487±0.045d
iAs	n.d	n.d.	0.0009±0.0003a	0.0007±0.0002a
tAs	29.9±0.7a	62.4±0.3b	29.1±0.2a	33.4±0.4c

- Στα αποτελέσματα δίνεται ο μέσος όρος ± SD (N=3)
- Διαφορετικό γράμμα στην ίδια στήλη υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς (P<0.05) για κάθε στάθμη εμπιστοσύνης 95%
- n.d.: not detected (δεν ανιχνεύτηκε)



- cps counts per seconds

Σχήμα 7-2 Χρωματογράφημα (με μεγέθυνση) από HPLC-ICPMS ανάλυση, των ενώσεων αρσενικού σε δείγμα κεφαλοθωράκων *P. borealis*. Η μεγάλη κορυφή στο 1.6 min είναι αρσενικό οργανικής μορφής και η κορυφή στα 4.3 min είναι αρσενικό ανόργανης μορφής. Η αναλυτική πορεία της μεθόδου και οι παράμετροι λειτουργίας του αναλυτικού οργάνου δίνονται στο υποκεφάλαιο 5.6.2 (χρήση στήλης HPLC ανιοανταλλαγής)



- cps counts per seconds

Σχήμα 7-3: Χρωματογράφημα (με μεγέθυνση) από HPLC-ICPMS ανάλυση, των ενώσεων αρσενικού σε δείγμα μυών *P. borealis*. Η μεγάλη κορυφή στο 1.6 min είναι αρσενικό οργανικής μορφής. Δεν ανιχνεύθηκε κορυφή ως ανόργανο αρσενικό. Η αναλυτική πορεία της μεθόδου και οι παράμετροι λειτουργίας του αναλυτικού οργάνου δίνονται στο υποκεφάλιο 5.6.2 (χρήση στήλης HPLC ανιοανταλλαγής)

7.3.2 Εκτιμώμενη εβδομαδιαία πρόσληψη

Διεθνείς οργανισμοί ελέγχου και διασφάλισης ποιότητας τροφίμων όπως η U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), ο World Health Organization (WHO) και η European Food Safety Authority (EFSA) δίνουν κατευθυντήριες γραμμές για την εξασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων αναφέροντας τα ανώτερα επιτρεπτά όρια τοξικότητας των μετάλλων όπως και τα ανώτερα επιτρεπτά όρια εβδομαδιαίας πρόσληψης [110,111].

Στην παρούσα έρευνα, υπολογίστηκε η εκτιμώμενη εβδομαδιαία πρόσληψη ανά γεύμα (Estimated Weekly Intake per meal size, EWIm) για τα στοιχεία Pb, Hg, Cd και iAs και συγκρίθηκε με τις τιμές των προσωρινών ανεκτών ορίων εβδομαδιαίας πρόσληψης (Provisional Tolerable Weekly Intake) (PTWI, μg/kg bw per week) όπως δίνονται από τη Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA 2011a, 2011b).

Η εκτιμώμενη εβδομαδιαία πρόσληψη ανά γεύμα (EWIm) υπολογίσθηκε για ενήλικα σωματικού βάρους 70 kg, ο οποίος καταναλώνει 100 g γαρίδων γεύματος, σύμφωνα με την εξίσωση του Copat el al. (2012) [214]:

EWIm = ποσότητα γεύματος (g) × συγκέντρωση στοιχείων (mg/kg ww) × 7 ημέρες/σωματικό βάρος (kg)

Στον πίνακα 7-2 φαίνεται ότι οι διεθνείς οργανισμοί JECFA και EFSA, έχουν αποσύρει την τιμή της PTWI για τον Pb καθώς δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα η ανώτερη επιτρεπτή πρόσληψη (no no-effect level identified) [111]. Εντούτοις, κρίθηκε ενδιαφέρον να υπολογιστεί η EWIm στους μύες των συγκεκριμένων ειδών γαρίδων, *P. longirostris* και *P. borealis*. Η EWIm για το Cd υπολογίστηκε πολύ χαμηλότερη από την προτεινόμενη τιμή PTWI η οποία είναι ίση με 6.25 μg/kg bw ανά εβδομάδα. Για την περίπτωση του Hg η EFSA (2012a) θεωρεί ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση Hg στα θαλασσινά είναι υπό μορφή μεθυλυδράργυρου (MeHg) [215] και γι'αυτό δίνει μια τιμή ανεκτών ορίων εβδομαδιαίας πρόσληψης (Tolerable Weekly Intake, TWI) μεθυλυδραργύρου ίση με 1.3 μg/kg bw ανά εβδομάδα. Στην παρούσα εργασία, θεωρήθηκε ότι όλη η συγκέντρωση του Hg που προσδιορίστηκε είναι υπό μορφή MeHg και γι'αυτό η υπολογιζόμενη τιμή EWIm των μυών των γαρίδων συγκρίθηκε με την τιμή 1.3. Από τον πίνακα φαίνεται ότι η υπολογίζομενη EWIm των μυών και των δύο ειδών ήταν πολύ χαμηλότερη από την προτεινόμενη τιμή (0.97 και 0.20 στις *P. longirostris* και *P. borealis* αντίστοιχα). Τέλος πρέπει να τονισθεί ότι οι διεθνείς οργανισμοί δεν δίνουν ανώτερη τιμή PTWI για το ολικό αρσενικό (tAs). Αρχικά είχε δοθεί μια τιμή για το ανόργανο αρσενικό (iAs), η οποία αποσύρθηκε και αυτή από την JECFA (2011a) και αντικαταστάθηκε από ένα όριο αναφοράς χαμηλότερης δόσης εμπιστοσύνης (Benchmark Dose Lower Confidence Limit, $BMDL_{0.5.}$) ίσο με 3 μg/kg bw ανά ημέρα (=21 μg/kg bw ανά εβδομάδα). Παρατηρώντας τον πίνακα 7-2 βλέπουμε ότι δεν δίνεται κάποια τιμή εκτιμώμενης εβδομαδιαίας πρόσληψης ανά γεύμα γαρίδων για το iAs, καθώς δεν υπολογίστηκε (not calculated), διότι η συγκέντρωση του iAs των μυών βρέθηκε χαμηλότερη από τα όρια ανίχνευσης του οργάνου.

Πίνακας 7-2: Εκτιμώμενη εβδομαδιαία πρόσληψη ανά γεύμα (Estimated Weekly Intake per meal size, EWIm) ενηλίκων συγκρινόμενη με τη δυνητικά επιτρεπτή έκθεση (tolerable exposure) (JECFA 2011a, 2011b; EFSA 2012a) [110,111,215]

Στοιχεία	Τύπος	Τιμές	EWIm για ενήλικες (μύες *P. longirostris*)	EWIm για ενήλικες (μύες *P. borealis*)
Pb	**PTWI**	withdrawn	0.12	0.05
Cd	**PTWI**	6.25	0.12	1.29
Hg	**TWI**	1.3	0.97	0.20
iAs	**$BMDL_{0.5}$**	21	n.c.	n.c.

- n.c: not calculated (δεν υπολογίστηκε)

7.3.3 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων του ολικού λίπους (TL) με χρήση GC-FID

Το ολικό λίπος (total lipids, TL) των μυών και των κεφαλοθωράκων των *P. longirostris* βρέθηκε 1.05±0.04 και 5.00±0.15%, αντιστοίχως και των *P. borealis* 0.98±0.06 και 4.98± 0.05%, αντιστοίχως. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα για το βρώσιμο τμήμα των ειδών *Penaeus semisulcatus, Marsupenaeus japonicus, P. longirostris* και *Metapenaeus monoceros* [187]. Όπως φαίνεται, οι κεφαλοθώρακες περιείχαν υψηλότερα ποσοστά λίπους σε σύγκριση με τους μύες, καθώς οι κεφαλοθώρακες περιείχαν το ηπατοπάγκρεας. Είναι γνωστό, ότι στο ηπατοπάγκρεας λαμβάνουν χώρα πολλές βιοχημικές αντιδράσεις με κύρια την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και γι'αυτό παρατηρούνται τα υψηλά επίπεδα λίπους στους κεφαλοθώρακες [177]. Στις γαρίδες *M. kerathurus* το ποσοστό του ολικού λίπους των μυών (1.30%) βρέθηκε παρόμοιο με αυτό των υπό μελέτη γαρίδων, αλλά το ποσοστό λίπους των κεφαλοθωράκων (2.40%) βρέθηκε αρκετά χαμηλότερο από τα ποσοστά των υπό μελέτη γαρίδων [82].

Τα αποτελέσματα των λιπαρών οξέων του TL που προσδιορίστηκαν τόσο στους μύες όσο και στους κεφαλοθώρακες των δύο ειδών παρατίθενται στον πίνακα 7-3 που ακολουθεί. Το σχήμα 7-4 δείχνει το χρωματογράφημα των λιπαρών οξέων από τους μύες των μεσογειακών γαρίδων. Ο προσδιορισμός των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε με GC-FID ανάλυση ύστερα από trans-εστεροποίηση όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.7.5. Σύμφωνα με τον πίνακα 7-3, παρατηρήθηκαν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των λιπαρών οξέων των υπό μελέτη γαρίδων *P. longirostris* και *P. borealis*. Αξιοσημείωτο ήταν ότι οι σημαντικότερες διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαφορετικών ιστών, μύες-κεφαλοθώρακες και όχι τόσο μεταξύ των ιδίων ιστών των δύο γαρίδων, όπως παρατηρήσαμε και στο κεφάλαιο 6. Συνολικά προσδιορίστηκαν παραπάνω από 25 διαφορετικά λιπαρά οξέα σε όλα τα δείγματα.

Από την ομάδα των κορεσμένων λιπαρών οξέων (Saturated Fatty Acids, SFA) το C16:0 (παλμιτικό οξύ) βρέθηκε ως το κύριο SFA, τόσο στο λίπος των μυών όσο και των κεφαλοθωράκων σε ποσοστά που κυμαίνονταν από 9.38 έως 17.02% των TFA. Το ποσοστό του C16:0 στο λίπος των μυών των υπό μελέτη μεσογειακών γαρίδων ήταν μικρότερο από το αντίστοιχο ποσοστό (21.16% TFA) [84] που αναφέρει η Yerlikaya και η ομάδα της (2013), καθώς και του Oksuz και της ομάδας του (2009)

(20.27% TFA) για το ίδιο είδος γαρίδας [116]. Αντιθέτως, οι Rosa και Nunes (2003) αναφέρουν παρόμοια ποσοστά (17.9% TFA για την περίοδο του καλοκαιριού και 18% TFA του χειμώνα) για τους μύες των *P. longirostris* [76]. Το ποσοστό του C16:0 στο λίπος των μυών των υπό μελέτη *P. borealis* ήταν παρόμοιο με αυτό που προσδιόρισε η Heu και η ομάδα της (2003) [216].

Το C18:0 (στεατικό οξύ) βρέθηκε ως το δεύτερο κυρίαρχο οξύ (>4%) στους ιστούς των μεσογειακών γαρίδων, ακολουθούμενο από το C14:0 (μυριστικό οξύ). Το λίπος των μυών και των κεφαλοθωράκων των γαρίδων Βόρειας θάλασσας, είχε διαφορετικό προφίλ λιπαρών οξέων. Το C14:0 βρέθηκε σε υψηλότερο ποσοστό από το C18:0.

Όσο αφορά τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Monounsaturated Fatty Acids, MUFA) κυρίαρχο λιπαρό οξύ ήταν το C18:1 ω-9 (ελαϊκό οξύ) σε ποσοστά 11.44-14.59% των TFA και στα δυο είδη γαρίδων μυών και κεφαλοθωράκων Το C18:1 ω-9 ως κύριο μονοακόρεστο λιπαρό οξύ, έχει προσδιορισθεί στο βρώσιμο τμήμα άλλων ειδών γαρίδων όπως στις *A. foliacea* (19.95- 28.34% TFA) [75], στις *P. monodon,* στις *P. vannamei* (9.94 και 11.4% TFA αντίστοιχα) [79]. Σε μικρότερα ποσοστά προσδιορίστηκαν στους ιστούς των δυο ειδών γαρίδων, τα C18:1ω-7 και C16:1ω-9. Ενδιαφέρον παρουσίασαν τα υψηλά επίπεδα των C20:1ω-11 και C22:1ω-11 στους κεφαλοθώρακες των γαρίδων *P. borealis*. Υψηλά ποσοστά των συγκεκριμένων λιπαρών οξέων αναφέρουν και οι Olsen, Ervik και Grahl-Nielsen (2012) για τις *P. borealis* [217]. Σύμφωνα με την έρευνά τους, τα ποσοστά των λιπαρών οξέων, συνδέονταν άμεσα με τη διατροφή των γαρίδων, δεδομένου ότι οι συγκεκριμένες γαρίδες κατανάλωναν τροφές πλούσιες σε C20:1 ω-11 και C22:1 ω-11 [217].

Από τον πίνακα 7-3 φαίνεται ότι και στους ιστούς των *P. longirostris* και *P. borealis*, βρέθηκαν υψηλά ποσοστά των ω-3 λιπαρών οξέων. Το EPA (C20:5ω-3) και το DHA (C22:6 ω-3) ήταν τα κυρίαρχα PUFA σε όλους τους ιστούς, αποτέλεσμα αναμενόμενο [75,76,84,187]. Τόσο το EPA, όσο και το DHA είναι γνωστά για τις αντιθρομβωτικές τους ικανότητες αλλά και για το ότι αποτελούν τα κυρίαρχα συστατικά των κυττάρων του εγκεφάλου, παίζοντας καταλυτικό ρόλο στη λειτουργία του ανθρώπινου νευρικού συστήματος [189,190]. Στη συγκεκριμένη μελέτη, το ποσοστό του EPA στους μύες των *P. borealis* ήταν σχεδόν διπλάσιο, από αυτό των μεσογειακών, ενώ στους κεφαλοθώρακες ήταν ελαφρώς υψηλότερο.

Παρατηρώντας τα σύνολα των λιπαρών οξέων, βρέθηκε ότι τα SFA ήταν σε μικρότερα ποσοστά (14.58-25.02%) από αυτά των MUFA (25.31-52.19%) και PUFA (28.43-

46.01%). Συγκεκριμένα στις μεσογειακές γαρίδες και στους δύο ιστούς τα σύνολα των λιπαρών οξέων ακολούθησαν την εξής φθίνουσα σειρά: PUFA>MUFA>SFA. Στις γαρίδες από τη Βόρεια θάλασσα, στους μύες προσδιορίστηκαν με τη σειρά PUFA>MUFA>SFA, ενώ στους κεφαλοθώρακες MUFA>PUFA>SFA.

Μελετώντας τα Σω:3, Σω:6 και την αναλογία ω:3/ω:6, διαπιστώθηκε ότι το λίπος των μυών των *P. borealis* περιείχαν μεγαλύτερο ποσοστό Σω:3 (42.84% TFA) σε σύγκριση με το αντίστοιχο των μυών των *P. longirostris* (34.79% TFA), ενώ στο λίπος των κεφαλοθωράκων, τα ποσοστά των Σω:3 ήταν παρόμοια (25.63 και 26.12% TFA αντιστοίχως). Σε αντίθεση με τα ποσοστά των Σω:3 που βρέθηκαν αρκετά υψηλά, τα ποσοστά των Σω-6 και στα δύο είδη γαρίδων βρέθηκαν αρκετά χαμηλά (<5.7%). Συνεπώς η αναλογία ω:3/ω:6 βρέθηκε 6.26 και 17.2 στο λίπος των μυών των *P. longirostris* και *P. borealis* αντίστοιχα, ενώ στο λίπος των κεφαλοθωράκων 4.59 και 12.88, αντίστοιχα. Συμπερασματικά, σε όλους τους ιστούς, η αναλογία ω:3/ω:6 βρέθηκε αρκετά υψηλότερη από την προτεινόμενη αναλογία 4:1 για μια ισορροπημένη δίαιτα [190].

7.3.4 Υπολογισμός AI και TI

Θεωρήθηκε χρήσιμο να υπολογιστούν και σε αυτή τη μελέτη, οι διατροφικοί δείκτες AI και TI των *P. longirostris* και *P. borealis* ώστε να αξιολογηθεί η ικανότητα των εν λόγω ειδών στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου.

Οι δείκτες AI και TI υπολογίστηκαν σύμφωνα τους Ulbricht and Southgate (1991) [192].

AI = [12:0+ (4×14:0)+16:0]/(ω-3 PUFA+ω-6 PUFA+MUFA)

TI = (14:0+16:0+18:0)/(0.5 MUFA+0.5 ω-6 PUFA+3 ω-3 PUFA+ω-3 PUFA/ω-6 PUFA)

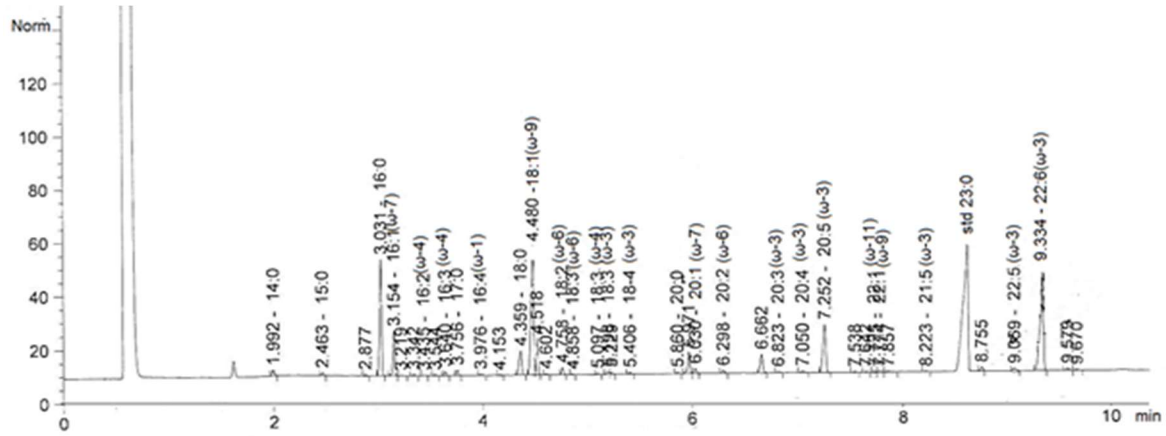
Από τον πίνακα (πίνακας 7-3) φαίνεται ότι, οι δείκτες AI και TI ήταν χαμηλοί σε όλους τους ιστούς, σε συμφωνία με την έρευνα των Rosa και Nunes (2003). Συγκεκριμένα μελετώντας το βρώσιμο τμήμα των γαρίδων *A. antennatus* και *P. longirostris*, αναφέρουν ότι ο δείκτης AI κυμαίνονταν από 0.24 έως 0.31 και ο δείκτης TI από 0.18 έως 0.21 αντίστοιχα [76]. Παρόμοιες τιμές προσδιόρισε και ο Bono με την ομάδα του (2012), στους μύες των γαρίδων *A. foliacea* [75].

Πίνακας 7-3: Προφίλ λιπαρών οξέων (%) και διατροφικοί δείκτες μυών και κεφαλοθωράκων ολικού λίπους των *P. longirostis* και *P.borealis*

Λιπαρά οξέα	***P.longirostris* μύες**	***P. borealis* μύες**	***P. longirostis* κεφαλοθώρακες**	***P. borealis* κεφαλοθώρακες**
C14:0	0.91±0.00a	2.24± 0.01b	1.78± 0.02c	2.97± 0.02d
C14:1ω-5	0.13± 0.06a	0.09± 0.01b	0.28± 0.01c	0.23± 0.03d
C15:0	0.74± 0.06a	0.41± 0.02a	0.81± 0.02a	0.29± 0.01a
C16:0	17.02± 0.03a	16.41± 0.01b	15.33± 0.01c	9.38± 0.04d
C16:1ω-7	5.58± 0.00a	6.04± 0.00b	6.19± 0.06c	10.24± 0.00d
C16:2ω-4	0.16± 0.01a	0.13± 0.02b	0.54± 0.02c	0.35± 0.01d
C16:3ω-4	1.25± 0.02a	0.36± 0.01b	0.95± 0.02c	0.16± 0.01d
C17:0	0.93± 0.01a	0.24± 0.01b	0.83± 0.02c	0.25± 0.03d
C16:4ω-1	0.45± 0.02a	0.14± 0.01b	0.54± 0.02c	0.23± 0.00d
C18:0	5.21± 0.01a	1.58 ±0.00b	4.40± 0.01c	1.59± 0.01d
C18:1ω-9	14.23± 0.01a	11.44± 0.01b	14.59± 0.04c	11.68± 0.09d
C18:1ω-7	3.47± 0.01a	6.25 ±0.00b	4.53± 0.14c	4.65± 0.08c
C18:2ω-6	1.17± 0.01a	1.15 ±0.04b	1.15± 0.01c	1.00± 0.04d
C18:2ω-4	n.d.	n.d.	0.1± 0.01	n.d.
C18:3ω-6	0.06± 0.02a	0.04 ±0.03b	0.12± 0.02c	0.07± 0.02d
C18:3ω-4	0.27± 0.01a	0.05 ±0.01b	0.37± 0.01c	0.07± 0.01d
C18:3ω-3	0.38± 0.01a	0.48 ±0.02b	0.05± 0.02c	0.51± 0.03d
C18:4ω-3	0.30± 0.03a	0.56 ±0.02b	0.38± 0.01c	1.20± 0.02d
C20:0	0.21± 0.02a	0.05 ±0.02b	0.48± 0.01c	0.10± 0.01d
C20:1ω-11	**0.89± 0.00a**	**3.44± 0.00b**	**3.41± 0.07c**	**9.92± 0.13d**
C20:1ω-7	0.45± 0.01a	0.53± 0.00b	1.47± 0.02c	2.02± 0.00d
C20:2ω-6	n.d.	n.d.	0.03± 0.2c	0.02± 0.01d
C20:3ω-6	n.d.	n.d.	0.26± 0.02	n.d.
C20:4ω-6	4.33± 0.01a	1.30± 0.01b	4.13± 0.04c	0.90± 0.01d
C20:3ω-3	0.19± 0.01a	n.d.	0.31± 0.02c	0.22± 0.01d
C20:4ω-3	0.28± 0.01a	0.33± 0.01b	0.32± 0.01c	0.38± 0.01d
C20:5ω-3 (EPA)	12.47± 0.02a	22.30± 0.00b	8.72± 0.12c	12.26± 0.03d
C22:1ω-11	**0.09± 0.04a**	**1.55 ±0.01b**	**0.33± 0.04c**	**10.84± 0.09d**
C21:5ω-3	0.15± 0.01a	0.25± 0.01b	0.17± 0.01c	0.25± 0.01d
C22:5ω-3	1.09± 0.02a	0.62± 0.00b	1.02± 0.01c	0.59± 0.02d
C22:6ω-3 (DHA)	19.93± 0.02a	18.30±0.01b	14.70± 0.23c	10.22±0.01d

C24:1ω-9 cis	0.30± 0.01a	0.22±0.01b	0.42± 0.03c	0.48±0.01d
Σω:0 (SFA)	25.02	20.93	23.63	14.58
Σω:1 (MUFA)	25.31	29.80	31.48	52.19
Σω:n (PUFA)	42.48	46.01	34.14	28.43
Σω:3	34.79	42.84	26.12	25.63
Σω:6	5.56	2.49	5.69	1.99
ω:3/ω:6	6.26	17.2	4.59	12.88
EPA/DHA	0.63	1.22	0.59	1.20
AI	0.31	0.34	0.35	0.27
TI	0.18	0.12	0.21	0.12

- Στα αποτελέσματα δίνεται ο μέσος όρος ± S.D. (N=6). Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς (*P*<0.05) για στάθμη εμπιστοσύνης 95%



Σχήμα 7-4: GC-FID χρωματογράφημα λιπαρών οξέων κεφαλοθωράκων *P. longirostris* (μεσογειακές γαρίδες)

7.4 Συμπεράσματα

Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν τα στοιχεία Pb, Hg, Cd και As και το προφίλ των λιπαρών οξέων του λίπους των μυών και των κεφαλοθωράκων των *P. longirostris* (μεσογειακές γαρίδες) και *P. borealis* (γαρίδες Βόρειας θάλασσας). Παρατηρήθηκε ότι οι μύες και οι κεφαλοθώρακες των δύο ειδών γαρίδων περιείχαν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις Pb και Hg. Το Cd στις *P. borealis* βρέθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σύγκριση με των *P. longirostris*, κυρίως στους κεφαλοθώρακες και αυτό οφείλεται πιθανόν σε ένα φαινόμενο που χαρακτηρίζεται ως “ανωμαλία-Cd” το οποίο διαπιστώθηκε να λαμβάνει χώρα στους πόλους της γης. Οι κεφαλοθώρακες και στα δύο είδη είχαν υψηλότερες τιμές Pb, Hg και Cd από τους μύες.

Σε όλα τα δείγματα όμως, οι συγκεντρώσεις του Pb, Hg και Cd βρέθηκαν χαμηλότερες από τα ανώτερα επιτρεπτά όρια (ευρωπαϊκή νομοθεσία 1881/2006).

Το As προσδιορίστηκε σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις σε όλους τους ιστούς. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με έρευνες σε άλλα θαλάσσια είδη. Η κύρια μορφή As που προσδιορίστηκε στις υπό μελέτη γαρίδες, ήταν η οργανική μορφή As (org-As), η οποία είναι γνωστή για την ελάχιστη ή καθόλου τοξική της δράση, ενώ η ανόργανη μορφή As (iAs), η οποία είναι τοξική, προσδιορίστηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα και μόνο στους κεφαλοθώρακες.

Το ποσοστό του ολικού λίπους των μυών και των δύο ειδών προσδιορίστηκε ~1% TL, ενώ των κεφαλοθωράκων και στα δύο είδη βρέθηκε ~5% TL. Στις μεσογειακές γαρίδες, τα PUFA ήταν τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα στο ολικό λίπος μυών και κεφαλοθωράκων, ενώ στις γαρίδες *P. borealis* το λίπος των μυών ήταν πλούσιο σε PUFA ενώ των κεφαλοθωράκων σε MUFA. Τα SFA βρέθηκαν σε μικρότερα ποσοστά. Κύρια λιπαρά οξέα ήταν τα EPA, DHA, C18:1 ω-9 (ελαϊκό) και C16:0 (παλμιτικό) σε όλα τα δείγματα.

Εν κατακλείδι, οι χαμηλές συγκεντρώσεις των στοιχείων Pb, Hg, Cd και As και οι χαμηλές τιμές των διατροφικών δεικτών AI και TI σε συνδυασμό με τα υψηλά επίπεδα των ω-3 λιπαρών οξέων, όπως προσδιορίστηκαν στο παρόν κεφάλαιο, καθιστούν τους μεν μύες των *P. longirostris* και *P. borealis* κατάλληλους προς κατανάλωση, τους δε κεφαλοθώρακες, κατάλληλους για την παραλαβή των βιοδραστικών λιπιδικών συστατικών τους για την παρασκευή διατροφικών συμπληρωμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ Pb, Hg, Cd, As και Se ΣΤΙΣ ΓΑΡΙΔΕΣ *A. FOLIACEA* (ΚΟΚΚΙΝΕΣ ΓΑΡΙΔΕΣ). ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΡΣΕΝΟΛΙΠΙΔΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ HPLC-ICPMS

8.1 Εισαγωγή

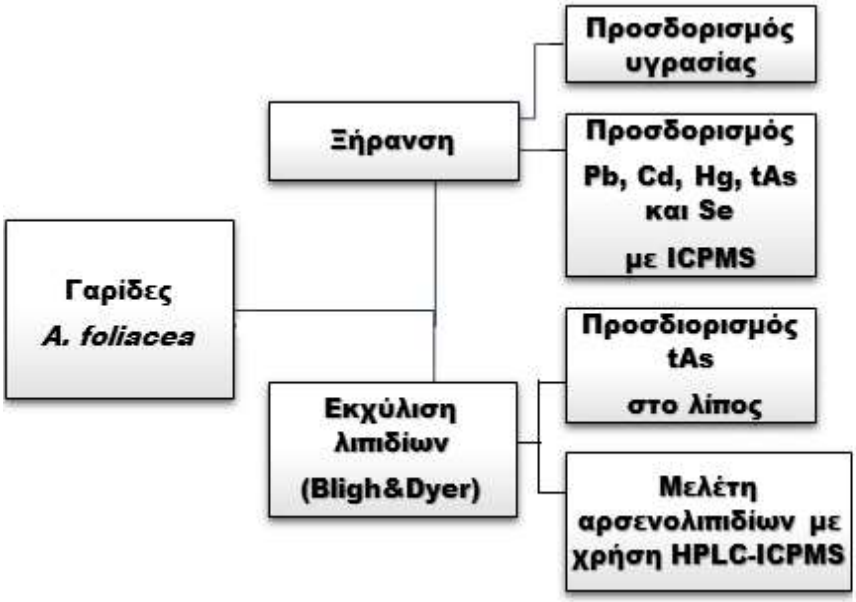
Στο κεφάλαιο αυτό μελετώνται οι κόκκινες γαρίδες βαθέων υδάτων *(A. foliacea)* α) ως προς τη συγκέντρωση του μολύβδου (Pb), υδραργύρου (Hg), καδμίου (Cd), ολικού αρσενικού (tAs) (δυνητικά τοξικά στοιχεία) και σεληνίου (Se) (απαραίτητο ιχνοστοιχείο) και β) ως προς τα αρσενολιπίδια. Ο προσδιορισμός των εν λόγω στοιχείων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS), ενώ ο προσδιορισμός των αρσενολιπιδίων πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό τεχνικών χημικής ανάλυσης, της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography) με την ICPMS (HPLC-ICPMS).

Καθώς τα επίπεδα των τοξικών στοιχείων αυξάνονται συνεχώς στο υδάτινο περιβάλλον, λόγω ανθρώπινης παρέμβασης, οι *A. foliacea,* θα μπορούσαν να θεωρηθούν κατάλληλοι βιοδείκτες για τη μέτρηση της ρύπανσης της θάλασσας στην ευρύτερη περιοχή της Κυλλήνης.

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις του Pb, Hg, Cd, tAs και Se στις γαρίδες *A. foliacea,* διότι το συγκεκριμένο είδος αποτελεί τρόφιμο ευρείας κατανάλωσης. Επόμενος στόχος ήταν να υπολογιστεί η εκτιμώμενη εβδομαδιαία πρόσληψη τους ανά γεύμα (EWIm) και να συγκριθεί με τις συστάσεις των JECFA και EFSA. Επίσης προσδιορίσθηκε η συγκέντρωση του Se, επειδή είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο ζωτικής σημασίας για την ισορροπία του ανθρώπινου οργανισμού [94] και πιθανά έχει ανταγωνιστική δράση έναντι της τοξικότητας του υδραργύρου (Hg) [218]. Ως εκ τούτου, ο υπολογισμός του μοριακού λόγου Se:Hg παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση του κινδύνου που συνδέεται με την κατανάλωση γαρίδων [219,220]. Τέλος, στο παρόν κεφάλαιο, μεγάλη έμφαση δόθηκε στην ανάλυση των αρσενολιπιδίων, τα οποία αποτελούν μια τάξη λιπιδικών ενώσεων με As. Πραγματοποιήθηκε μια σειρά προσπαθειών για την ειδοταυτοποίηση αυτών των ενώσεων. Εκτενής περιγραφή των

αρσενολιπιδίων και γενικά των δομών του αρσενικού γίνεται στο κεφάλαιο 4. Όπως ήδη αναφέραμε, η πολύπλοκη φύση και δράση του As στο υδάτινο περιβάλλον, προσελκύει τα τελευταία χρόνια, το επιστημονικό ενδιαφέρον.

Παρακάτω παρατίθεται συνοπτικό διάγραμμα (σχήμα 8-1) της πειραματικής πορείας της μελέτης αυτού του κεφαλαίου.



Σχήμα 8-1: Πειραματική πορεία προσδιορισμών στοιχείων και αρσενολιπιδίων γαρίδων *A. foliacea*

8.2 Πειραματική πορεία

8.2.1 Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν υψηλού βαθμού καθαρότητας. Συμπυκνωμένο HNO_3 (Merck, Darmstadt, Γερμανίας) και 30% w/w H_2O_2 (Merck, Darmstadt, Γερμανία) χρησιμοποιήθηκαν για την υγρή χώνευση και την εκχύλιση των στοιχείων Pb, Hg, Cd, tAs και Se. Για την παρασκευή πρότυπων καμπυλών χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα από Pb, Hg, Cd, tAs και Se (Plasma CAL, SCP Science, France). Το νερό που χρησιμοποιήθηκε σε όλη την αναλυτική πορεία ήταν υπερκάθαρο. Το tuning solution λιθίου (Li) και ύττριου (Y) (ICP-MS stock solution, Agilent Technologies) χρησιμοποιούνταν για την καθημερινή βελτιστοποίηση του οργάνου ICP-MS. Το χλωροφόρμιο και η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση του λίπους ήταν της Merck (Darmstadt, Germany). Το *n*-επτάνιο, μυρμηκικό οξύ (99% w/w, HPLC grade), ίνδιο (ICP standard), που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των αρσενολιπιδίων, ήταν όλα της Merck

(Darmstadt, Γερμανίας). Τέλος, το οξείδιο της τριφαινυλοαρσίνης (triphenylarsenic oxide, Ph_3AsO) αγοράστηκε από την Strem Chemicals Inc. (NewburyPort, MA, USA).

8.2.2 Στάδια πειραματικής πορείας

Τα στάδια που έλαβαν χώρα στο παρόν κεφάλαιο είναι τα εξής:

- **Δειγματοληψία**
- **Ξήρανση δείγματος**
- **Προσδιορισμός υγρασίας**
- **Προσδιορισμός Pb, Hg, Cd, tAs και Se με ICP-MS**
- **Εκχύλιση ολικού λίπους**
- **Προσδιορισμός tAs στο λίπος**
- **Μελέτη αρσενολιπιδίων με HPLC-ICPMS**
- **Υπολογισμός Εκτιμώμενης εβδομαδιαίας πρόσληψης**

8.2.3 Στατιστική ανάλυση

Οι μετρήσεις ελήφθησαν εις τριπλούν για δείγματα αλιευμένα Σεπτέμβριο-Νοέμβριο και δύο συνεχόμενα έτη (N=6). Υπολογίστηκαν ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των τιμών αυτών (standard deviation, SD). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με One-Way ANOVA Test. Στατιστικά αποτελέσματα χαμηλότερα από 0.05 ($P<0.05$), θεωρήθηκαν σημαντικά. Όλοι οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με πακέτο SPSS (IBM SPSS Statistics 19.0, Chicago, IL, USA) στατιστικό λογισμικό για Windows.

8.3 Αποτελέσματα

8.3.1 Ανάλυση των στοιχείων Pb, Hg, Cd και Se

Η συγκέντρωση του μολύβδου (Pb), του υδραργύρου (Hg), του καδμίου (Cd) και του σεληνίου (Se) προσδιορίστηκε σε μύες και κεφαλοθώρακες των κόκκινων γαρίδων. Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών αυτών δίνονται στον πίνακα 8-1. Από τον πίνακα φαίνεται ότι οι κεφαλοθώρακες (όργανο/στόχος βιοσυσσώρευσης και αποτοξίνωσης μετάλλων λόγω ηπατοπαγκρέατος) περιείχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτών των μετάλλων συγκριτικά με τους μύες, όπως παρατηρήθηκε και στον πίνακα 7-1 για τις γαρίδες *P. longirostris* και *P. borealis*, αλλά και σε παρόμοιες έρευνες των Tapia et al. (2012) [209] και Olgunoğlu et al. (2015) [208]. Εξαίρεση αποτέλεσε μόνο η συγκέντρωση υδραργύρου, όπου στους μύες βρέθηκε διπλάσια από αυτή των κεφαλοθωράκων.

Πίνακας 8-1: Συγκέντρωση (mg/kg νωπού ιστού, wet weight, ww) στοιχείων σε μύες και κεφαλοθώρακες των *A. foliacea*

Στοιχεία	*A. foliacea*	
	μύες	κεφαλοθώρακες
Pb	0.073±0.015a	0.134±0.062b
Hg	0.490±0.048a	0.209±0.030b
Cd	0.233± 0.021a	0.635±0.016b
Se	0.471±0.036a	1.679±0.070b

- Στα αποτελέσματα δίνεται ο μέσος όρος ± SD (N=6). Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς (P<0.05) για κάθε στάθμη εμπιστοσύνης 95%

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις των μετάλλων Pb, Cd and Hg στους μύες και κεφαλοθώρακες των *P. longirostris* (πίνακας 7-1) με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των *A. foliacea* (πίνακας 8-1), παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις στον πίνακα 7-1 ήταν αρκετά χαμηλότερες σε σύγκριση με αυτές του πίνακα 8-1. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι στους μύες των *P. longirostris* οι συγκεντρώσεις των μετάλλων ήταν Pb=0.012, Hg=0.097 και Cd=0.012 mg/kg ww και στους κεφαλοθώρακες Pb=0.090, Hg=0.114 και Cd=0.120 mg/kg ww (πίνακας 7-1). Τα δύο μεσογειακά είδη γαρίδων, αλιεύτηκαν από την ίδια περιοχή, την ίδια χρονική περίοδο και στα ίδια βάθη. Η υψηλότερη συγκέντρωση των μετάλλων στις *A. foliacea* πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των μετάλλων σχετίζονται με το μέγεθος του οργανισμού. Όσο μεγαλύτερο είναι το άτομο-οργανισμός, τόσο υψηλότερα επίπεδα μετάλλων απορροφά [221]. Το μέγεθος των *A. foliacea* (σώμα&κεφαλοθώρακας) είναι πολύ μεγαλύτερο από άλλα είδη γαρίδων και σχεδόν διπλάσιο από αυτό των *P. longirostris* (πίνακας 6-1).

Καθώς το χρώμα είναι βασικό κριτήριο επιλογής των γαρίδων από τους καταναλωτές, σκόπιμο είναι να αναφερθεί μία έρευνα που συσχετίζει τη συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων με αυτή της ασταξανθίνης (καροτενοειδές). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας, της A. Martinez et al. (2012), τα βαρέα μετάλλα (Pb, Hg, Cd και Cu) δημιουργούν σύμπλοκα με την ασταξανθίνη. Αυτά τα σύμπλοκα επηρεάζουν το χρώμα των γαρίδων προσδίδοντας τους πιο έντονο κόκκινο χρώμα (χρήση υπολογιστικής χημείας) [222, 223].

Η ομάδα αυτή, προχώρησε την έρευνά της και σε πειραματικό στάδιο το 2014 μελετώντας το χρώμα των γαρίδων *Litopenaeus vannamei* σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του Cu και της ασταξανθίνης. Στη μελέτη αυτή,

απέδειξαν ότι όσο υψηλότερη ήταν η συγκέντρωση του Cu, τόσο πιο έντονο κόκκινο χρώμα εμφάνιζαν οι γαρίδες *Litopenaeus vannamei.* Ο Cu σχημάτιζε σύμπλοκα με την ασταξανθίνη δίνοντας έντονο κόκκινο χρώμα [224]. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, α) όντως τα επίπεδα της ασταξανθίνης των *A. foliacea* ήταν υψηλά (πίνακας 6-10), β) όντως οι *A. foliacea* είχαν ένα έντονο, βαθύ, κόκκινο χρώμα και γ) πράγματι οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων ήταν υψηλές (πίνακας 8-1). Συνεπώς λαμβάνοντας υπόψιν τις δύο έρευνες (συνδυασμός υπολογιστικής χημείας και αναλυτικής χημείας), θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τέτοιο φαινόμενο λαμβάνει χώρα και στις υπό μελέτη *A. foliacea* δηλ. σχηματισμός συμπλόκων ασταξανθίνης με Pb, Hg και Cd. Συνεπώς θα μπορούσαμε να αιτιολογήσουμε/δικαιολογήσουμε το τόσο έντονο, βαθύ χρώμα στο συγκεκριμένο είδος. Όμως σε αυτό το σημείο, γεννάται το ερώτημα αν τελικά το εντονότερο χρώμα στις γαρίδες είναι και υγιεινό, ερώτημα το οποίο θέτει και η A. Martínez et al. (2014) [224], κάτι που χρίζει περαιτέρω έρευνα.

Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις Pb και Hg των *A. foliacea* με τα ανώτατα όρια που δίνονται από την ευρωπαϊκή νομοθεσία για καρκινοειδή (0.5 mg/kg ww) [114], βρέθηκαν χαμηλότερα. Το Cd όμως, ενώ στους μύες προσδιορίστηκε χαμηλότερο από τα ανώτατα όρια (0.5 mg kg^{-1} w.w. για καρκινοειδή) [114], στους κεφαλοθώρακες βρέθηκε υψηλότερο.

Η συγκέντρωση Se που προσδιορίστηκε στις υπό μελέτη *A. foliacea* (0.471 και 1.679 mg/kg ww στους μύες και κεφαλοθώρακες αντίστοιχα) έρχεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία. Αναλυτικά, στο βρώσιμο τμήμα των μεσογειακών γαρίδων *M. kerathurus* και *P. longirostris* οι συγκεντρώσεις Se που βρέθηκαν ήταν 0.257 και 0.509 mg/kg ww [225]. Μελέτες έχουν δείξει ότι το Se μπορεί να μειώσει τη βιοδιαθεσιμότητα του μεθυλυδραργύρου (MeHg), μπλοκάροντας το και μειώνοντας συνεπώς την τοξικότητά του [220]. Επειδή το Se μπορεί να περιορίσει την τοξικότητα του Hg, ο υπολογισμός του μοριακού λόγου (molar ratio) Se:Hg θεωρείται ως ένα βασικό κριτήριο αξιολόγησης των πραγματικών κινδύνων υγείας από την παρουσία του Hg. Ο λόγος αυτός (Se:Hg) προτείνεται μεγαλύτερος από 1:1 [225,226]. Υπολογίζοντας στην εν λόγω έρευνα τον μοριακό λόγο Se:Hg σε μύες και κεφαλοθώρακες το αποτέλεσμα βρέθηκε (Se:Hg) ίσο με 2.4:1 και 20:1 αντίστοιχα (μοριακή μάζα Se, molar mass=78.96 g/mol και μοριακή μάζα Hg, molar mass=200.59 g/mol), λόγοι υψηλότεροι έως και πολύ υψηλότεροι από τον προτεινόμενο (Se:Hg 1:1).

8.3.2 Ανάλυση ολικού αρσενικού (tAs)

Η μέση τιμή συγκέντρωσης του ολικού αρσενικού (total arsenic, tAs) εκφρασμένη σε mg/kg νωπού ιστού μυών και κεφαλοθωράκων γαρίδας και η μέση τιμή συγκέντρωσης ολικού αρσενικού στο λίπος, δηλ. η συγκέντρωση των αρσενολιπιδίων εκφρασμένη σε mg/kg λίπους δίνονται στον πίνακα 8-2. Σύμφωνα με τον πίνακα, υψηλές συγκεντρώσεις tAs περιέχονταν στις κόκκινες γαρίδες βαθέων υδάτων (>16mg/kg ww). Όπως ήδη έχουμε αναφέρει στο κεφάλαιο 4, η παρουσία του As στο θαλασσινό νερό προέρχεται κυρίως από ηφαιστειογενείς παράγοντες και λιγότερο από ανθρώπινες δραστηριότητες όπως φυτοφάρμακα και απόβλητα. Συνεπώς υψηλές συγκεντρώσεις αρσενικού σε θαλάσσιους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων και των γαρίδων είναι αναμενόμενες.

Συγκρίνοντας τη συγκέντρωση του tAs που προσδιορίστηκε στις *A. foliacea* με αυτή των ροζ γαρίδων βαθέων υδάτων (πίνακας 7-1), βρέθηκε ότι η συγκέντρωση του tAs στους μύες των *A. foliacea* ήταν σχεδόν η μισή από αυτή των *P. longirostris* και σχεδόν 4 φορές χαμηλότερη από αυτή των *P. borealis* (πίνακας 7-1). Η συγκέντρωση όμως του tAs που προσδιορίστηκε στους κεφαλοθώρακες των *A. foliacea* κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα με αυτά των *P. longirostris* και *P. borealis* (πίνακες 7-1 και 8-1).

Υψηλές συγκεντρώσεις tAs (~13mg/kg ww) αναφέρουν επίσης ο Larsen et al. (1997) για τις γαρίδες *Rimicaris exoculata* [227]. Σε αντίθεση όμως, ο Dökmeci και η ομάδα του (2014), μελετώντας τις γαρίδες *P. longirostris* βρήκαν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις tAs, οι οποίες κυμαίνονταν από 0.86 έως 9.93 mg As/kg ww [207]. Η περιοχή αλίευσης, το μέγεθος, η έκδυση και η διατροφή των γαρίδων είναι καταλυτικοί παράγοντες για τη βιοσυσσώρευση των στοιχείων στους θαλάσσιους οργανισμούς. Εξάλλου έχουν παρατηρηθεί διακυμάνσεις επιπέδων tAs όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών θαλάσσιων ειδών, αλλά και στο ίδιο το είδος [213].

8.3.3 Προσδιορισμός αρσενολιπιδίων

Η μελέτη των αρσενολιπιδίων παρουσιάζει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς η σχετική βιβλιογραφία είναι περιορισμένη. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, αρχικά πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του ολικού λίπους με τη μέθοδο Bligh-Dyer (1959) (υποκεφάλαιο 5.7.1). Το ολικό λίπος στους μύες υπολογίστηκε 0.74 g λίπους ανά 100 g γαρίδων και στους κεφαλοθώρακες 7.82 g λίπους ανά 100 g γαρίδων. Στη συνέχεια μετρήθηκε το ολικό αρσενικό (tAs) στο λίπος με χρήση ICP-MS (όπως περιγράφεται

στην παράγραφο 5.6.1). Από τον πίνακα 8-2 φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις του tAs στο λίπος μυών και κεφαλοθωράκων ήταν 8.310 και 7.890 mg As/kg λίπους, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των αρσενολιπιδίων βρέθηκε 0.0615 mg αρσενολιπιδίων ανά kg νωπού ιστού μυών και 0.6170 mg αρσενολιπιδίων ανά kg νωπού ιστού κεφαλοθωράκων. Το As των αρσενολιπιδίων αποτελεί το 0.4% περίπου του ολικού αρσενικού στους μύες και το 1.9% περίπου του ολικού αρσενικού στους κεφαλοθώρακες. Η συγκέντρωση των υδατοδιαλυτών ενώσεων As βρέθηκε 16.2385 mg ανά kg νωπού ιστού μυών και 32.082 mg ανά kg νωπού ιστού κεφαλοθωράκων (πίνακας 8-2), συνεπώς το ποσοστό των υδατοδιαλυτών ενώσεων As ήταν το 99.6% tAs στους μύες και το 98.1% tAs στους κεφαλοθώρακες των *A. foliacea.*

Από τον πίνακα 8-2 παρατηρείται ότι το λίπος των A. *foliacea* περιείχε σημαντική ποσότητα As, αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με άλλες έρευνες σε θαλάσσια είδη. Για παράδειγμα ο Julshamn και η ομάδα του (2004) προσδιόρισαν As στο λίπος από 4.6-16.0 mg As/kg ιχθυελαίου (commercial fish oil) [214]. Η Sele et al. (2014) σε έρευνά της, προσδιόρισε As στο μουρουνέλαιο (συκώτι μουρούνας-είδος μπακαλιάρου), το οποίο κυμαινόταν από 1.8 έως 16.4 mg As/kg και αποτελούσε το 3-50% tAs νωπού ιστού του συκωτιού μουρούνας [120].

Πίνακας 8-2: Συγκέντρωση ολικού αρσενικού (tAs), αρσενολιπιδίων και υδατοδιαλυτών ενώσεων σε μύες και κεφαλοθώρακες των *A. foliacea*

Μορφές Αρσενικού	***A. foliacea***	
	μύες	**κεφαλοθώρακες**
Ολικό As (mg/kg ww)	16.3±0.8a	32.7±1.1b
As Αρσενολιπιδίων (mg/kg λίπους)	8.310±0.054a	7.890±0.039b
As Αρσενολιπιδίων (mg/kg ww)	0.0615a	0.6170b
As Υδατοδιαλυτών ενώσεων (mg/kg ww)	16.2385a	32.0830b

- Στα αποτελέσματα δίνεται ο μέσος όρος ± SD (N=3). Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($P<0.05$) για κάθε στάθμη εμπιστοσύνης 95%

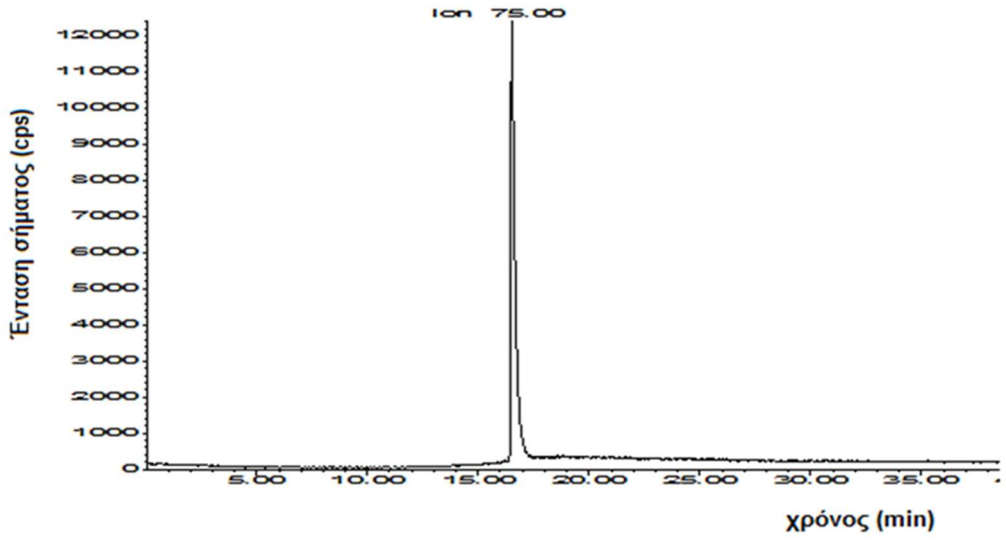
8.3.3.1 Ανάλυση αρσενολιπιδίων

Η HPLC αντίστροφης φάσης (reversed-phase, RP-HPLC) γενικά εφαρμόζεται για τον διαχωρισμό συστατικών λιπιδίων. Στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης όμως, είναι απαραίτητο οι οργανικοί διαλύτες να είναι αναμίξιμοι με το νερό. Επειδή όμως το λίπος δεν είναι υδατοδιαλυτό, πριν την ανάλυση χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης, χρησιμοποιούνται διαλύτες μη αναμίξιμοι μεταξύ τους όπως μεθανόλη-εξάνιο και συνεπώς απομονώνεται η υδατοδιαλυτή φάση (μεθανολική) για να επιτευχθεί η ανάλυση [124]. Έρευνες έχουν αποδείξει, ότι το λίπος ως επί το πλείστον περιέχει μη πολικές ενώσεις, όμως παρατηρήθηκε ότι στο μουρουνέλαιο και στο λίπος του καπελάνου (είδος ψαριού) το κλάσμα της μεθανόλης περιείχε πολλές ενώσεις As [124]. Για παράδειγμα στο μεθανολικό κλάσμα του μουρουνέλαιου προσδιορίστηκαν τουλάχιστον 15 ενώσεις αρσενολιπιδίων με χρήση χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης [124]. Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή για την ανάλυση των αρσενολιπιδίων χρησιμοποιήθηκε RP-HPLC-ICPMS και ως διαλύτες επτάνιο, μεθανόλη, νερό.

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις στήλες HPLC ώστε να επιλεχθεί η καταλληλότερη για τον διαχωρισμό των αρσενολιπιδίων:

- Atlantis dC18 (2.1x150, 3 μm), ροή 0.2 mL/min
- Zorbax eclipse XCB-C18 (2.1x100, 1.8 μm), ροή 0.18 mL/min.
- Waters acquity C18 (2.1x100mm, 1.7 μm), ροή 0.14 mL/min
- ACE C18 (150x2.1) ροή 0.1650 mL/min

Κατά την πορεία των πειραμάτων για την επιλογή της καταλληλότερης HPLC στήλης, χρησιμοποιούνταν το οξείδιο της τριφαινυλαρσίνης (Ph_3AsO) (80% H_2O και 20% MeOH). Μετά από κάθε δοκιμή στήλης HPLC, γινόταν σύγκριση των χρωματογραφημάτων (κορυφή και χρόνος έκλουσης Ph_3AsO), ώστε να αποφασιστεί ποια στήλη ήταν κατάλληλη για την ανάλυση των αρσενολιπιδίων. Κατάλληλες στήλες αποδείχθηκαν οι waters acquity (σχήμα 8-2) και ACE C18, όπου η πρώτη πραγματοποιούσε καλύτερο διαχωρισμό των ενώσεων, ενώ η δεύτερη, είχε μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, αλλά όχι τόσο καλό διαχωρισμό.



Σχήμα 8-2: Χρωματογράφημα έκλουσης του Ph_3AsO (std) στα 15 min. με χρήση στήλης waters acquity

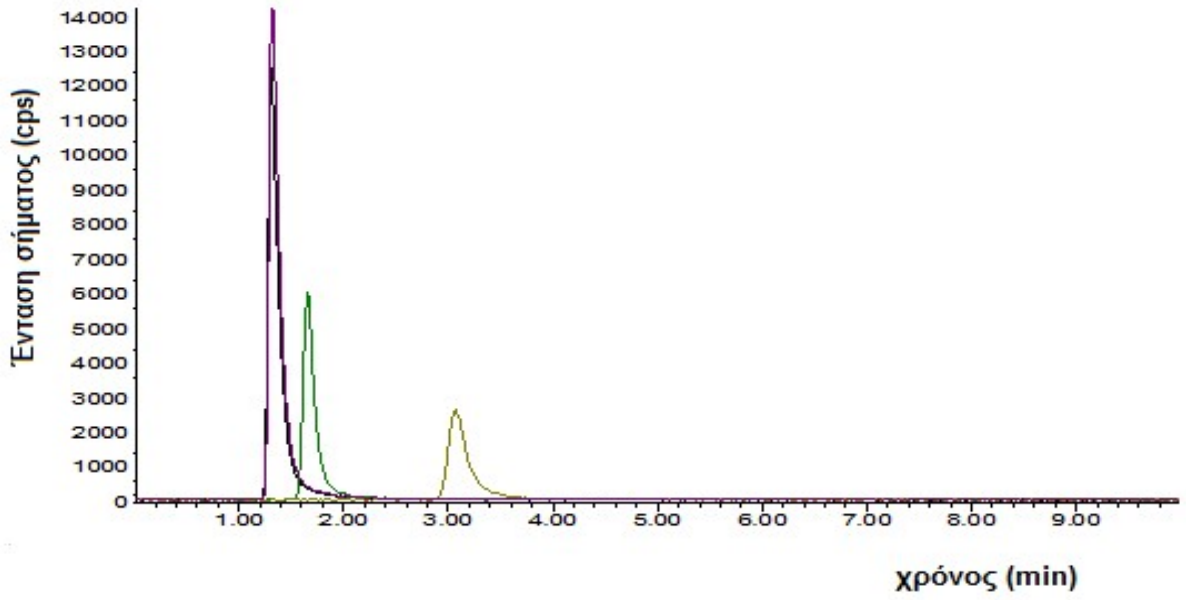
Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη/νερό με βαθμιδωτή έκλουση (πρόγραμμα έκλουσης στο υποκεφάλαιο 5.7.7), ισοπροπανόλη/νερό και ακετόνη/νερό.

Η αύξηση της αναλογίας μεθανόλης/νερού υπέρ του οργανικού διαλύτη με χρήση βαθμιδωτής έκλουσης, κατάφερε τον διαχωρισμό πολλών ενώσεων διαφορετικής πολικότητας. Γενικά η χρήση βαθμιδωτής έκλουσης διαχωρίζει περισσότερες ενώσεις σε σύγκριση με την ισοκρατική έκλουση [142].

Οι κινητές φάσεις ισοπροπανόλη/νερό και ακετόνη/νερό κρίθηκαν ακατάλληλες διότι η πρώτη αύξανε την πίεση της στήλης με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαρροών, ενώ η δεύτερη έδινε υψηλή γραμμή αναφοράς (baseline), αποκρύπτοντας πιθανές κορυφές αρσενολιπίδων. Επίσης τόσο η ισοπροπανόλη όσο και η ακετόνη κατανάλωναν μεγάλη ποσότητα φέροντος αερίου για να γίνει η καύση των ενώσεων άνθρακα και γι'αυτό κρίθηκαν ως αντιοικονομικές. Αυτές οι δοκιμές για την ανάλυση αρσενολιπδίων, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι καταλληλότερες φάσεις έκλουσης ήταν η μεθανόλη και το νερό χρησιμοποιώντας ως πρόγραμμα έκλουσης, το πρόγραμμα που δίνεται στο υποκεφάλαιο 5.7.7.

Για να διαπιστωθεί ότι η στήλη waters acquity και οι κινητές φάσεις μεθανόλη/νερό, ήταν κατάλληλες για την ανάλυση των αρσενολιπιδίων στα υπό μελέτη δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν και τα πρότυπα διαλύματα αρσενοβεταΐνη (arsenobetaine, AB), διμέθυλο-αρσενικικό οξύ (dimethylarsinate, DMA^{V}), μονομεθυλο-αρσονικικό οξύ (monomethylarsonate, MMA) και οξείδιο της τριμεθυλαρσίνης (trimethylarsine oxide,

TMAO). Όντως, η waters acquity έδωσε διακριτές κορυφές όπως φαίνονται στο χρωματογράφημα (σχήμα 8-3). Σύμφωνα με το χρωματογράφημα, η AB εκλούσθηκε στα 1.34 min (μωβ κορυφή), το TMAO εκλούσθηκε στα 1.37 min (μαύρη κορυφή), το DMA στα 1.66 min (πράσινη κορυφή), ενώ το MMA στα 3.03 min (κίτρινη κορυφή).



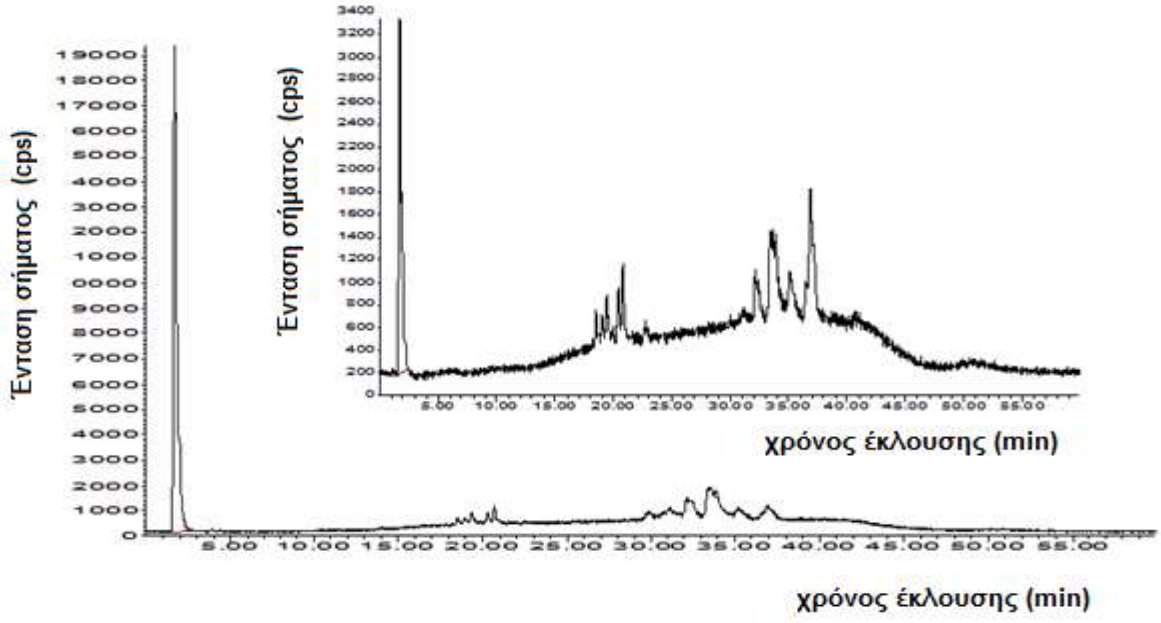
Σχήμα 8-3: Χρωματογράφημα με τους χρόνους έκλουσης των AB, TMAO, DMA και MMA

Τα χρωματογραφήματα που δόθηκαν μελετώντας το κλάσμα MeOH μυών και κεφαλοθωράκων με αντίστροφη φάση HPLC-ICPMS, ήταν τα σχήματα 8-4 και 8-5, όπως φαίνονται στη συνέχεια. Με αυτόν τον τρόπο, ανιχνεύτηκε μια σειρά από ευδιάκριτες κορυφές αρσενολιπιδίων.

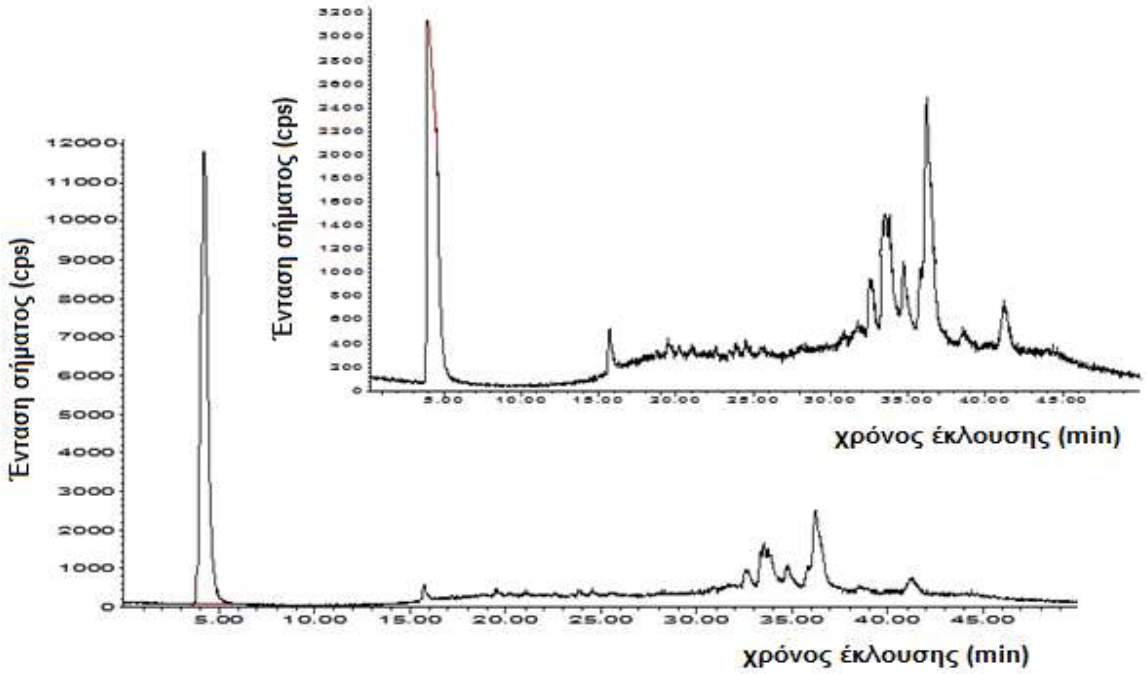
Τα χρωματογραφήματα (σχήμα 8-4 και 8-5) δείχνουν μια σημαντική χρωματογραφική κορυφή που εκλούεται στα ~ 2 και ~ 4min στους μύες και τους κεφαλοθώρακες αντίστοιχα, η οποία αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως άγνωστη κορυφή (void peak) [124,228]. Ο Amayo και οι συνεργάτες του (2014) προσδιόρισαν τις ενώσεις μεθυλαρσονικό οξύ (MA), διμέθυλο-αρσενινικό οξύ (DMA), διμεθυλαρσενυλο-προπιονικό οξύ (DMAP) και διμεθυλ-αρσενυλο-βουτανικό οξύ (DMAB) στην άγνωστη κορυφή (void peak) κατά την ανάλυση των αρσενολιπιδίων στο μουρουνέλαιο, αναλύοντας το μουρουνέλαιο σε συνθήκες παρόμοιες με την εν λόγω χρωματογραφία [228]. Πιθανόν και στα δείγματα των γαρίδων, η void κορυφή να περιέχει MA, DMA, DMAP, DMAB.

Οι κορυφές που εκλούονται στα ~20 και ~15 min στα δείγματα των μυών και των κεφαλοθωράκων αντίστοιχα, περιέχουν πολικές ενώσεις, πιθανόν ενώσεις λιπαρών

οξέων με As (AsFAs). Είναι γνωστό ότι στις γαρίδες υπάρχουν πολλά λιπαρά οξέα με κύρια το παλμιτικό (C16: 0), το στεατικό (C18: 0), το ελαϊκό (C18: 1 ω-9), το εικοσαπεντενοϊκό (C20: 5 ω-3, EPA) και το εικοσιδυεξενοϊκό (C22: 6 ω-3, DHA). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχουν προσδιοριστεί λιπαρά οξέα με As, αλυσίδας άνθρακα από 12-24 (C_{12}-C_{24}), σε λίπη από διάφορους θαλάσσιους οργανισμούς όπως μουρουνέλαιο, ιχθυέλαιο, λίπος φώκιας [124,142,228, 229]. Πιθανόν, οι ενώσεις που εκλούονται στα 25-30 min (σχήμα 8-4 και 8-5), να είναι μη πολικές ενώσεις, As-υδρογονανθράκων (AsHC). Τέλος, η κορυφή έκλουσης άνω των 35 min στο δείγμα των κεφαλοθωράκων, είναι ένωση μη πολικής φύσεως και πιθανόν ένωσης As-κηρών-εστέρων (wax ester). Η Taleshi και η ομάδα της (2014) αναφέρουν ότι πιθανόν να προσδιόρισαν As-κηρούς-εστέρες στο προσφυγάκι (blue whiting, *Micromesistius poutassou*), είδος ψαριού [230].

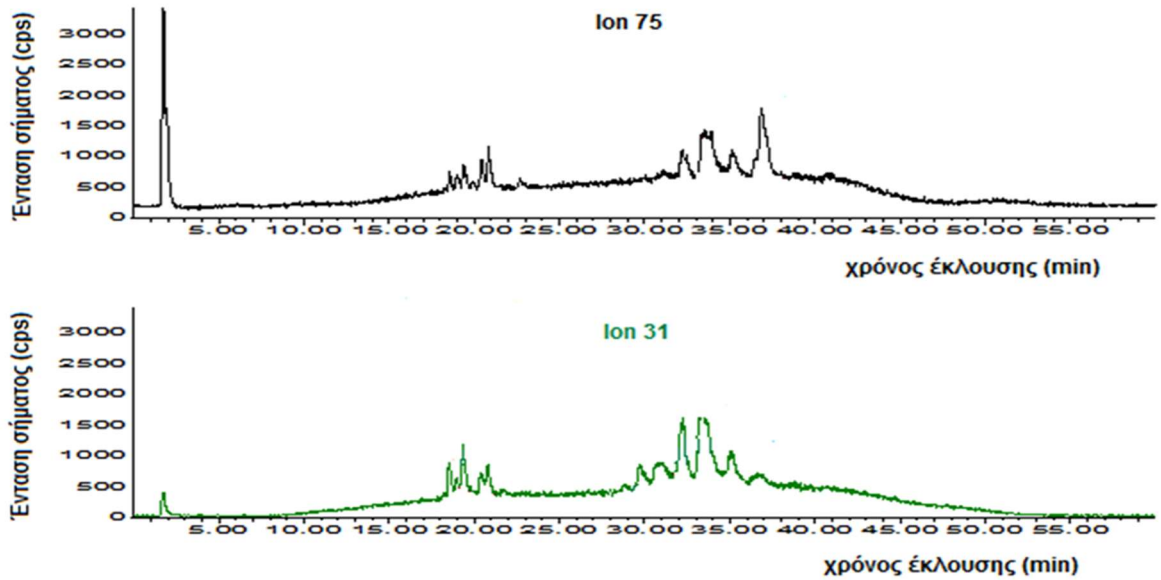


Σχήμα 8-4: Χρωματογράφημα (με μεγέθυνση) από HPLC-ICPMS ανάλυση αρσενολιπιδίων στο λίπος των μυών *A. foliacea* με χρήση waters acquity. Η αναλυτική πορεία της μεθόδου και οι παράμετροι λειτουργίας του αναλυτικού οργάνου δίνονται στο υποκεφάλαιο 5.7.7

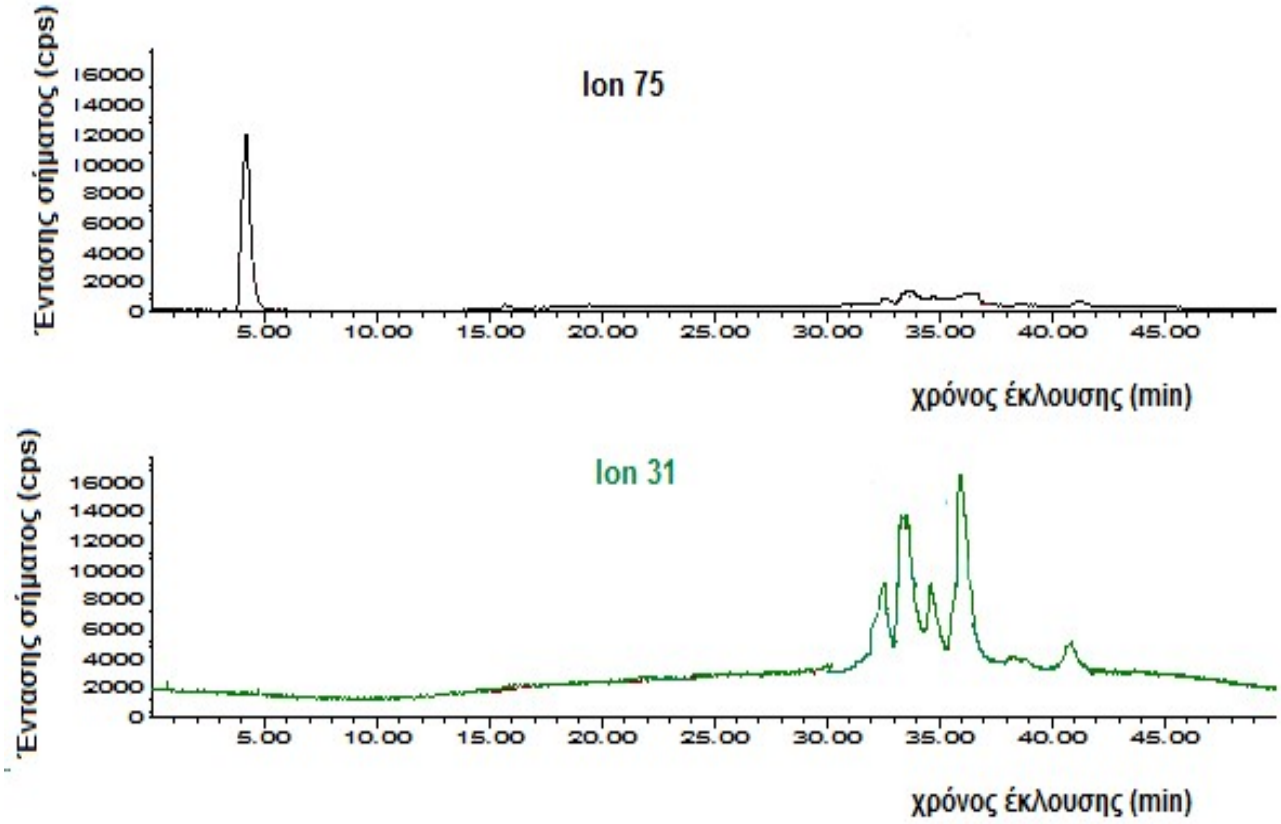


Σχήμα 8-5: Χρωματογράφημα (με μεγέθυνση) από HPLC-ICPMS ανάλυση αρσενολιπιδίων στο λίπος των κεφαλοθωράκων *A. foliacea* με χρήση waters acquity. Η αναλυτική πορεία της μεθόδου και οι παράμετροι λειτουργίας του αναλυτικού οργάνου δίνονται στο υποκεφάλαιο 5.7.7

Στη συνέχεια τα χρωματογραφήματα των μυών και κεφαλοθωράκων των κόκκινων γαρίδων βαθέων υδάτων συγκρίθηκαν με τα χρωματογραφήματα προσδιορισμού φωσφόρου (P) των ιστών των γαρίδων (σχήμα 8-6 και 8-7). Πιθανόν να υπάρχουν ενώσεις As-P.

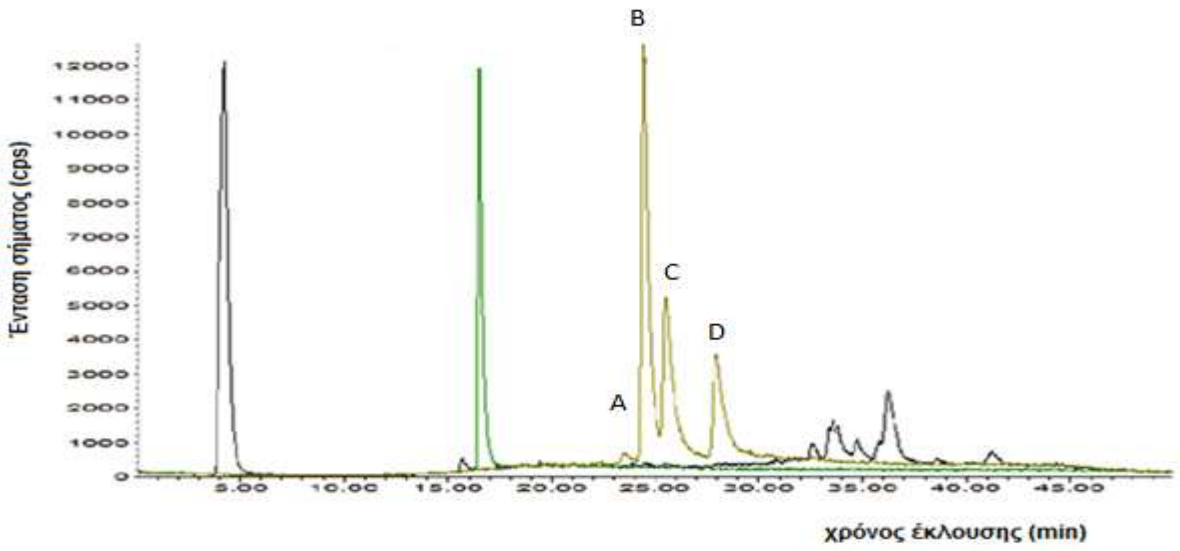


Σχήμα 8-6: Σύγκριση των κορυφών των στοιχείων As (ιόν 75) και P (ιόν 31) των μυών *A. foliacea*



Σχήμα 8-7: Σύγκριση των κορυφών των στοιχείων As (ιόν 75) και P (ιόν 31) των κεφαλοθωράκων *A. foliacea*

Δεδομένου ότι δεν υπάρχει ακόμα πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (Certified Reference Material, CRM) που να προσδιορίζει τα αρσενολιπίδια, οι χρόνοι έκλουσης των κορυφών των αρσενολιπιδίων των δειγμάτων (μύες-κεφαλοθώρακες) συγκρίθηκαν με τον χρωματογραφικό διαχωρισμό αρσενολιπιδίων από ιχθυέλαιο που μελέτησε η Sele στο διδακτορικό της (2014). Στην κορυφή A προσδιορίστηκαν δύο συνεκλούομενα λιπαρά οξέα ενωμένα με As, χημικών τύπων AsFA-C_{21} και AsFA-C_{22} αντίστοιχα (σχήμα 8-8). Οι κορυφές B,C και D είναι ενώσεις As με υδρογονάνθρακες, χημικών τύπων AsHC-C_{21}($C_{23}H_{38}AsO$), AsHC-C_{15} ($C_{17}H_{38}AsO$) και AsHC-C_{17} ($C_{19}H_{42}AsO$) αντίστοιχα. Οι κορυφές που ανιχνεύτηκαν στο δείγμα των κεφαλοθωράκων των *A. foliacea*, φαίνονται με μαύρο χρώμα, ενώ η κορυφή του διαλύματος Ph_3AsO φαίνεται με πράσινο χρώμα (σχήμα 8-8). Το Ph_3AsO χρησιμοποιούνταν σε κάθε ανάλυση για να ελέγχονται οι συνθήκες λειτουργίας της στήλης και του οργάνου.



Σχήμα 8-8: Σύγκριση των κορυφών του χρωματογραφήματος αρσενολιπιδίων των κεφαλοθωράκων με κορυφές χρωματογραφήματος ιχθυελαίου και διαλύματος Ph_3AsO

8.3.4 Υπολογισμός εκτιμώμενης εβδομαδιαίας πρόσληψης

Όπως ήδη έχει τονισθεί, ο υπολογισμός της εκτιμώμενης εβδομαδιαίας πρόσληψης ανά γεύμα (Estimated Weekly Intake per meal size, EWIm) είναι μεγάλης αξίας. Η EWIm των στοιχείων Pb, Hg, Cd, tAs και Se υπολογίσθηκε σε μύες και κεφαλοθώρακες των *A. foliacea*, για ενήλικα σωματικού βάρους 70 kg και γεύμα 100 g γαρίδων. Για την περίπτωση του Se επειδή το Se είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο, η ελληνική νομοθεσία συνιστά ως ημερήσια πρόσληψη του τα 55 μg. Συνεπώς υπολογίσθηκε η εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη ανά γεύμα (Estimated Daily Intake per meal size, EDIm). Οι EWIm και η EDIw υπολογίστηκαν σύμφωνα με την προτεινόμενη εξίσωση του Copat (2012c) [214]:

EWIm = ποσότητα γεύματος (g) × συγκέντρωση στοιχείων (mg/kg ww) × 7 ημέρες/ σωματικό βάρος (kg)

EDIm = ποσότητα γεύματος (g) × συγκέντρωση Se (mg/kg ww)

Ειδικότερα:

Για ενήλικες: EWIm = 100 (g) × συγκέντρωση στοιχείων (mg/kg ww) × 7 ημέρες/70kg και EDIm = 100 (g) × συγκέντρωση Se (mg/kg)

Τα αποτελέσματα των EWIm των στοιχείων δίνονται στον πίνακα 8-3. Οι τιμές EWIm των στοιχείων συγκρίνονται με τις ενδεικτικές τιμές όπως έχουν καθοριστεί από JECFA

και EFSA. Θεωρήθηκε ενδιαφέρον να υπολογισθεί και το EWIm των κεφαλοθωράκων επειδή οι μεσογειακοί λαοί τους καταναλώνουν.

Η EWIm του Pb υπολογίσθηκε σε μύες και κεφαλοθώρακες, παρόλο που η τιμή του δεν μπορεί να συγκριθεί με την τιμή προσωρινού ανεκτού ορίου εβδομαδιαίας πρόσληψης (Provisional Tolerable Weekly Intake,PTWI, μg/kg σωματικού βάρους ανά εβδομάδα), διότι η τιμή αυτή έχει αποσυρθεί από την JECFA (2011b) [111]. Η EWIm για το Cd και στους μύες υπολογίστηκε χαμηλότερη από την προτεινόμενη τιμή PTWI η οποία είναι ίση με 6.25 μg/kg bw ανά εβδομάδα, ενώ η EWIm για τους κεφαλοθώρακες βρέθηκε ελαφρώς υψηλότερη. Για την περίπτωση του Hg η EFSA (2012a) θεωρεί ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση Hg στα θαλασσινά είναι υπό μορφή μεθυλυδράργυρου (MeHg) [215] και γι'αυτό δίνει μια τιμή ανεκτού ορίου εβδομαδιαίας πρόσληψης (Tolerable Weekly Intake, TWI) μεθυλυδραργύρου ίση με 1.3 μg/kg bw ανά εβδομάδα. Συνεπώς και εδώ θεωρήθηκε ότι όλη η συγκέντρωση του Hg ήταν υπό μορφή MeHg και γι'αυτό η υπολογιζόμενη τιμή EWIm των ιστών συγκρίθηκε με την τιμή 1.3. Η EWIm του Hg που υπολογίσθηκε για τους μύες βρέθηκε 3.8 φορές υψηλότερη από την τιμή της TWI, ενώ η EWIm για κεφαλοθώρακες βρέθηκε 1.6 φορές υψηλότερη.

Όσο αφορά το ολικό αρσενικό (tAs), αν και υπολογίσθηκε η EWIm, δεν ήταν δυνατόν να συγκριθεί με κάποια τιμή προτεινόμενη από JECFA ή EFSA, διότι δεν δίνεται τιμή για tAs, αλλά μόνο για iAs. Συγκεκριμένα, δίνεται κατώτερο όριο εμπιστοσύνης δόσης αναφοράς, (benchmark dose lower confidence limit , $BMDL_{0.5}$), ίσο με 3 μg/kg bw/day [110,111,215]. Επειδή το As είναι πολύπλοκη και ιδιαίτερη περίπτωση όπως έχουμε τονίσει, πρέπει η τοξικότητά του να εξετάζεται ξεχωριστά για την κάθε δομή του. Ενώ η τοξική φύση του iAs είναι πλέον γνωστή, η τοξικότητα των αρσενολιπιδίων είναι ακόμα υπό έρευνα και κρίνονται άκρως απαραίτητες και επιτακτικές περαιτέρω, εκτενείς μελέτες. Μια in vivo έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε έντομα (common fruit fly) *Drosophila melanogaster*, έδειξε ότι οι υδρογονάνθρακες που περιείχαν As, παρουσίασαν παρόμοια τοξικότητα με το iAs [231]. Η ίδια επιστημονική ομάδα, προχωρώντας την έρευνά της σε ανθρώπινα κύτταρα, έδειξε ότι η ομάδα των υδρογονανθράκων με As, ήταν πιο τοξική από την ομάδα των λιπαρών οξέων ενωμένα με iAs, και αυτό πιθανόν να οφειλόταν στον λιγότερο πολικό χαρακτήρα των υδρογονανθράκων. Κατά συνέπεια, κάθε ομάδα αρσενολιπιδίων θα πρέπει να

μελετάται ξεχωριστά, προκειμένου να εκτιμηθεί ο δυνητικός κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία [232].

Τέλος, από τον πίνακα 8-3, φαίνεται ότι τα 100 g μυών μπορούν να καλύψουν τις ημερήσιες ανάγκες του ανθρώπου σε Se κατά 85.6%, ενώ τα 100 g κεφαλοθωράκων μπορούν να υπερκαλύψουν τις ημερήσιες ανάγκες έως και 305%. Άρα οι ιστοί των γαρίδων αποτελούν πλούσια πηγή σε Se.

Πίνακας 8-3: Δίνονται οι τιμές εκτιμώμενης εβδομαδιαίας πρόσληψης ανά γεύμα (EWIm) για τον Pb, Cd, Hg και tAs και η τιμή εκτιμώμενης ημερήσιας πρόσληψης ανά γεύμα (EDIm) για το Se. Οι τιμές αυτές συγκρίνονται με τις ενδεικτικές τιμές όπως έχουν καθοριστεί από την JECFA, EFSA και την ελληνική νομοθεσία αντίστοιχα (JECFA 2011a, 2011b, EFSA 2012a, ΦΕΚ 395/27.2.2004)

Στοιχεία	Τύπος	Τιμές	EWIm/EDIm (μύες)	EWIm/EDIm (κεφαλοθώρακες)
Pb	PTWI	withdrawn*	0.73	0.40
Cd	PTWI	6.25	2.33	6.35
Hg	TWI	1.3**	4.90	2.09
tAs	-	-	160	327
Se	RDI	55	47.1	167.9

- PTWI: Provisional Tolerable Weekly Intake (μg/kg bw/week), TWI: Tolerable Weekly Intake (μg/kg bw/week), RDI: Recommended Daily Itake (μg per day for adults)
- *Pb: withdrawn by JECFA (2011b) as no no-effect level identified
- **TWI value for methylmercury

8.4 Συμπεράσματα

Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν τα στοιχεία Pb, Hg, Cd, tAs και Se σε μύες και κεφαλοθώρακες στις γαρίδες *A. foliacea.* Παρατηρήθηκε ότι όλα τα στοιχεία είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις στους κεφαλοθώρακες με μοναδική εξαίρεση τον Hg, ο οποίος στους μύες βρέθηκε σχεδόν διπλάσιος. Συγκρίνοντας τις τιμές των μετάλλων με τις τιμές που δίνονται από την ευρωπαϊκή νομοθεσία, ήταν χαμηλότερες, εκτός από την περίπτωση του Cd στους κεφαλοθώρακες, η οποία ήταν ελαφρώς υψηλότερη. Το εντονότερο κόκκινο χρώμα των γαρίδων *A. foliacea* πιθανόν να οφείλεται και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις Pb, Hg και Cd σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές που βρέθηκαν στις ροζ γαρίδες *P. longirostris*, διότι πιθανόν να τα μέταλλα να σχηματίζουν σύμπλοκα με την ασταξανθίνη. Οι τιμές του Se βρέθηκαν υψηλές και στους δύο ιστούς και οτον λόγο Se:Hg, υπολογίσθηκε πολύ υψηλότερος από τον προτεινόμενο 1:1.

Καθώς οι τιμές του tAs προσδιορίστηκαν πολύ υψηλές στους ιστούς των γαρίδων, μελετήθηκε και το tAs στο λίπος. ;Υστερα από την ανάλυση του tAs στο λίπος, βρέθηκε, ότι το λίπος των μυών και των κεφαλοθωράκων περιείχε σημαντική συγκέντρωση As (αρσενολιπιδία). Όμως υπολογίζοντας την περιεκτικότητα των αρσενολιπιδίων σε νωπό ιστό βρέθηκε πάρα πολύ χαμηλή (0.0615 και 0.6170 mg/kg νωπού ιστού μυών και κεφαλοθωράκων αντίστοιχα). Άρα η περιεκτικότητα των υδατοδιαλυτών ενώσεων As ήταν 99.6%tAs και 98.1%tAs στους μύες και τους κεφαλοθώρακες αντίστοιχα. Καθώς εκτιμάται ότι η ανόργανη μορφή αρσενικού στους θαλάσσιους οργανισμούς είναι σε μικρά ποσοστά, υποθέτουμε ότι η κυρίαρχη ένωση των υδατοδιαλυτών ενώσεων είναι η αρσενοβεταΐνη.

Αναλύοντας τα αρσενολιπίδια παρατηρήθηκε ότι η καταλληλότερη στήλη HPLC ήταν η water acquity και ως κινητές φάσεις η μεθανόλη και το νερό. Λόγω των περιορισμών από την HPLC-ICPMS, μελετήθηκε μόνο το κλάσμα της μεθανόλης/νερού και όχι η επτανική φάση. Το κλάσμα αυτό έδωσε μια σειρά από σημαντικές κορυφές αρσενολιπιδίων, τις οποίες όμως δεν μπορέσαμε να ταυτοποιήσουμε, ριθανόν όμως να είναι ενώσεις λιπαρών οξέων-As, υδρογονανθράκων-As και στους κεφαλοθώρακες να υπάρχει και μια νέα ομάδα ενώσεων As (μη πολική), ένωση κηρών-εστέρων-As. Θα πρέπει να δόσουμε ιδιαίτερη σημασία στις υψηλές κορυφές που εμφανίστηκαν στους μύες, στα ~2 min και στους κεφαλοθωράκες, στα ~4 min, γνωστές ως void, οι οποίες πιθανόν να περιέχουν MA, DMA, DMAP ή/και DMAB.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

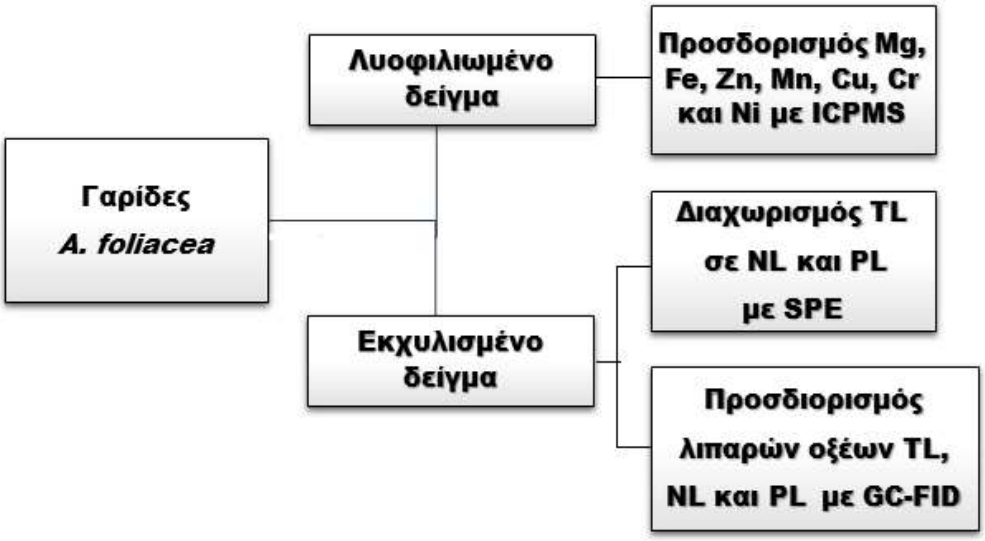
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΚΑΙ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΥΩΝ ΚΑΙ ΚΕΦΑΛΟΘΩΡΑΚΩΝ ΤΩΝ ΓΑΡΙΔΩΝ *A. FOLIACEA*

9.1 Εισαγωγή

Σε προηγούμενα κεφάλαια αναλύσαμε τα δυνητικά τοξικά μέταλλα που περιέχονταν στις γαρίδες *A. foliacea* (κεφάλαιο 8), *P. longirostis* και *P. borealis* (κεφάλαιο 7). Γι' αυτό στο παρόν κεφάλαιο κρίθηκε ενδιαφέρον να μελετήσουμε/αναλύσουμε τα απαραίτητα μέταλλα στις κόκκινες γαρίδες βαθέων υδάτων *A. foliacea*. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα μέταλλα μαγνήσιο (Mg), σίδηρος (Fe), ψευδάργυρος (Zn), μαγγάνιο (Μη), χαλκός (Cu), χρώμιο (Cr) και νικέλιο (Ni), τα οποία παίζουν καταλυτικό ρόλο στην ισορροπία και υγεία των οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου. Ο προσδιορισμός των μετάλλων πραγματοποιήθηκε με ICP-MS (υποκεφάλαιο 5.6.1). Επίσης μελετήθηκαν και τα λιπαρά οξέα των ολικών (TL), ουδετέρων (NL) και πολικών (PL) λιπιδίων των μυών και κεφαλοθωράκων των γαρίδων *A. foliacea* με GC-FID. Ο διαχωρισμός του ολικού λίπους σε ουδέτερα και πολικά λιπίδια πραγματοποιήθηκε με με χρήση της SPE και όχι με PTLC (κεφάλαιο 6).

Το Mg είναι μακροστοιχείο (>100 mg/ημέρα) ενώ τα υπόλοιπα μέταλλα που μελετώνται είναι ιχνοστοιχεία (<100mg/ημέρα). Ο κύριος ρόλος του Mg είναι να ενεργοποιεί τα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στη λειτουργία νευρικού και μυϊκού συστήματος, στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών και στο σχηματισμό των οστών και των δοντιών. Ο Cu παίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση και το μεταβολισμό του Fe. Ο Fe αποτελεί κύριο συστατικό της ένωσης της αιμοσφαιρίνης, ενώ το Μη συμμετέχει στο μεταβολισμό του λίπους και στην απορρόφηση του ασβεστίου. Ο Zn δρα ως συμπαράγοντας σε περισσότερα από 300 ένζυμα, ενώ το Ni και το Cr συμμετέχουν στο μεταβολισμό της γλυκόζης και του λίπους [93]. Εκτενής ανάλυση των ευεργετικών ιδιοτήτων των λιπαρών οξέων έχει γίνει σε προηγούμενο κεφάλαιο (κεφάλαιο 2).

Παρακάτω παρατίθεται ένα συνοπτικό διάγραμμα (σχήμα 9-1) της πειραματικής πορείας της συγκεκριμένης μελέτης στους μύες και κεφαλοθώρακες των γαρίδων *A. foliacea*.



Σχήμα 9-1: Πειραματική πορεία ανάλυσης γαρίδων *A. foliacea*

9.2 Πειραματική πορεία

9.2.1 Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν υψηλού βαθμού καθαρότητας. Για την υγρή χώνευση και την εκχύλιση των μετάλλων Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Cr και Ni, χρησιμοποιήθηκαν συμπυκνωμένο HNO_3 (Merck, Darmstadt, Γερμανίας) και 30% w/w H_2O_2 (Merck, Darmstadt, Γερμανία). Για τη παρασκευή πρότυπων καμπύλων χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα αυτών των μετάλλων. Οι μικροστήλες SPE αμινοπροπυλο-συζευγμένη σε πυριτική πηκτή (aminopropyl modified silica, Bond Elut-columns, 3 cc/ 500 mg, NH_2) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της Supelco (USA). Τα αντιδραστήρια χλωροφόρμιο, μεθανόλη, διαιθυλαιθέρας, οξικό οξύ, 2-προπανόλη, επτάνιο και τα πρότυπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των λιπαρών οξέων με GC-FID ήταν από την Merck (Darmstadt, Γερμανία) ή την Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO). Το νερό που χρησιμοποιήθηκε σε όλη την αναλυτική πορεία ήταν υπερκάθαρο.

9.2.2 Στάδια πειραματικής πορείας

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη είναι τα ακόλουθα:

- **Προσδιορισμός των απαραίτητων μετάλλων Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Cr και Ni με ICPMS**
- **Υπολογισμός της εκτιμώμενης ημερήσιας πρόσληψης**

- **Διαχωρισμός TL σε NL και PL με SPE**
- **Προσδιορισμός λιπαρών οξέων TL, NL και PL με GC-FID**
- **Υπολογισμός διατροφικών δεικτών AI και TI**

9.2.3 Στατιστική ανάλυση

Οι μετρήσεις ελήφθησαν εις τριπλούν για δείγματα αλιευμένα Σεπτέμβριο-Νοέμβριο και δύο συνεχόμενα έτη (N=6). Στη συνέχεια υπολογίστηκαν ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των τιμών αυτών (Standard Deviation, SD). Όλοι οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με το SPSS (IBM SPSS Statistics, έκδοση 19.0, Chicago, IL, USA) στατιστικό λογισμικό για Windows.

9.3 Αποτελέσματα

Στο συγκεκριμένο πειραματικό μέρος, χρησιμοποιήθηκε το ήδη υπάρχον αποθηκευμένο δείγμα δηλ. το λυοφιλιωμένο δείγμα και το εκχυλισμένο λίπος μυών και κεφαλοθωράκων.

9.3.1 Προσδιορισμός μετάλλων και ημερήσια πρόσληψη

Στα τμήματα των μυών και κεφαλοθωράκων των γαρίδων *A. foliacea* προσδιορίστηκαν τα μέταλλα Mg, Fe, Mη, Zη, Cu, Cr και Ni (mg/kg νωπού ιστού, ww). Τα αποτελέσματα αυτά δίνονται στον πίνακα 9-1. Από τον πίνακα φαίνεται ότι η συγκέντρωση των μετάλλων στους μύες ακολουθούσε την εξής φθίνουσα σειρά: Mg>Cu>Zn>Fe>Mn>Ni>Cr, ενώ στους κεφαλοθώρακες: Mg>Fe>Cu>Zn>Mn>Ni>Cr. Παρατηρήθηκε ότι όλα τα μέταλλα περιείχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις στους κεφαλοθώρακες απ'ότι στους μύες, με χαρακτηριστική περίπτωση του Fe, ο οποίος ήταν ~24 φορές υψηλότερος στους κεφαλοθώρακες σε σύγκριση με αυτόν των μυών.

Η παρουσία υψηλών επιπέδων Mg οφείλεται στο γεγονός ότι το Mg υπάρχει φυσικά στο θαλασσινό νερό σε υψηλές συγκεντρώσεις (1350mg/L). Ως εκ τούτου οι θαλάσσιοι οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων και των γαρίδων απορροφούν το Mg μέσω του νερού. Ο Zn παίζει σημαντικό ρόλο στη δράση διαφόρων ενζύμων στο ήπαρ [93] και δικαιολογεί την αυξημένη συγκέντρωση του. Ο Cu προσδιορίστηκε πολύ υψηλός και στους δύο ιστούς. Υψηλές συγκεντρώσεις Cu έχουν παρατηρηθεί σε μαλακόστρακα (αστακούς, γαρίδες, καραβίδες) και κεφαλόποδα (καλαμάρια, σουπιές, χταπόδια), καθώς αυτά τα είδη μεταφέρουν οξυγόνο στους ιστούς τους μέσω της πρωτεΐνης αιμοκυανίνη [233]. Η αιμοκυανίνη δημιουργεί σύμπλοκο με τον Cu, κατά αντιστοιχία της αιμοσφαιρίνης στα σπονδυλωτά για τη μεταφορά του οξυγόνου στους ιστούς, με

τη διαφορά ότι η αιμοσφαιρίνη εμπεριέχει στο μόριό της Fe αντί Cu [234]. Τα αποτελέσματα του πίνακα 9-1 για τον Cu, έρχονται να ενισχύσουν το συμπέρασμα της Martínez et al. (2014), ότι δηλ. όσο πιο υψηλές συγκεντρώσεις Cu προσδιορίζονται στις γαρίδες, τόσο πιο έντονο κόκκινο χρώμα αυτές εμφανίζουν [224]. Πολύ υψηλές συγκεντρώσεις Cu (26.7-64.6 και 4.6-76.4 mg/kg σε ξηρό ιστό σε αρσενικά και θηλυκά άτομα γαρίδων αντίστοιχα) προσδιόρισε ο Drava et al. (2004) και στις κόκκινες γαρίδες *A. antennatus* [221]. Σε αντίθεση, οι ροζ γαρίδες βαθέων υδάτων, *P. longirostris* και *P. martia* περιείχαν πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις Cu 2.2 kai 2.8 mg/kg ww) [116]. Ο Fe που προσδιορίστηκε στο βρώσιμο τμήμα των υπό μελέτη γαρίδων (~4 mg/kg ww) ήταν σε σχετικά συγκρίσιμα επίπεδα με αυτά που αναφέρονται για τα είδη *Paleomon serratus* και *P. martia* (~2 mg/kg ww), ενώ πολύ χαμηλότερα από τα είδη *P. longirostris* (18 mg/kg ww) και *P. semisulcatus* (~33 mg/kg ww) [178]. Το Mn, Ni και Cr προσδιορίστηκαν σε μικρές ποσότητες.

Πίνακας 9-1: Συγκέντρωση (mg/kg ww) απαραίτητων μετάλλων σε μύες και κεφαλοθώρακες των *A. foliacea*

Απαραίτητα μέταλλα	***A. foliacea***	
	μύες	**κεφαλοθώρακες**
Mg	477.65±9.74a	1319.80±13.56b
Mn	1.28±0.23a	7.88±0.45b
Fe	3.96±0.15a	94.68±0.28b
Cu	20.30±1.89a	50.13±2.76b
Zn	8.95±1.36a	18.46±1.58b
Ni	0.19±0.03a	0.72±0.07b
Cr	0.10±0.01a	0.39±0.01b

- Στα αποτελέσματα δίνεται ο μέσος όρος ± SD (N=6). Διαφορετικό γράμμα στην ίδια σειρά υποδηλώνει ύπαρξη σημαντικής διαφοράς (P<0.05) για κάθε στάθμη εμπιστοσύνης 95%

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η EDI ανά γεύμα και συγκρίθηκε με τη ΣΗΠ, με βάση την ελληνική νομοθεσία (ΦΕΚ Β 395/27.2.2004) (πίνακας 9-2). Η EDI υπολογίσθηκε για ενήλικα 70 kg, ο οποίος καταναλώνει 100 g γεύματος κόκκινων γαρίδων.

Οι τιμές EDIm υπολογίστηκαν σύμφωνα με τον τύπο:

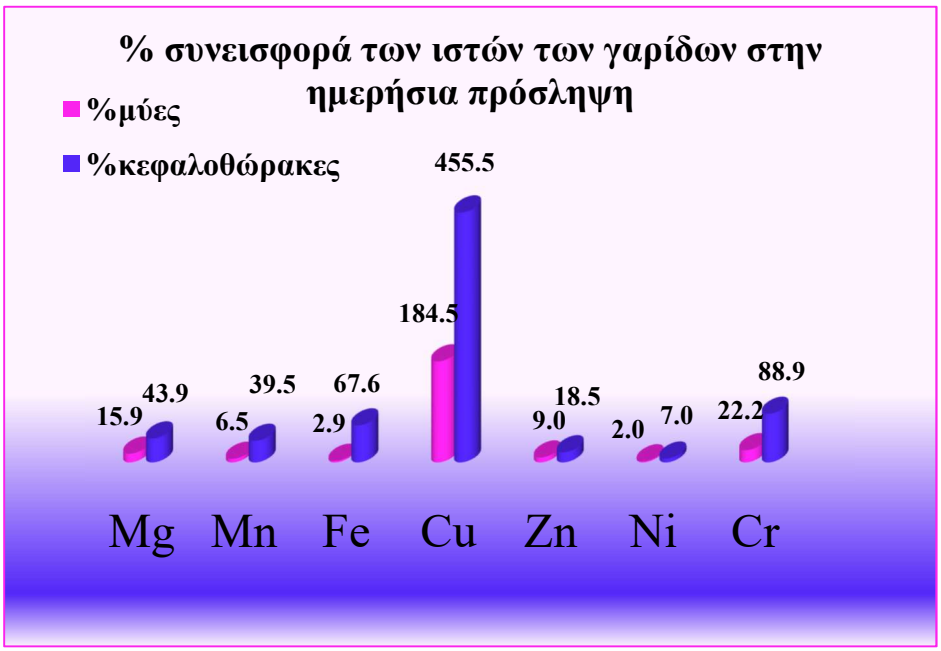
EDIm = ποσότητα γεύματος (g) × συγκέντρωση μετάλλων (mg/kg ww)

Από τον πίνακα 9-2 φαίνεται ότι όλες οι τιμές των EDIm ήταν χαμηλότερες από τις τιμές της ΣΗΠ, με εξαίρεση την τιμή του Cu για τους κεφαλοθώρακες. Σε καμία περίπτωση οι γαρίδες *A. foliacea* δεν θα μπορούσαν να θεωρούν ως ένα πλήρες γεύμα και θα πρέπει να συνδυάζονται με την κατανάλωση άλλων τροφίμων, προκειμένου να καλύπτεται η ημερήσια πρόσληψη.

Πίνακας 9-2: Δίνονται οι τιμές εκτιμώμενης ημερήσιας πρόσληψης ανά γεύμα (EDIm) για το Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, Ni και Cr. Οι τιμές αυτές συγκρίνονται με την Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη όπως έχουν καθοριστεί από την ελληνική νομοθεσία (ΦΕΚ Β 395/27.2.2004)

Απαραίτητα μέταλλα	EDI (mg ανά γεύμα για ενήλικες)			ΣΗΠ (mg)
	μύες	κεφ/κες	ολόκληρη γαρίδα	
Mg	47.76	131.98	179.74	300
Mn	0.13	0.79	0.92	2.0
Fe	0.40	9.47	9.87	14
Cu	2.03	5.01	7.04	1.1
Zn	0.90	1.85	2.75	10
Ni	0.02	0.07	0.09	1.0
Cr	0.01	0.04	0.05	0.045

Στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 9-2), φαίνεται η επί τοις % συνεισφορά μυών και κεφαλοθωράκων στην ημερήσια πρόσληψη σε Mg, Fe, Cu, Mn, Zn Cr και Ni. Τα ποσοστά στους μύες φαίνονται χαμηλά, με εξαίρεση τον Cu που ξεπερνά το 180% της κάλυψης των ημερήσιων αναγκών.



Σχήμα 9-2: Επί τοις % συνεισφορά μυών και κεφαλοθωράκων των κόκκινων γαρίδων στην ημερήσια πρόσληψη σε Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, Ni και Cr

Σε αντίθεση, οι κεφαλοθώρακες, αν καταναλωθούν μπορούν να καλύψουν ένα σημαντικό ποσοστό των ημερήσιων αναγκών, με εξαίρεση το Ni. Ο Cu συγκεκριμένα, φαίνεται να υπερκαλύπτει την ημερήσια προτεινόμενη πρόσληψη.

9.3.2 Προσδιορισμός λιπαρών οξέων TL, NL και PL

Αρχικά διαχωρίστηκε το TL σε NL και PL με χρήση SPE (υποκεφάλαιο 5.7.4.1.2). Στη συνέχεια τα λιπαρά οξέα των λιπιδίων μετατράπηκαν στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.7.5.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων δίνονται στον πίνακα 9-3. Από τον πίνακα φαίνεται ότι προσδιορίστηκαν 31 λιπαρά οξέα με 14 έως 24 άτομα άνθρακα και με 0 έως 6 διπλούς δεσμούς σε όλα τα κλάσματα. Με έντονη γραμματοσειρά τονίζονται τα λιπαρά οξέα που παρουσιάζουν μεγαλύτερο διατροφικό ενδιαφέρον.

Από την ομάδα των SFA κυρίαρχο βρέθηκε το C16:0 το οποίο κυμαινόταν από 14.54-17.21% σε όλα τα κλάσματα (TL, NL, PL). Τα λιπαρά οξέα C18:0 και C14:0 προσδιορίστηκαν σε χαμηλότερα ποσοστά. Κύριο MUFA ήταν το C18:1 ω-9 (>20% σε όλα τα κλάσματα), ενώ τα C16:1 ω-7, C18:1 ω-7 και C20:1 ω-11 ανιχνεύτηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα EPA και DHA βρέθηκαν σε υψηλότερα ποσοστά από όλα τα άλλα PUFA. Βασική παρατήρηση ήταν ότι τα EPA και DHA των PL βρέθηκαν σχεδόν σε διπλάσιο ποσοστό από τα αντίστοιχα EPA και DHA των NL όλων των δειγμάτων. Τα C18:3 ω-3 και C18:2 ω-6 (απαραίτητα λιπαρά οξέα) επίσης προσδιορίστηκαν και στα 6 κλάσματα, αν και σε χαμηλά ποσοστά (<1%).

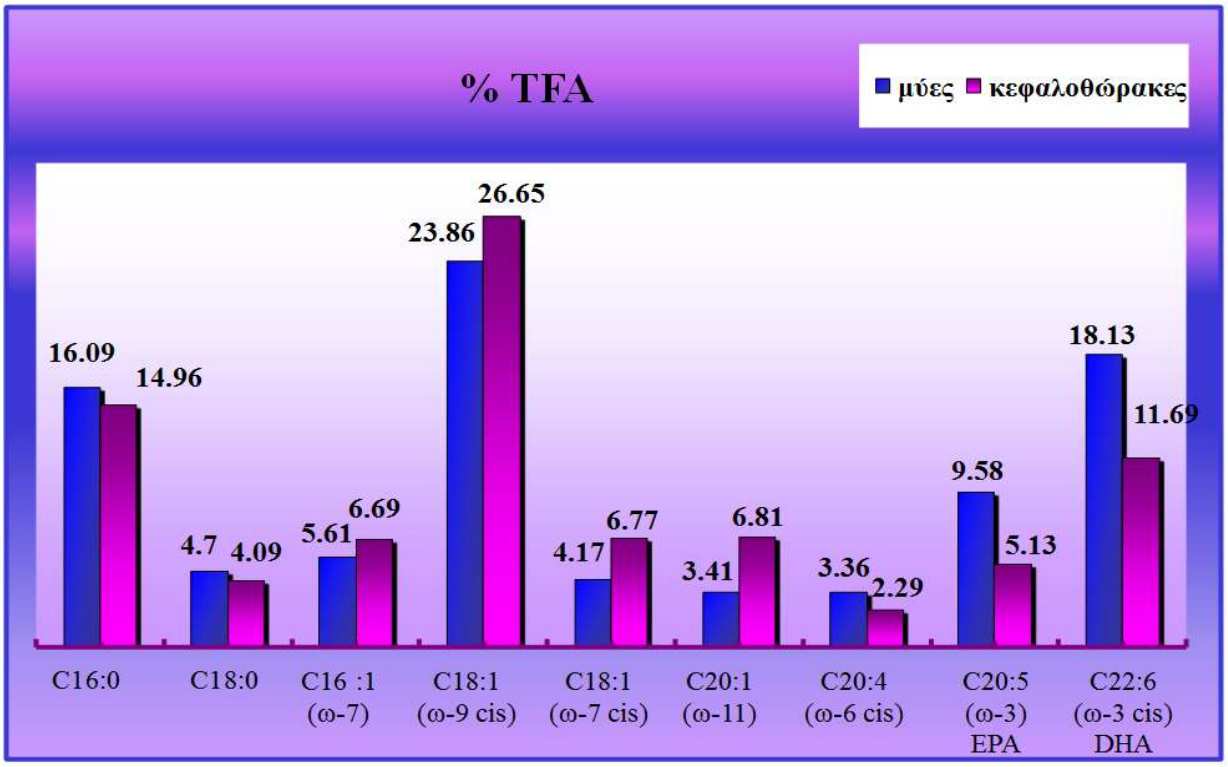
Τα αποτελέσματα του πίνακα 9-3 παρουσίασαν μικρές διαφορές από τα αποτελέσματα που δίνονται στους πίνακες 6-6 και 6-9 για το ίδιο είδος γαρίδας *(A. foliacea)*, οι οποίες όμως αλιεύτηκαν διαφορετική χρονική περίοδο. Εκτός από τη διαφορετική περίοδο αλίευσης, που είναι ένας από τους βασικότερους παράγοντες λόγω της ωοτοκίας (πριν και μετά την ωοτοκία), ένας σημαντικός παράγοντες των διαφορών αυτών είναι η χρήση διαφορετικών μεθόδων ανάλυσης. Στο πρώτο πειραματικό μέρος, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των TL σε TG και PL με χρήση PTLC, ενώ στο παρόν πειραματικό μέρος, τα TL διαχωρίστηκαν σε NL και PL με χρήση της SPE. Επίσης οι συνθήκες χρήσης των οργάνων GC-FID ήταν διαφορετικές.

Πίνακας 9-3: Σύσταση % των λιπαρών οξέων των TL, NL και PL μυών και κεφαλοθωράκων των *A. foliacea* με GC-FID

Λιπαρά οξέα	μύες *A. foliacea*			κεφαλοθώρακες *A. foliacea*		
	TL	**NL**	**PL**	**TL**	**NL**	**PL**
C14:0	0.81± 0.01	1.36 ±0.03	0.39±0.02	1.28± 0.01	1.42± 0.01	0.70 ±0.11
C14:1 (ω-5)	n.d.	n.d.	n.d.	0.08± 0.00	0.09±0.00	0.01±0.00
C15:0	0.40±0.00	0.50± 0.01	0.33±0.01	0.41± 0.00	0.41±0.00	0.34 ±0.02
C16:0	**16.09± 0.04**	**17.21± 0.16**	**14.92±0.47**	**14.96± 0.06**	**14.87± 0.03**	**14.54± 0.07**
C 16 :1 (ω-7)	5.61± 0.02	7.77 ±0.06	4.14±0.06	6.69± 0.03	6.97±0.02	5.20± 0.23
C 16 :2 (ω-4)	0.10± 0.02	0.14± 0.03	0.14±0.02	0.06± 0.01	0.21± 0.04	0.09± 0.01
C 16 :3 (ω-4)	0.57± 0.00	0.44 ±0.00	0.61±0.01	0.44± 0.01	0.41± 0.00	0.55 ±0.01
C17:0	0.72± 0.01	0.82 ±0.00	0.67±0.02	0.68± 0.00	0.67±0.00	0.74± 0.03
C 16 :4 (ω-1)	0.29± 0.00	0.13 ±0.13	0.31±0.01	0.33± 0.01	0.32± 0.00	0.28 ±0,02
C18:0	**4.70± 0.04**	**3.43± 0.08**	**5.00±0.19**	**4.09± 0.00**	**3.83± 0.01**	**6.27± 0.11**
C18:1 (ω-9 cis)	**23.86± 0.09**	**27.26± 0.23**	**21.84±0.12**	**26.65± 0.01**	**26.72±0.04**	**23.51± 0.63**
C18:1 (ω-7 cis)	4.17± 0.03	5.20± 0.07	2.50±0.05	6.77± 0.15	7.28± 0.02	2.98 ±0.02
C18:2 (ω-6)	0.98± 0.01	1.05 ±0.02	0.78±0.00	0.83± 0.02	0.75± 0.02	0.90± 0.01
C18:2 (ω-4)	0.10± 0.04	n.d.	0.30±0.03	0.05± 0.05	0.27± 0.02	n.d.
C18:3 (ω-6 cis)	0.04±0.02	0.06 ±0.06	0.04±0.00	0.04± 0.04	0.12± 0.02	0.06 ±0.06
C 18 :3 (ω-4)	0.20± 0.00	0.23± 0.00	0.17±0.01	0.27± 0.00	0.29± 0.02	0.21± 0.00
C18:3 (ω-3 cis)	0.35± 0.00	0.43± 0.01	0.32±0.03	0.64± 0.02	0.66± 0.01	0.29 ±0.01
C18:4 (ω-3 cis)	0.28± 0.00	0.42 ±0.02	0.19±0.01	0.37± 0.01	0.40± 0.00	0.24 ±0.03
C20:0	0.27± 0.01	0.37 ±0.03	0.16±0.00	0.40± 0.02	0.41± 0.00	0.24 ±0.00
C 20 :1 (ω-11)	3.41± 0.03	4.50± 0.05	2.18±0.01	6.81± 0.09	7.24± 0.03	2.64± 0.10
C 20 :1 (ω-7)	0.78± 0.01	1.11± 0.02	0.45±0.01	1.60± 0.02	1.70± 0.01	0.33 ±0.33
C20:4 (ω-6 cis)	3.36± 0.01	2.19± 0.09	3.79±0.01	2.29± 0.01	2.05± 0.01	4.21± 0.09
C20:3 (ω-3 cis)	0.30± 0.01	0.29 ±0.00	0.21±0.00	0.38± 0.01	0.39± 0.01	0.23 ±0.01
C20:4 (ω-3 cis)	0.37± 0.01	0.42± 0.01	0.29±0.00	0.33± 0.01	0.31± 0.01	0.41 ±0.01
C 20 :5 (ω-3)	**9.58± 0.01**	**5.70 ±0.11**	**12.72±0.22**	**5.13± 0.03**	**4.59± 0.01**	**10.94± 0.87**
C22:1 (ω-11)	0.25± 0.06	0.25 ±0.08	0.07±0.03	0.28± 0.13	0.15± 0.01	0.14 ±0.02
C22:1 (ω-9 cis)	0.23± 0.01	0.22± 0.02	0.14±0.02	0.35± 0.07	0.43± 0.02	0.20± 0.02
C 21 :5 (ω-3)	0.13± 0.01	0.07 ±0.07	0.13±0.00	0.08± 0.01	0.08± 0.00	0.19± 0.01
C 22 :5 (ω-3)	0.57± 0.01	1.14 ±0.61	0.62±0.02	0.58± 0.00	0.60± 0.04	0.95± 0.17
C22:6 (ω-3 cis)	**18.13± 0.01**	**13.60 ±0.17**	**22.22±0.02**	**11.69± 0.01**	**11.30± 0.05**	**17.97± 0.08**
C24:1 (ω-9 cis)	0.49± 0.01	0.33± 0.01	0.31±0.25	0.34± 0.23	0.53± 0.00	0.47 ±0.02

- Στα αποτελέσματα δίνεται ο μέσος όρος ± S.D (N=6), ($P<0.05$), n.d. not detected (δεν προσδιορίστηκε)

Στη συνέχεια, στο σχήμα 9-3 παρουσιάζονται τα σημαντικότερα λιπαρά οξέα (%) των TL όπως προσδιορίστηκαν από την GC-FID.



Σχήμα 9-3: Επί τοις % σύσταση των κυριότερων λιπαρών οξέων ολικού λίπους των ιστών των γαρίδων *A. foliacea*

Από το σχήμα 9-3 φαίνεται ξεκάθαρα ότι σε μεγαλύτερο ποσοστό σε μύες και κεφαλοθώρακες ήταν το C18:1 ω-9, ακολουθούν το C16:0, το DHA και EPA.

Στη συνέχεια, παρατηρώντας τον πίνακα 9-4 ο οποίος δείχνει τα συνόλα των SFA, MUFA και PUFA, φαίνεται ότι τα ποσοστά των SFA ήταν χαμηλότερα από των MUFA και PUFA σε όλα τα δείγματα. Συγκεκριμένα, η σειρά των συνόλων των λιπαρών οξέων στα TL και NL ήταν MUFA>PUFA>SFA τόσο στους μύες όσο και στους κεφαλοθώρακες, ενώ στα PL η σειρά που ακολουθούσαν ήταν PUFA>MUFA>SFA.

Όπως ήταν αναμενόμενο, στις γαρίδες *A. foliacea* κυρίαρχα ήταν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και αυτό οφείλεται στην τροφή τους (κατανάλωση φυτοπλαγκτού) η οποία είναι πλούσια σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Το φυτοπλαγκτό περιέχει ως κύρια λιπαρά οξέα τα PUFA. Τα φύκη και γενικότερα τα θαλάσσια φυτά έχουν την ικανότητα να φωτοσυνθέτουν χρησιμοποιώντας την ηλιακή ακτινοβολία για την παραγωγή οργανικών ενώσεων. Η ακτινοβολία όμως του ηλίου φτάνει στα ανώτερα στρώματα

της θάλασσας. Γι'αυτό παρατηρείται οι γαρίδες ρηχών υδάτων να περιέχουν υψηλότερα επίπεδα PUFA, έναντι των γαρίδων βαθέων υδάτων διότι καταναλώνουν περισσότερο φυτοπλαγκτόν. Η διαπίστωση αυτή έρχεται σε συμφωνία με το συμπέρασμα του πίνακα 9-4, ότι το TL περιέχει υψηλότερα ποσοστά MUFA από PUFA στις γαρίδες. Συγκρίνοντας όμως τις γαρίδες *P. longirostris* και *P. borealis* (πίνακα 7-3), οι οποίες αλιεύτηκαν την ίδια εποχή και βάθη με τις *A. foliacea* (πίνακας 9-3) και ακολουθήθηκαν ακριβώς τα ίδια βήματα ανάλυσης με τις *A. foliacea,* διαπιστώθηκε ότι οι *P. longirostris* και *P. borealis* περιείχαν υψηλότερα ποσοστά PUFA από MUFA στο TL. Η διαφορά αυτή πιθανόν να επεξηγείται από το γεγονός ότι α) οι *A. foliacea* είναι είδος γαρίδων που βρίσκονται σε μεγαλύτερα βάθη από τις *P. longirostris* με σύνηθες βάθος του πρώτου είδους τα 500-800 m, ενώ του δεύτερου τα 100-400 m., άρα πιθανόν οι γαρίδες *P. longirostris* να θρέφονται με περισσότερο φυτοπλαγκτόν συνεπώς να περιέχουν και υψηλότερα ποσοστά PUFA και β) το είδος *P. borealis,* παρόλο που συνήθως εντοπίζεται σε μεγαλύτερα βάθη από τα 800m, λόγω των πολύ χαμηλών θερμοκρασιών της θάλασσας να μετανάστευσαν σε υψηλότερα στρώματα για να μπορέσουν να τραφούν, συνεπώς να κατανάλωναν περισσότερο φυτοπλακτόν, πλούσιο σε PUFA.

Πίνακας 9-4: Τα σύνολα των λιπαρών οξέων, τα ω-3 και ω-6 σε επί τοις % και οι διατροφικοί δείκτες (ω-3/ω-6, AI και TI) των TL, NL και PL μυών και κεφαλοθωράκων των *A. foliacea*

	SFA%	MUFA%	PUFA%	ω-3 %	ω-6 %	ω-3/ω-6	AI	TI
TL								
μύες	22.99	38.80	35.00	29.71	4.38	6.78	0.26	0.18
κεφ/κες	21.82	49.57	23.51	19.20	3.16	6.08	0.28	0.23
NL								
μύες	23.69	46.64	26.41	22.07	3.30	6.28	0.31	0.22
κεφ/κες	21.61	51.11	22.75	18.33	2.92	4.91	0.28	0.23
PL								
μύες	21.47	31.63	42.84	36.70	4.61	7.96	0.23	0.15
κεφ/κες	22.83	35.48	37.55	31.22	5.17	6.04	0.24	0.18

Υπολογίζοντας τα Σω:3, Σω:6 και την αναλογία ω:3/ω:6, παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα κλάσματα τα ω:3 ήταν >22.0% στους μύες και >18% στους κεφαλοθώρακες, ενώ τα ω:6 κυμαίνονταν από 2.92-5.17%, με το υψηλότερο ποσοστό στο κλάσμα των PL των

κεφαλοθωράκων και το μικρότερο ποσοστό στα NL των κεφαλοθωράκων. Η αναλογία ω:3/ω:6 κυμαινόταν από 4.91-7.96 σε όλα τα κλάσματα, έχοντας την υψηλότερη τιμή στα PL των μυών. Η αναλογία ω:3/ω:6 σε όλα τα δείγματα βρέθηκε υψηλότερη από την συνιστώμενη αναλογία (ω:3/ω:6 4:1) όπως δίνεται από την Α. Σιμόπουλος (2002) για μια ισορροπημένη διατροφή. Τέλος, εξετάζοντας τους διατροφικούς δείκτες AI και TI (πίνακας 9-4) οι τιμές σε όλα τα κλάσματα ήταν πολύ χαμηλές (<0.31). Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που δόθηκαν στα κεφάλαια 6 και 7 της παρούσας διατριβής για τα είδη *A. foliacea, P. longirostris* και *P. borealis*, αλλά και σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Rosa και Nunes (2003) [76].

9.4 Συμπεράσματα

Η συγκέντρωση των μετάλλων στους μύες είχε την εξής σειρά: Mg>Cu>Zn>Fe>Mn>Ni>Cr, ενώ στους κεφαλοθώρακες: Mg>Fe>Cu>Zn>Mn>Ni>Cr. Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε ότι όλα τα μέταλλα είχαν πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις στους κεφαλοθώρακες απ'ότι στους μύες με χαρακτηριστική περίπτωση του Fe, ο οποίος ήταν ~24 φορές υψηλότερος στους κεφαλοθώρακες σε σύγκριση με αυτόν των μυών. Προσδιορίστηκαν υψηλές συγκεντρώσεις Cu και στους μύες και στους κεφαλοθώρακες, γεγονός που δικαιολογεί το έντονο κόκκινο χρώμα των *A. foliacea.* Επίσης οι συγκεντρώσεις του Zn ήταν αρκετά υψηλές, κυρίως στους κεφαλοθώρακες (~18.5 mg/kg ww), καθώς ο Zn παίζει σημαντικό ρόλο στη δράση διαφόρων ενζύμων στο ήπαρ.

Υπολογίζοντας τις τιμές της ημερήσιας πρόσληψης ανά 100 g γεύματος, οι τιμές στους μύες βρέθηκαν χαμηλές, με εξαίρεση του Cu, ενώ στους κεφαλοθώρακες ήταν σε ικανοποιητικά επίπεδα και κυρίως η τιμή του Cu.

Όσο αφορά τα λιπαρά οξέα, όλα τα κλάσματα (TL, NL και PL) βρέθηκαν πλούσια σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Συγκεκριμένα, η σειρά των συνόλων των λιπαρών οξέων στα TL και NL ήταν MUFA>PUFA>SFA και στους δύο ιστούς, ενώ στα PL η σειρά που ακολουθούσαν ήταν PUFA>MUFA>SFA. Τα αποτέλεσματα αυτά δικαιολογούνται καθώς οι γαρίδες *A. foliacea* είναι είδος που συνήθως εντοπίζεται σε βάθη 500-800m., συνεπώς δεν καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες φυτοπλαγκτού, το οποίο είναι πλούσιο σε PUFA. Γι'αυτό στις συγκεκριμένες γαρίδες που αλιεύτηκαν αρχές Σεπτεμβρίου προσδιορίσητκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις MUFA. Όταν όμως οι γαρίδες ανέρχονται σε πιο ρηχά νερά (χειμώνα-άνοιξη) παρατηρούνται μεγαλύτερα

ποσοστά PUFA από MUFA (πίνακας 6-6), διότι πιθανόν καταναλώνουν περισσότερο φυτοπλαγκτόν.

Ως κύρια λιπαρά οξέα σε όλα τα κλάσματα προσδιορίστηκαν τα C18:1 ω-9 (ελαϊκό), C16:0 (παλμιτικό), DHA και EPA. Οι διατροφικοί δείκτες υπολογίστηκαν πολύ χαμηλοί, ενώ η αναλογία ω-3/ω-6 ήταν υψηλότερη σε όλα τα δείγματα από την συνιστώμενη αναλογία 4:1.

Εν κατακλείδι, τα επίπεδα των απαραίτητων μετάλλων και των λιπαρών οξέων των γαρίδων *A. foliacea* των μυών και των κεφαλοθωράκων καθιστούν τις γαρίδες κατάλληλες προς κατανάλωση, αλλά σίγουρα δεν αποτελούν από μόνες τους ένα πλήρες γεύμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν οι γαρίδες *A. foliacea*, *P. longirostris* (Κυλλήνη) και *P. borealis* (Skagerrak). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα TL και στα τρία είδη γαρίδων ήταν πλούσια σε λιπαρά οξέα (>25) με κύρια τα C16:0, C18:1 ω-9 cis, EPA και DHA τόσο σε μύες όσο και σε κεφαλοθώρακες. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων Pb, Hg και Cd στους ιστούς των κόκκινων γαρίδων ήταν αρκετά υψηλότερες σε σύγκριση με αυτές των γαρίδων *P. longirostris* και *P. borealis,* όμως χαμηλότερες από τα ανώτερα επιτρεπτά όρια της ευρωπαϊκής νομοθεσίας (0.5 mg/kg ww για καρκινοειδή). Εξαίρεση αποτέλεσε μόνο η συγκέντρωση του Cd στους κεφαλοθώρακες. Αξιοσημείωτο είναι, ότι οι συγκεντρώσεις του tAs και στα 3 είδη γαρίδων ήταν υψηλές και κυμαίνονταν από 16.3-62.4 mg/kg ww.

Συγκρίνοντας τις μεσογειακές γαρίδες *A. foliacea* και *P. longirostris* καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι μύες ήταν πλούσιοι σε πρωτεΐνες, ενώ περιείχαν χαμηλά ποσοστά λίπους και τέφρας. Σε αντίθεση, οι κεφαλοθώρακες, περιείχαν υψηλότερα ποσοστά λίπους και τέφρας, αλλά χαμηλότερα ποσοστά πρωτεϊνών. Με τη χρήση του Iatroscan TLC-FID, παρατηρήθηκε ότι το ολικό λίπος των μυών και των δύο ειδών ήταν πλούσιο σε PL ξεπερνώντας τα 85% των TL, ενώ το λίπος των κεφαλοθωράκων βρέθηκε πλούσιο σε NL με ποσοστά που κυμαινόνταν από 63-80% των TL. Ως κύρια PL τόσο σε μύες όσο και κεφαλοθώρακες βρέθηκαν η PC και PE, ενώ κύρια NL ήταν η χοληστερόλη και τα TG. Οι γαρίδες συχνά ενοχοποιούνται για τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης. Υπολογίζοντας όμως την περιεκτικότητα των μυών των συγκεκριμένων γαρίδων σε χοληστερόλη, παρατηρήθηκε ότι ήταν πολύ χαμηλή, 56.12 και 88.23 mg/100 g των μυών *A. foliacea* και *P. longirostris* αντίστοιχα. Χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης βρέθηκαν και στους κεφαλοθώρακες. Χρησιμοποιώντας την HPLC-DAD για τον προσδιορισμό των καροτενοειδών, προσδιορίστηκαν εφτά συστατικά καροτενοειδών με κύρια την ασταξανθίνη. Οι κόκκινες γαρίδες, περιείχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση καροτενοειδών στο ολικό λίπος σε σύγκριση με τις ροζ γαρίδες, δικαιολογώντας έτσι και το έντονο κόκκινο χρώμα που παρουσιάζουν οι *A. foliacea.*

Αναλύοντας το As σε οργανικό και ανόργανο στους ιστούς των γαρίδων *P. longirostris* και *P. borealis* παρατηρήθηκε ότι, το iAs το οποίο είναι τοξικό, προσδιορίστηκε μόνο στους κεφαλοθώρακες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (0.0009 και 0.0007 mg/kg ww αντίστοιχα). Η κύρια μορφή As ήταν το org-As, το οποίο σύμφωνα με την JECFA (2011 a) κρίνεται μη τοξικό, ή με ελάχιστη τοξικότητα.

Μελετώντας το προφίλ των αρσενολιπιδίων του ολικού λίπους των ιστών των *A. foliacea* ανιχνεύτηκαν τουλάχιστον 7 κορυφές στο κλάσμα της μεθανόλης/νερού. Η συγκέντρωση των αρσενολιπίδια του ολικού λίπους ήταν 8.310 και 7.890 mg As/kg λίπους μυών και κεφαλοθωράκων αντίστοιχα. Υπολογίζοντας τη συγκέντρωση των αρσενολιπιδίων σε νωπό ιστό βρέθηκε πολύ χαμηλή, 0.0615 και 0.6170 mg As/ kg ww μυών και κεφαλοθωράκων αντίστοιχα. Συνεπώς, η περιεκτικότητα των υδατοδιαλυτών ενώσεων As υπολογίστηκε 99.6% στους μύες και 98.1% στους κεφαλοθώρακες. Καθώς η κυρίαρχη ένωση στους θαλάσσιους οργανισμούς συνήθως είναι η αρσενοβεταΐνη, εκτιμάται ότι και στους ιστούς των *A. foliacea* είναι κυρίαρχη ένωση επίσης η αρσενοβεταΐνη, η οποία κρίνεται μη τοξική.

Αναλύοντας τα απαραίτητα μέταλλα Mg, Cu, Zn, Fe, Mn, Ni και Cr στους ιστούς των γαρίδων *A. foliacea*, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των συγκεκριμένων μετάλλων στους μύες είχε την εξής σειρά: Mg>Cu>Zn>Fe>Mn>Ni>Cr, ενώ στους κεφαλοθώρακες: Mg>Fe>Cu>Zn>Mn>Ni>Cr. Υψηλότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν στους κεφαλοθώ-ρακες, με χαρακτηριστική περίπτωση τον Fe, ο οποίος προσδιορίστηκε ~24 φορές υψηλότερος στους κεφαλοθώρακες σε σύγκριση με τους μύες. Στην περίπτωση του Cu, υψηλές συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκαν και στους μύες και στους κεφαλοθώρακες. Υπολογίζοντας τις τιμές των μετάλλων για την ημερήσια πρόσληψη ανά 100 g γεύματος, οι τιμές στους μύες βρέθηκαν χαμηλές, ενώ στους κεφαλοθώρακες ήταν σε ικανοποιητικά επίπεδα.

Εν κατακλείδι, οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των ειδών γαρίδων οφείλονται σε ποικίλους παράγοντες, όπως στις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, τη βιοδιαθεσιμότητα των στοιχείων και των θρεπτικών συστατικών στο θαλασσινό νερό, την έκδυση, το μέγεθος και το στάδιο ανάπτυξης των γαρίδων. Ως εκ τούτου, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, το βρώσιμο μέρος των

συγκεκριμένων γαρίδων καθίστανται κατάλληλες προς κατανάλωση, αλλά και οι κεφαλοθώρακες καταλληλοι για χρήση των λειτουργικών συστατικών τους σε φάρμακα και συμπληρώματα διατροφής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	**Ελληνικός όρος**
a-linolenic acid	α-λινολενικό οξύ
anion exchange	ανιονταλλαγής
arachidonic acid	αραχιδονικό οξύ
arsenic-containing hydrocarbons	υδρογονάνθρακες που περιέχουν αρσενικό
arsenic-containing fatty acids	λιπαρά οξέα που περιέχουν αρσενικό
arsenobetaine	αρσενοβεταΐϊνη
arsenocholine	αρσενοχολίνη
arsenolipids	αρσενολιπίδια
arsenosugars	αρσενοσάκχαρα
arsenosugar phospholipids	φωσφολιπίδια ενωμένα με αρσενοσάκχαρα
atherogenic index	αθηρογενετικός δείκτης
baseline	γραμμή αναφοράς
benchmark dose lower confidence limit	όριο αναφοράς χαμηλότερης δόσης εμπιστοσύνης
body weight	ανθρώπινο βάρος
carrier gas flow	ροή φέροντος αερίου
certified reference material	πιστοποιημένο υλικό αναφοράς
cholesterol	χοληστερόλη
conditioning	ενεργοποίηση
cold vapor atomic fluorescence spectrometry	φασματομετρία ατομικού φθορισμού ψυχρού ατμού
deep water rose shrimp	ροζ γαρίδα βαθέων υδάτων
dimethylarsinate/dimethylarsinic acid	Διμεθυλοαρσενικώδες/ διμεθυλαρσενικικό οξύ
docosahexaenoic acid	εικοσιδυοεξενοϊκο οξύ

eicosapentaenoic acid	εικοσιπεντενοϊκό οξύ
elution	έκλουση
estimated weekly intake per meal size	εκτιμώμενη εβδομαδιαία πρόσληψη
estimated daily intake per meal size	εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη
flash evaporator	συσκευή κενού
flow	ροή
free fatty acids	ελεύθερα λιπαρά οξέα
gas chromatography	αέρια χρωματογραφία
gas chromatography-flame ionization detector	αέρια χρωματογραφία-ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας
giant red shrimp	γιγαντιαία κόκκινη γαρίδα
high-density lipoproteins	καλή χοληστερόλη
high performance liquid chromatography	υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
high performance liquid chromatography-diode array detector	υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης-ανιχνευτή συστοιχίας διόδων
high performance thin layer chromatography	χρωματογραφία υψηλής απόδοσης λεπτής στιβάδας
hypercholesterolaemic fatty acids	υπερχοληστερολαιμικά λιπαρά οξέα
hypocholesterolaemic fatty acids	υποχοληστερολαιμικά λιπαρά οξέα
inductively coupled plasma mass spectrometry	φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος
injection volume	όγκος έχγυσης
inorganic arsenic	ανόργανο αρσενικό
integration time	χρόνος ολοκλήρωσης
isocratic elution	ισοκρατική έκλουση
linoleic acid	λινελαϊκό οξύ
loading	μεταφορά

low-density lipoproteins	κακή χοληστερόλη
macrominerals	μακροστοιχεία
makeup gas flow	ρυθμός κατανάλωσης αερίου
methylarsonate	μεθυλο-αρσονικικό
microminerals/trace elements	μικροστοιχεία/ιχνοστοιχεία
mobile phase	κινητή φάση
molar ratio	μοριακός λόγος
monomethylarsonic acid	μονομεθυλαρσονικικό οξύ
monounsaturated fatty acids	μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
nebulizer	ατομοποιητής
neutral lipids	ουδέτερα λιπίδια
northern shrimp	γαριδάκι Αρκτικής
oil of cod liver	μουρουνέλαιο
organic arsenic	οργανικό αρσενικό
phosphatidylcholine	φωσφατιδυλοχολίνη
phosphatidylethanolamine	φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
phosphatidylinositol	φωσφατιδυλοινοσίτης
phosphatidylserine	φωσφατιδυλοσερίνη
phosphoinositides	φωσφοϊνοσιτίδια
plasma gas flow	ροή αέριου πλάσματος
polyunsaturated fatty acids	πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
polar lipids	πολικά λιπίδια
power	ισχύς
preparative thin layer chromatography	παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
provisional tolerable weekly intake	προσωρινά ανεκτά όρια εβδομαδιαίας πρόσληψης

recommended daily intake	συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη
retention time	χρόνος κατακράτησης
reversed phase	αντίστροφης φάσης
saturated fatty acids	κορεσμένα λιπαρά οξέα
solid phase extraction	εκχύλιση στερεάς φάσης
sphingomyelin	σφιγγομυελίνη
stationary phase	ακίνητη φάση
sterols	στερόλες
sterol esters	εστέρες στερολών
temperature column	θερμοκρασία στήλης
tetramethylarsonium ion	ιόν της τετραμεθυλαρσίνης
thin layer chromatography	χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
thin layer chromatography-flame ionization detector- flame photometry detector	χρωματογραφία λεπτής στιβάδας-ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας υδρογόνου-φωτομετρικός ανιχνευτής
thrombogenic index	θρομβογενετικός δείκτης
time-of flight mass spectrometry	φασματομετρία μαζών χρόνου πτήσης
tolerable weekly intake	ανεκτό όριο εβδομαδιαίας πρόσληψης
torch i.d.	διάμετρος πυρσού
total arsenic	ολικό αρσενικό
total fatty acids	ολικά λιπαρά οξέα
total lipids	ολικά λιπίδια/ολικό λίπος
tolerable weekly intake	ανεκτά όρια εβδομαδιαίας πρόσληψης
tolerable exposure	ανεκτή έκθεση
triglycerides	τριγλυκερίδια
trimethylarsine oxide	οξείδιο της τριμεθυλαρσίνης

trimethylated arsenic fatty acids alcohols	τριμεθυλιωμένες λιπαρές αλκοόλες αρσενικού
void	κενό
washing	έκπλυση
wet weight	βάρος νωπού ιστού
World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

Ακρωνύμια	**Ανάπτυξη**
AA	Arachidonic Acid
AB	Arsenobetaine
AC	Arsenocholine
AI	Atherogenic Index
ALA	a-Linolenic Acid
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
AsFAs	Arsenic-containing Fatty Acids
AsHCs	Arsenic-containing Hydrocarbons
As-sug	Arsenosugars
As-sugPLs	Arsenosugar phospholipids
BHT	Butylhydroxytoluene
BMDL	Benchmark Dose lower confidence Limit
bw	body weight
Chol	Cholesterol
CI	Cholesterol Index
cps	counts per seconds
CRM	Certified Reference Material
CSI	Choloesterol-Saturated fat Index
CVAFS	Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectrometry
DG	Diglycerides
DHA	Docosahexaenoic Acid
DHL	High-Density Lipoproteins
DMA	Dimethylarsinate/Dimethylarsinic Acid
DMAB	Dimethylarsenobutanoic Acid
DMAP	Dimethylarsinoyl Propionic Acid
DTU	Technical University of Denmark
EFSA	European Food Safety Authority
EPA	Eicosapentaenoic Acid

EDIm	Estimated Daily Intake per meal size
EWIm	Estimated Weekly Intake per meal size
FAME	Fatty Acids Methyl Esters
FFA	Free Fatty Acids
GC-FID	Gas Chromatography-Flame Ionization Detector
HPLC-DAD	High Performace Liquid Chromatography-Diode Array Detector
HPLC-ICPMS	High Performace Liquid Chromatography- Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
iAs	Inorganic Arsenic
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry
ISSFAL	International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LA	Linoleic Acid
LDL	Low-Density Lipoproteins
MA	Methylarsonate/Methylarsonic Acid
MG	Monoglycerides
MMA	Monomethylarsonic Acid
MUFA	Monounsaturated Fatty Acids
n.c.	not calculated
n.d.	not detected
NL	Neutral Lipids
org-As	Organic Arsenic
PC	Phosphahtidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PI	Phosphatidylinositol
PIPs	Phosphoinositides
PL	Polar Lipids
PS	Phosphatidylserine
PTLC	Preparative Thin Layer

PTWI	Provisional Tolerable Weeky Intake
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids
RDI	Recommended Daily Intake
RF-HPLC	Reversed-phase High Performace Liquid Chromatography
SD	Standard Deviation
SFA	Saturated Fatty Acids
SM	Sphingomyelin
SPE	Solid Phase Extraction
tAs	Total Arsenic
TETRA/TeMA	Tetramethylarsonium Ion
TFA	Total Fatty Acids
TG/TAG	Triglycerides
TI	Thrombogenic Index
TL	Total Lipids
TLC	Thin Layer Chromatography
TLC-FID	Thin Layer Chromatography-Flame Ionization Detector
TMAO	Trimethylarsine Oxide
TMAsFOHs	Trimethylated Arsenic Fatty Alcohols
TWI	Tolerable Weekly Intake
US EPA	United States-Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization
ww	wet weight
AA	Αραχιδονικό οξύ
ALA	α-λινολενικό οξύ
ANSA	Άμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ
As^{V}	Αρσενικικό οξύ
As^{III}	Αρσενικώδες οξύ
ATP	Τριφωσφορική Αδενοσίνη
DMA^{V}	Διμεθυλοαρσενικικό οξύ
DMA^{III}	Διμεθυλοαρσενικώδες οξύ
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΕΛΚΕΘΕ	Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών

MMA^{V}	Μονομεθυλοαρσονικικό οξύ
MMA^{III}	Μονομεθυλοαρσονικώδες οξύ
LA	Λινελαϊκό οξύ
Σ.Η.Π.	Συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. C.P. Hickman, L.S. Roberts and A. Larson, *Integrated principles of zoology*, 11th edition, McGraw-Hill Higher Education, 2001 (μετ. Μ. Αποστολοπούλου, Μ. Αποστολοπούλου, Μ. Βεϊνή, Μ. Θεσσαλού-Λεγάκη, Α. Λεγάκις, Π. Μεγαλοφώνου, Α. Νικολαΐδου και Ρ. Τζαννετάτου-Πολυμένη, έκδοση 2002).
2. J. L. Bonilla-Gómez, X. Chiappa-Carrara, C. Galindo, G. Jeronimo, G. Cuzon and G. Gaxiola, Physiological and biochemical changes of wild and cultivated juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Crustacea: Penaeidae) during molt cycle, *Journal of Crustacean Biology*, 2012, vol. 32, no. 4, pp. 597-606.
3. W. Promwikorn, P. Kirirat and P. Thaweethamsewee, Index of molt staging in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2004, vol. 26, no. 5, pp. 765–772**.**
4. L. M. Passano, Molting and its control, *Metabolism and Growth* edited by T. Waterman, 1960, chapter 15th, pp.473-536.
5. G. A. Ahearn, P. K. Mandal and A. Mandal, Calcium regulation in crustaceans during the molt cycle: a review and update, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 2004, vol. 137, no. 2, pp. 247-257.
6. K. A. Keteles and J. W. Fleeger, The contribution of ecdysis to the fate of copper, zinc and cadmium in grass shrimp, *Palaemonetes pugio Holthius, Marine Pollution Bulletin*, 2001, vol. 42, no. 12, pp. 1397-1402.
7. I. Pérez Farfante and B. Kensley, Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world, *Memoires du Museum National d'Histoire Naturel*, 1997, vol. 175, pp. 233.
8. FAO Species Catalogue, Shrimps and prawns of the world, *An Annotated Catalogue of Species of Interest to Fisheries*, vol. 1, Rome, 1980.
9. A. Koukouras, A. Kallianiotis, C. Papaconstantinou, D. Vafidis and M.S. Kitsos, Distribution and habitats of the commercial shrimps of the Aegean Sea, Proceedings of the 5th *Hellenic Symposium on Oceanography and Fisheries*, 1997, vol. 2, pp. 95-98 (in greek).
10. M. V. Fernández, S. Heras, F. Maltagliati and M. I. Roldán, Deep genetic divergence in giant red shrimp *Aristaeomorpha foliacea* (Risso, 1827) across a wide distributional range, *Journal of Sea Research*, 2013, vol. 76, pp. 146-153.

11. Κ. Β. Καπίρης, *Βιολογία και αλιεία των γαρίδων των βαθιών νερών Aristaeomorpha foliacea (Risso, 1827) και Aristeus antennatus (Risso, 1816) (Decapoda: Dendrobranchiata),* Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2004.
12. A. Matarrese, G. D'Onghia, A. Tursi and M. Panza, Experimental catches of *Aristeus antennatus* and *Aristaeomorpha foliacea* in the Ionian sea (Central Mediterranean). In: Life cycles and fisheries of the deep-water red shrimps *Aristaeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus*. Proc. of the *International workshop* held in the Instituto di Tecnologia della Pesca e del Pescato, M.L. Bianchini and S. Ragonese (editors), N.T.R. - I.T.P.P., 1994, pp. 57-58.
13. C. Papaconstantinou and K. Kapiris, The biology of the giant red shrimp *(Aristaeomorpha foliacea*) on an unexploited fishing ground in the Greek Ionian*, Sea Fisheries Research*, 2003, vol. 62, pp. 37-51.
14. S. Ragonese, M. L. Bianchini and V. F. Gallucci, Growth and mortality of the red shrimp *Aristaeomorpha foliacea* in the Sicilian channel (Mediterranean Sea), *Crustaceana*, 1994c, vol. 67, pp. 348-361.
15. K. Kapiris and S. Kavvadas, Morphometric study of the red shrimp *Aristeus antennatus* in the Eastern Mediterranean, *Aquatic Ecology*, 2009, vol. 43, pp. 1061–1071.
16. Ch. Mytilineou, S. Kavadas, C.-Y. Politou, K. Kapiris, A. Tursi and P. Maiorano, Catch composition on red shrimps' (*Aristaeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus*) grounds in the Eastern Ionian Sea, *Hydrobiologia*, 2006, vol. 557, pp.155–160.
17. K. Kapiris and M. Thessalou-Legaki, Comparative reproduction aspects of the deep-water shrimps *Aristaeomorpha foliacea* and *Aristeus antennatus* (Decapoda, Aristeidae) in the Greek Ionian Sea (Eastern Mediterranean), *International Journal of Zoology*, 2008, vol. 2009.
18. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), Scientific cooperation to support responsible fisheries in the Adriatic Sea by *Italian Ministry of Agriculture Food and Forestry Policies.*
19. K. Kapiris, Feeding ecology of *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) (Decapoda: Penaeidae) from the Ionian Sea (Central and Eastern Mediterranean Sea), *Scientia Marina*, 2004, vol. 68, no. 2, pp. 247-256.

20. K. Kapiris, O. Markovic, D. Klaoudatos and M. Djurovic, Contribution to the biology of *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) in the South Ionian and South Adriatic Sea, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, vol.13, pp. 647-656.
21. K. Kapiris, Ch. Mytilineou, C.Y. Politou, S. Kavadas, and A. Conides, Research on shrimps' resources and fishery in Hellenic waters, *State of Hellenic waters*, 2007, pp. 421-432.
22. M. Arculeo, G. Galioto and A. Cuttitta, Aspetti riproduttivi in *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda) nel Golfo di Castellammare (Sicilia N/W). *Biologia Marina*, Supplemento Notiziario S.I.B.M., 1993, vol. 1, pp. 307-308.
23. I. Sobrino, C. Silva, M. Sbrana and K. Kapiris, Biology and fisheries of deep water rose shrimp *(Parapenaeus longirostris)* in European Atlantic and Mediterranean water, *Crustaceana*, 2005, vol. 78, no. 10, pp. 1153-1184.
24. Responsible Sourcing Guide: cold water prawns, *Seafish*, version 5, March 2012.
25. K. Wieland, Changes in recruitment, growth, and stock size of northern shrimp (*Pandalus borealis*) at West Greenland: temperature and density-dependent effects at released predation pressure, *Journal of Marine Science*, 2005, vol. 62, pp. 1454-1462.
26. Ν. Γαλανοπούλου, Γ. Ζαμπετάκης, Μ. Μακρή και Α. Σιαφάκια, *Διατροφή και Χημεία Τροφίμων,* Εργαστήρια Βιοχημείας και Χημείας Τροφίμων, Αθ. Σταμούλης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2007.
27. J. Kuriyan, B. Konforti and D. Wemmer, The Molecules of Life: Physical and chemical principles, *Garland Science*, Taylor & Francis Group, LLC, 2013.
28. J. B. Berg, J. L. Tymoczko and L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, 5th ed., 2002.
29. D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, 4th ed., 2004.
30. S. Hatziantoniou and C. Demetzos, Lipids of membranes: Chemistry, biological role and applications as drug carriers, *Studies in Natural Products Chemistry*, 2008, vol. 34, pp.173-202.
31. C. Dawczynski, M. E. Kleber, W. März, G. Jahreis, S. Lorkowski, Saturated fatty acids are not off the hook, *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 2015, vol. 25, no. 12, pp. 1071-1078.

32. L. Hooper, C.D. Summerbell, R. Thompson, D. Sills, F. G. Roberts, H.J. Moore and G. D. Smith, Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012, vol. 5, pp. CD002137.
33. M. U. Jakobsen, E. J. O'Reilly, B.L. Heitmann, M.A. Pereira, K. Bälter, G.E. Fraser, U. Goldbourt, G. Hallmans, P. Knekt, S. Liu, P. Pietinen, D. Spiegelman, J. Stevens, J. Virtamo, W.C. Willett and A. Ascherio, Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2009, vol. 89, no. 5, pp. 1425–1432.
34. R. Micha and D. Mozaffarian, Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: a fresh look at the evidence, *Lipids*, 2010, vol. 45, no. 10, pp. 893–905.
35. P. W. Siri-Tarino, Q. Sun, F. B. Hu, and R. M. Krauss, Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2009, vol. 91, no. 3, pp. 535-546.
36. M. B. Bos, J. H. M. de Vries, E. J. M. Feskens, S. J. van Dijk, D. W. M. Hoelen, E. Siebelink, R. Heijligenberg and L.C.P.G.M. de Groot, Effect of a high monounsaturated fatty acids diet and a Mediterranean diet on serum lipids and insulin sensitivity in adults with mild abdominal obesity, *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases,* 2010, vol. 20, no. 8, pp. 591-598.
37. H. C. Bucher, P. Hengstler, C. Schindler and G. Meier, N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials, *The American Journal of Medicine,* 2002, vol. 112, no. 4, pp. 298–304.
38. D. Mozaffarian and E. B. Rimm, Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits, *Journal of the American Medical Association*, 2006, vol. 296, pp. 1885–99.
39. C. P. Calder, n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, vol. 83, pp.1505–19.
40. A. Richardson and M. Ross, Physical signs of fatty acid deficiency, *Food and Behaviour Research*, 2004.
41. C. Jacobsen, Enrichment of foods with omega-3 fatty acids: a multi-disciplinary challenge, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, vol. 1190, pp.141-150.

42. R. Uauy-Dagach, Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids, *Nutrition Reviews*, 1996, vol. 54, pp. 102–108.
43. E. A. Trautwein, N-3 Fatty acids – physiological and technical aspects for their use in food, *European Journal of Lipid Science and Technology,* 2001, vol. 103, pp.44-45.
44. D. Mischoulon and M. Fava, Docosahexaenoic acid and omega-3 fatty acids in depression, *Psychiatric Clinics of North America*, 2000, vol. 23, pp. 785–794.
45. A. D. Woods, Cholesterol levels, *Nursing*, 2010, vol.40, no. 8, p. 31.
46. J. Bernal, J. A. Mendiola, E. Ibáñez and A. Cifuentes, Advanced analysis of nutraceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, vol. 55, no. 4, pp.758–774.
47. M. Miller, N. J. Stone, C. Ballantyne, V. Bittner, M.H. Criqui et al., Triglycerides and cardiovascular disease: A scientific statement from the American Heart Association, *Circulation*, 2011, vol. 123, no. 20, pp. 2292-333.
48. B. G. Nordestgaard and A. Varbo, Lipids and cardiovascular disease 3: Triglycerides and cardiovascular disease, *Lancet*, 2014, vol. 384, pp. 626–635.
49. P. Schwandt, The triglyceride controversy: a review of the data, *European Heart Journal*, 1990, vol. 11, Supplement H, pp. 38-43.
50. A. V. Rao and L. G. Rao, Carotenoids and human health, *Pharmacological Research*, 2007, vol. 55, pp. 207–216.
51. N. M. Sachindra, N. Bhaskar, N.S. Mahendrakar, N.S, Carotenoids in different body components of Indian shrimps, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005, vol. *85*, no. 1, pp. 167–172.
52. S. Paiva and R. Russell, Beta carotene and other carotenoids as antioxidants, *The Journal of the American College of Nutrition*, 1999, vol.18, pp. 426–33.
53. E.J. Johnson, The role of carotenoids in human health, *Nutrition in Clinical Care*, 2002, vol. 5, no. 2, pp. 47–9.
54. S. Agarwal and A. V. Rao, Carotenoids and chronic diseases, *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 2000, vol.17, no. 1-4, pp. 189–210.
55. A. Bendich, Carotenoids and the immune response, *The Journal of Nutrition,* 1989, vol. 119, no. 1, pp. 112-115.
56. J. E. Vance, Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids, *Journal of Lipid Research*, Thematic Review Series: Glycerolipids, 2008, vol. 49, pp. 1377–1387.

57. L. Paoletti, C. Elena, P. Domizi and C. Banchio, Role of phosphatidylcholine during neuronal differentiation, *Life*, 2011, vol.63, no. 9, pp.714-720.
58. J. Zhou, A.J. Ryan, J. Medh and R.K. Mallampalli, Oxidized lipoproteins inhibit surfactant phosphatidylcholine synthesis via calpain-mediated cleavage of CTP: Phosphocholine Cytidylyltransferase, *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no. 39, pp. 37032-37040.
59. Γ. Θ. Νούτσιος, Ι. Φλώρου, Ανασκόπηση του επιφανειοδραστικού παράγοντα των πνευμόνων: Από τον εργαστηριακό πάγκο στην κλινική πράξη, *Πνευμών*, 2013, τόμ. 26, no. 4, σελ. 1-5.
60. A. J. Ryan, B. B. Chen, P.R. Vennalaganti, F.C. Henderson, L. A. Tephly, A.B. Carter and R.K. Mallampalli, 15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J_2 impairs phosphatidylcholine synthesis and induces nuclear accumulation of thiol-modified cytidylyltransferase, *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, vol. 283, no. 3, pp. 24628–24640.
61. J. C. Robichaud, J. N. van der Veen, Z. Yao, B. Trigatti, D. E. Vance, Hepatic uptake and metabolism of phosphatidylcholine associated with high density lipoproteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA),* 2009, vol. 1790, no. 6, pp.538-551.
62. P. C. Choy, K. Tran, G. M. Hatch, E. A. Kroeger, Phospholipid metabolism in the mammalian heart, *Progress in Lipid Research*, 1997, vol. 36, no. 2–3, pp. 85–101.
63. J. H. Exton, Signaling through phosphatidylcholine breakdown, *The Journal of Biological Chemistry*,1990, vol. 265, no. 1, pp.1-4.
64. J. N. Clore, P. A. Harris, J. Li, A. Azzam, R. Gill, W. Zuelzer, W. B. Rizzo and W. G. Blackard, Changes in phosphatidylcholine fatty acid composition are associated with altered skeletal muscle insulin responsiveness in normal man, *Metabolism,* 2000, vol. 49, no. 2, pp. 232-238.
65. D. R Voelker, New perspectives on the regulation of intermembrane glycerolphospholipid traffic, *The Journal of Lipid Research*, 2003, vol. 44, no. 3, pp. 441-449.
66. A. A. Farooqui, A. Horrocks and T. Farooqui, Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions and involvement in neurological disorders, *Chemistry and Physics of Lipids*, 2000, vol. 106, no. 1, pp.1-29.

67. J. E. Vance and G. Tassena, Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells, *Biochimica et Biophysica Acta,* 2013, vol. 1831, no. 3, pp.543-554.
68. S. Jungmichel, K.B. Sylvestersen, C. Choudhary, S. Nguyen, M. Mann and M. L. Nielsen, Specificity and commonality of the phosphoinositide-binding proteome analyzed by quantitative mass spectrometry, *Cell Reports,* 2014, vol.6, no. 3, pp.578-591.
69. G. Di Paolo and P. De Camilli, Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics, *Nature*, 2006, vol. 443, pp. 651-657.
70. D. Poccia and B. Larijani, Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion, *Biochemical Journal*, 2009, vol. 418, no. 2, pp. 233-246.
71. A.H.Jr. Merrill, E-M. Schmelz, D.L. Dillehay, S. Spiegel, J.A. Shayman, J.J. Schroeder, R.T. Riley, K.A. Voss and E. Wang, Sphingolipids-the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997, vol. 142, no. 1, pp. 208–225.
72. H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki and J.P. Slotte, Cholesterol interactions with phospholipids in membranes, *Progress in Lipid Research*, 2002, vol. 41, no. 1, pp. 66–97.
73. R. N. Kolesnick and M. Krönke, Regulation of ceramide production and apoptosis, *Annual Review of Physiology*, 1998, vol. 60, pp. 643-665.
74. Y. Imai, X. Liu, J. Yamagishi, K. Mori, S. Neya and T. Hoshino, Computational analysis of water residence on ceramide and sphingomyelin bilayer membranes, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2010, vol. 29, no. 3, pp. 461-469.
75. G. Bono, F. Gai, P. G. Peiretti, C. Badalucco, A. Brugiapaglia, G. Siragusa, G. B. Palmegiano, Chemical and nutritional characterisation of the Central Mediterranean giant red shrimp (*Aristaeomorpha foliacea*): Influence of trophic and geographical factors on flesh quality, Food Chemistry, 2012, vol. 130, pp. 104-110.
76. R. Rosa and M. L. Nunes, Nutritional quality of red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso), pink shrimp, *Parapenaeus longirostris (*Lucas), and Norway lobster*, Nephrops norvegucis* (Linnaeus), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, vol. 84, no. 1, pp. 89-94.
77. J. Krzynowek and L. J. Panunzio, Cholesterol and fatty acids in several species of shrimps, *Journal of Food Science*, 1989, vol. 54, no. 2, pp. 237-239.

78. N. Bragagnolo, and D. B. Rodriguez-Amaya, Total lipid, cholesterol, and fatty acids of farmed freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and wild marine shrimps (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti, Xiphopenaeus kroyeri*), *Journal of Food Composition and Analysis*, 2001, vol. 14, pp. 359-369.
79. C. D. O'Leary and A. D. Matthews, Lipid class distribution and fatty acid composition of wild and farmed prawn, *Penaeus monodon (*Fabricius), *Aquaculture,*1990, vol. 89, pp. 65-81.
80. F. J. G. Muriana, V. Ruiz-Gutierrez, M. L. Gallardo-Guerrero and M. I. Mínguez-Mosquera, A study of the lipids and carotenoprotein in the prawn, *Penaeus japonicus*, *The Journal of Biochemistry*, 1993, vol. 114, no. 2, pp. 223-229.
81. P. Sriket, S. Benjakul, W. Visessanguan and K. Kijroongrojana, Comparative studies on chemical composition and thermal properties of black tiger shrimp *(Penaeus monodon)* and white shrimp *(Penaeus vannamei)* meats, *Food chemistry*, 2007, vol. 103, pp.1199-1207.
82. S. Miniadis-Meimaroglou, L. Kora and V. J. Sinanoglou, Isolation and identification of phospholipid molecular species in alpha wild marine shrimp *Penaeus kerathurus* muscle and cephalothorax*, Chemistry and Physics of Lipids*, 2008, vol.152, no. 2, pp.104-112.
83. K. Gopakumar and M. Rajendranathan Nair, Lipid composition of five species of Indian prawns, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1975, vol.26, no. 3, pp. 319–325.
84. P. Yerlikaya, O. K. Topuz, H. A. Buyukbenli, N. Gokoglu, Fatty acid profiles of different shrimps species: Effects of depth of catching, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2013, vol. 22, no. 3, pp. 290-297.
85. R. J. Miget and M. G. Haby, *Naturally-occurring compounds which create unique flavors in wild-harvested shrimp*, Extension Specialists in the Departments of Wildlife and Fisheries Sciences and Agricultural Economics, Texas A&M University, 2007.
86. J. Syama Dayal, A.G. Ponniah, H. Imran Khan, E.P. Madhu Babu, K. Ambasankar and K.P. Kumarguru Vasagam, Shrimps-a nutritional perspective, *Current Science,* 2013, vol. 103, no. 11, pp.1487-1491.
87. K. Tsape, V.J. Sinanoglou, S. Miniadis-Meimaroglou, Comparative analysis of the fatty acid and sterol profiles of widely consumed Mediterranean crustacean species, *Food Chemistry*, 2010, vol. 122, no. 1, pp. 292-299.

88. K. S. Sidhu, Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2003, vol. 38, no. 3, pp. 336–344.
89. Global Recommendations for EPA and DHA Intake, April 2014, Global Omega-3 Intake Recommendations.
90. G. C Burdge, The role of docosahexaenoic acid in brain development and fetal alcohol syndrome, *Biochemical Society Transactions*, 1998, vol. 26, pp. 246–252.
91. E. D. Bligh and W. J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 1959, vol. 37, no. 8, pp. 911–917.
92. F. H. Nielsen, Evolutionary events culminating in specific minerals becoming essential for life*, European Journal of Nutrition*, 2000, vol. 39, no. 2, pp. 62–66.
93. Mineral Resources International, *Guide to Minerals and Trace Minerals: An explanation of the importance of specific minerals and how theirs source, form, and balance affect human health*, Inc. Ogden, Utah 84401, United States of America, 2012.
94. P. B. Tchounwou, C. G. Yedjou, A. K. Patlolla and D. J. Sutton, *Heavy metals toxicity and the environment*, National Institute of Health Public Assess, 2012, vol. 101, pp. 133–164.
95. E. Huskisson, S. Maggani and M. Ruf, The role of vitamins and minerals in energy metabolism and well-being, *The Journal of International Medical Research*, 2007, vol. 35, pp. 277 – 289.
96. F. Dang and W. X. Wang, Antagonistic interaction of mercury and selenium in a marine fish is dependent on their chemical species, *Environmental Science & Technology*, 2011, vol. 45, pp. 3116–3122.
97. H.D. Belitz*,* W. Grosch and P. Schieberle, Minerals, *Food Chemistry*, 4th revised and extended edition, Springer, pp. 421-428 & 468-469.
98. V. K. Bansal, Serum inorganic phosphorus, *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations,* 3rd edition, 1990, chap. 198, pp. 895-899.
99. ΚΥΑ Υ1/ΓΠ/127962/03, ΦΕΚ Β 395/27.2.2004: Εναρμόνιση της Εθνικής Νομοθεσίας προς την αντίστοιχη Κοινοτική 0Δ/2002/46/ΕΚ "Σχετικά με τα συμπληρώματα διατροφής".

100. F. H. Nielsen, Other trace elements, *Present knowledge in nutrition*, E.E. Ziegler L. J. Filer, 7th Edition, chapter 35, Washington, 1996, pp. 353-377.
101. WHO (World Health Organization), *Nickel*, Environmental health criteria, International Programme on Chemical Safety, Geneva, 1991, vol. 108, pp. 383.
102. A. Sigel, H. Sigel and R. K. O. Sigel, *Cadmium: From Toxicity to Essentiality,* Springer Science+Business Media Dordrecht, Heidelberg New York London, 2013.
103. Nordic Council of Ministers, *Cadmium Review*, 2003.
104. EU SCOOP, *Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States,* Report of experts participating in Task 3.2.11, Directorate-General Health and Consumer Protection, 2004.
105. M. Wiemann, K. Schirrmacher and D. Büsselberg, Interference of lead with the calcium release activated calcium flux of osteoblast-like cells, *Calcified Tissue International*, 1999, vol. 65, pp. 479–485.
106. P. Lyn, Lead toxicity part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity, *Alternative Medicine Review*, 2006, vol. 11, no. 2, pp. 114-127.
107. Food Safety Authority of Ireland, *Mercury, lead, cadmium, tin and arsenic in food,* Toxicology Factsheet Series, May 2009, no 1, pp. 1-13.
108. G. Flora, D. Gupta and A. Tiwari, Toxicity of lead: A review with recent updates, *Interdisciplinary Toxicology*, 2012, vol. 5, no. 2, pp. 47–58.
109. R.A. Goyer, Lead toxicity: current concerns*, Environmental Health Perspectives*, 1993, vol. 100, pp. 177–187.
110. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), Evaluation of certain food additives and contaminants, Seventy-second report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, *WHO technical report series* 959, 2011a.
111. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), Evaluation of certain food additives and contaminants, Seventy-third report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, *WHO technical report series* 960*,* 2011b.
112. WHO (World Health Organization)*, Exposure to mercury: a major public health concern*, Switzerland, 2007.

113. P. Olmedo, A. Pla, A.F. Hernández, F. Barbier, L. Ayouni, F. Gil, Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish and shellfish samples. Risk assessment for the consumers, *Environment International*, 2013, vol. 59, pp. 63–72.
114. Commission Regulation (EC) No 1881/2006, *Official Journal of the European Union*, December 2006.
115. B. Austin, The aquaculture industry, *Microbiology Today*, 2014, vol. 41, no. 4, pp. 166-169.
116. A. Oksuz, A. Ozyukmaz, M. Aktas, G. Gercek, J. Motte, A Comparative study on proximate, mineral and fatty acid compositions of deep seawater rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*, Lucas 1846) and red shrimp (*Plesionika martia*, A. Milne-Edwards, 1883), *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2009, vol. 8, no. 1, pp. 183-198.
117. Y. Yanar and M. Celik, Seasonal amino acid profiles and mineral contents of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844) and speckled shrimp (*Metapenaeus monoceros* Fabricus, 1789) from the Eastern Mediterranean, *Food Chemistry*, 2006, vol. 94, pp. 33-36.
118. S. Barrento, A. Marques, B. Teixeira, M. L. Carvalho, P. Vaz-Pires and M. L. Nunes, Influence of season and sex on the contents of minerals and trace elements in brown crab (*Cancer pagurus*, Linnaeus, 1758), *Journal of Agriultural and Food Chemistry,* 2009, vol. 57, pp. 3253–3260.
119. M. F. Hughes, B. D. Beck, Y. Chen, A. S. Lewis and D. J. Thomas, Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective, *Toxicological Sciences*, 2011, vol. 123, no. 2, pp. 305–332.
120. V. Sele, *Method development and analysis of arsenolipids in marine oils*, Doctoral Dissertation, Institute of Biology, University of Bergen, Norway, 2014.
121. Α. Κανάκη, *Ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό ενώσεων αρσενικού και των αλληλεπιδράσεών τους σε περιβαλλοντικά-βιολογικά συστήματα*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 2009.
122. D. A Scoog, F. J. Holler and T. A. Newman, *Αρχές της ενόργανης Ανάλυσης*, 5th ed., μετ. Μ. Καραγιάννης, Κ. Ευσταθίου και Ν. Χανιωτάκης, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, 2002.

123. P. L. Smedley and D. G. Kinniburgh, A Review on the sources, behaviour and distribution of arsenic in natural waters, *Applied Geochemistry,* 2002, vol. 17, pp. 517–568.
124. V. Sele, J. J. Sloth, A. K. Lundebye, E. H. Larsen, M. H. G. Berntssen and H. Amlund, Arsenolipids in marine oils and fats: A review of occurrence, chemistry and future research needs, *Food Chemistry,* 2012, vol. 133, no. 3, pp. 618-630.
125. V. M. Dembitsky and T. Rezanka, Natural occurrence of arseno compounds in plants, lichens, fungi, algal species, and microorganisms, *Plant Science*, 2003, vol. 165, pp. 1177–1192.
126. S. Ruangwises and N. Ruangwises, Concentrations of total and inorganic arsenic in fresh fish, mollusks, and crustaceans from the gulf of Thailand, *Journal of Food Protection*, 2011, vol. 74, no. 3, pp. 450–455.
127. US EPA (United States Environmental Protection Agency*), Exposure and health effects*, Health and Ecological Criteria Division, Washington, 2001.
128. M. Vahter, Mechanisms of arsenic biotransformation, *Toxicology*, 2002, vol. 181-182, pp. 211-217.
129. Y. Shibata, M. Morita and K. Fuwa, Selenium and arsenic in biology: their chemical forms and biological functions, Advances in Biophysics, 1992, vol. 28, pp. 31–80.
130. E. Schmeisser, W. Goessler and K. A. Francesconi, Human metabolism of arsenolipids present in cod liver, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, vol. 385, pp. 367-376.
131. G. Lunde, *The analysis and characterization of trace elements, in particular bromine, selenium and arsenic in marine organisms*, Doctoral Dissertation, Central Institute for Industrial Research (CIR), University of Oslo, Norway, 1974.
132. G. Lunde, Separation and analysis of organic-bound and inorganic arsenic in marine organisms, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1973, vol. 24, pp. 1021-1027.
133. K.A. Francesconi and J.S. Edmonds, Arsenic and marine organisms, *Advances in Inorganic Chemistry*, 1996, vol. 44, pp.147-189.
134. J.J. Sloth, K. Julshamn and A.K. Lundebye, Total arsenic and inorganic arsenic content in Norwegian fish feed products, *Aquaculture Nutrition*, 2005, vol. 11, pp. 61-66.

135. J.S. Edmonds, K.A. Francesconi, J.R. Cannon, C.L. Raston, B.W. Skelton and A.H. White, Isolation, crystal structure and synthesis of arsenobetaine, the arsenical constituent of the western rock lobster *palinurus longipes cygnus* George, *Tetrahedron Letters,* 1977, vol. 18, no. 18, pp. 1543–1546.
136. J.S. Edmonds, K.A. Francesconi and R.V. Stick, Arsenic compounds from marine organisms, *Natural Product Reports*, 1993, vol. 10, pp. 421-428.
137. A. Holmes, Arsenic content of American cod liver oil. *Industrial and Engineering Chemistry*, 1934, vol. 26, no. 5, pp. 573-574.
138. G. Lunde, Occurence and transformation of arsenic in the marine environment, *Environmental Health Perspectives*, 1977, vol. 19, pp. 47-52.
139. M.S. Taleshi, J.S. Edmonds, W. Goessler, M.J. Ruiz-Chancho, G. Raber, K.B. Jensen and K.A. Francesconi, Arsenic-containing lipids are natural constituents of sashimi tuna, *Environmental Science & Technology*, 2010, vol. 44, no. 4, pp.1478-1483.
140. K.-i. Ebisuda, T. Kunito, J. Fujihara, R. Kubota, Y. Shibata and S. Tanabe, Lipid-soluble and water-soluble arsenic compounds in blubber of ringed seal (*Pusahispida*), *Talanta*, 2003, vol. 61, no. 6, pp. 779-787.
141. M. Morita and Y. Shibata, Isolation and identification of arsenolipid from a brown alga, *Undaria Pinnatifida* (Wakame), *Chemosphere*, 1988, vol. 17, no. 6, pp. 1147-1152.
142. A. Rumpler, J.S. Edmonds, M. Katsu, K.B. Jensen, W. Goessler, G. Raber, H. Gunnlaugsdottir and K.A. Francesconi, Arsenic-containing long-chain fatty acids in cod-liver oil: A result of biosynthetic infidelity, *Angewandte Chemie International Edition,* 2008, vol. 47, no. 14, pp. 2665-2667.
143. M.S. Taleshi, K.B. Jensen, G. Raber, J.S. Edmonds, H. Gunnlaugsdottir and K.A. Francesconi, Arsenic-containing hydrocarbons: natural compounds in oil from the fish capelin, *Mallotus villosus*, *Chemical Communications,* 2008, no. 39, pp. 4706-4707.
144. K.O. Amayo, A. Raab, E.M. Krupp, H. Gunnlaugsdottir and J. Feldmann, Novel identification of arsenolipids using chemical derivatizations in conjunction with RP-HPLC-ICPMS/ESMS, *Analytical Chemistry*, 2013, vol. 85, no. 19, pp. 9321-9327.
145. J. J. Wrench, S.W. Fowler and M.Y. Ünlü, Arsenic metabolism in a marine food chain, *Marine Pollution Bulletin,* 1979, vol. 10, pp. 18-20.

146. M.F. Hughes, Biomarkers of exposure: A case study with inorganic arsenic, *Environmental Health Perspectives*, 2006, vol. 114, pp. 1790-1796.
147. W.R. Cullen and K.J. Reimer, Arsenic speciation in the environment, *Chemical Review*, 1989, vol. 89, pp. 713-764.
148. M. Molin, S.M. Ulven, L. Dahl, V.H. Telle-Hansen, M. Holck, G. Skjegstad, O. Ledsaak, J.J. Sloth, W. Goessler, A. Oshaug, J. Alexander, D. Fliegel, T.A. Ydersbond and H.M. Meltzer, Humans seem to produce arsenobetaine and dimethylarsinate after a bolus dose of seafood, *Environmental Research*, 2012, vol. 112, pp. 28–39.
149. J.S. Petrick, F. Ayala-Fierro, W.R. Cullen, D.E. Carter, H.V. Aposhian, Monomethylarsonous acid (MMA^{III}) is more toxic than arsenite in chang human hepatocytes, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000, vol. 163, no. 2, pp. 203–207.
150. M. Vahter, Genetic polymorphisms in the biotransformation of inorganic arsenic and its role in toxicity, *Toxicology Letters*, 2000, vol. 112, pp. 209–217.
151. A. L. Moxon, The effect of arsenic on the toxicity of seleniferous grains, *Science*, 1938, vol. 88, pp. 81.
152. O.A. Levander and C.A. Baumann, Selenium metabolism: V. Studies on the distribution of selenium in rats given arsenic, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1966, vol.9, pp. 98-105.
153. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), Handling and processing shrimp, Department of trade and industry. *Torry Research Station,* Torry advisory note no. 54.
154. O. Eigaard and S. Munch-Petersen, LPUE Standardisation of The Danish *Pandalus* fishery in Skagerrak and the Norwegian Deep, *NAFO SCR* Doc. 08/075, 2008.
155. Δ.Γ. Μπόσκου, *Μέθοδοι ξήρανσης*, Στοιχεία Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστημιακές εκδόσεις, Θεσσαλονίκη, 2002, σελ. 294-361.
156. Ε.Κ. Βουδούρης και Μ.Γ. Κοντομηνάς, *Ανάλυση τροφίμων: Θεωρία και εφαρμογές*, Οργανισμός Εκδόσεων Διδακτικών Βιβλίων, Αθήνα, 2010.
157. W. Horwitz, *Official methods of analysis of AOAC* (17th ed.), Gaithersburg MD, USA: AOAC International, 2000, vol. 32, p.2.
158. AOAC (Association of Official Analytical Chemists), *Official methods of analysis of AOAC*, Washington DC, USA: AOAC International, 2000.

159. A. H. Bou-Olayan, S. Al-Mattar, S. Al-Yakoob, S. Al-Hazeem, Accumulation of lead, cadmium, copper and nickel by pearl oyster, Pinctada radiata, from Kuwait marine environment, Marine Pollution Bulletin, 1995, vol. 30, no. 3, pp. 211-214.
160. CEN (European Committee for Standardization), Foodstuffs-Determination of elements and their chemical species. Determination of inorganic arsenic in foodstuffs of marine and plant origin by anion-exchange HPLC-ICP-MS, 2016, https://standards.cen.eu/index.html, accessed on 12/05-2016.
161. US-EPA (U.S. Environmental Protection Agency), Appendix to method 1631: Total mercury in tissue, sludge, sediment, and soil by acid digestion and BrCl oxidation, 2001, EPA-821-R-01-013.
162. D.C. Harris, μετ. Ν. Χανιωτάκης, Μ. Φουσκάκη, Κ. Περδικάκη, Β. Βαμβακάκη και Μ. Χατζημαρινάκη, *Ποσοτική χημική ανάλυση*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2009.
163. Ε.Ν.Σταθοπούλου, *Συμβολή στη χημική-περιβαλλοντική μελέτη του υδραργύρου σε θαλάσσια συστήματα και λεκάνες απορροής*, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ΠΜΣ Ωκεανογραφίας, 2009.
164. G.R. Bartlett, Phosphorus assay in column chromatography, *The Journal of Biological Chemistry,* 1959, vol. 234, no. 3, pp. 466-468, modified by C. Long and D.A. Staples, Chromatographic separation of brain lipids: cerebroside and sulphatide, *Biochemical Journal*, 1961, vol. 78, no. 1, pp. 179–185.
165. Ε.Κ. Βουδούρης και Μ.Γ. Κοντομηνάς, *Χρωματογραφία*, ανάλυση τροφίμων, θεωρία και εφαρμογές, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, 1987.
166. R.P.A. Sims and J.A.G. Larose, The use of iodine vapor as a general detecting agent in the thin layer chromatography of lipids, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1962, vol. 39, no. 4, pp. 232-232.
167. J.C. Dittmer and R.L. Lester, A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms, Journal of Lipid Research, 1964, vol. 5, no. 1, pp. 126-127.
168. R. J. Henderson and D. R. Tocher, *Thin-layer chromatography*, Lipid analysis: A practical approach, eds R. J. Hamilton and S. Hamilton, Oxford University Press, 1992, pp. 65-111.
169. Mitsubishi Kagaku Iatron, I, Iatroscan Application 13-1 Nishi-Goken-cho, Shinjuku-ku, Tokyo162 -0812 Japan, Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., 2007.

170. V.J. Sinanoglou, I.F. Strati, S.M. Bratakos, C. Proestos, P. Zoumpoulakis and S. Miniadis-Meimaroglou, On the combined application of Iatroscan TLC-FID and GC-FID to identify total, neutral, and polar lipids and their fatty acids extracted from foods, *International Scholarly Research Notices (ISRN Chromatography),* Hindawi Publishing Corporation, ID 859024, 2013, vol. 2013.
171. M.A. Kaluzny, L.A., Duncan, M.V. Merritt and D.E. Epps, Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns, *Journal of Lipid Research*, 1985, vol. 26, pp. 135–140.
172. AOCS (American Oil Chemists' Society), *Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids,* Official and Recommended Practices of the AOCS, 6th ed., Champaign, IL USA, Official method Ce 2–66, 2009.
173. AOCS (American Oil Chemists' Society), *Fatty acid composition by GLC – Marine oils,* Official and Recommended Practices of the AOCS, 6th ed., Champaign, IL USA, Official method Ce 1b–89, 2009b.
174. I.F. Strati, V.J. Sinanoglou, L. Kora, S. Miniadis-Meimaroglou and V. Oreopoulou, Carotenoids from foods of plant, animal and marine origin: an efficient HPLC-DAD separation method, *Foods*, 2012, vol.1, pp.52-65.
175. K.E. Carpenter and N. De Angelis, *The living marine resources of the Eastern Central Atlantic,* Volume 1: Introduction, crustaceans, chitons, and cephalopods, FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes, Rome, 2014.
176. R. Larsen, K. E. Eilertsen and E. O. Elvevoll, Health benefits of marine foods and ingredients, *Biotechnology* Advances, 2011, vol. 29, no. 5, pp. 508–518.
177. R. Gibson and P. L. Barker, The decapod hepatopancreas, *Oceanography and Marine Biology*, 1979, vol.17, no. 17, pp. 285-346.
178. M. P. Olgunoğlu, Heavy metal contents in muscle tissues of three deep-seawater mediterranean shrimp species (Plesionika martia, Plesionika edwardsii, Aristeus antennatus), *Polish Journal of Environmental Studies*, 2015, vol. 24, no. 6, pp. 2553-2557.
179. Χ. Βαλαβανίδου, *Μελέτη λιπιδίων, καροτενοειδών και μετάλλων στους μύες και κεφαλοθώρακες στης κατεψυγμένης γαρίδας Aristaeomorpha foliacea*, Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2013.

180. D. H. Jiang, H. N. William and H. Gong, Effects of temperature and salinity on nitrogenous excretion by *Litopenaeus vannamei* juveniles, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000, vol. 253, pp.193–209.
181. J. J. Johnston, H. A. Ghanbari, W. B. Wheeler and J. R. Kirk, Characterization of shrimp lipids, *Journal of Food Science*, 1983, vol. 48, no. 1, pp. 33-35.
182. C. E. Allen, *Lipid profiles of deep-sea organisms*, PhD Thesis, University of Southampton, School of ocean and earth science, United Kingdom of England, 1998.
183. M. Motasilm Billah, S. Eckel, T. J. Mullmann, R. W. Egan and M. I. Siegel, Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils, *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, vol. 264, no. 29, pp. 17069-17077.
184. H. Turan, Y. Kaya and M. E. Erdem, Proximate composition, cholesterol, and fatty acid content of brown shrimp (*Crangon crangon* L. 1758) from Sinop region, Black Sea Turan H, Kaya Y, Erdem ME. 2011. Proximate composition, cholesterol, and fatty acid content of brown shrimp (*Crangon crangon* L. 1758) from Sinop region, Black Sea, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2011, vol. 20, no. 1, pp.100–107.
185. S. Barrento, A. Marques, B. Teixeira, R. Mendes, N. Bandarra, P. Vaz-Pires and M. L. Nunes, Chemical composition, cholesterol, fatty acid and amino acid in two populations of brown crab *Cancer pagurus*: Ecological and human health implications, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, vol. 23, pp. 716-725.
186. D. J. McNamara and H. S. Thesmar, *Eggs,* Washington, DC, USA: Egg Nutrition Center, 2005.
187. D. Ayas, Y. Ozogul and H. Yazgan, The effects of season on fat and fatty acids contents of shrimp and prawn species, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2013, vol. 115, no. 3, pp. 356–362.
188. S.N. Manjabhat, B. Narayan, M.N. Subbanna, Carotenoids in *Solonocera indica* and *Aristeus alcocki*, deep-sea shrimp from Indian waters, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2006, vol. 15, no. 2, pp. 5–16.
189. A.P. Simopoulos, n-3 Fatty acids and human health: Defining strategies for public policy, *Lipids*, 2001, vol. 36, pp. S83–S89.

190. A.P. Simopoulos, The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2002, vol. 65, pp. 365-379.
191. V.J. Sinanoglou, I.F. Strati and S. Miniadis-Meimaroglou, Lipid, fatty acid and carotenoid content of edible egg yolks from avian species: A comparative study, *Food Chemistry*, 2011, vol. 124, no. 1, pp. 971–977.
192. T.L.V. Ulbricht and D.A.T. Southgate, Coronary heart disease: Seven dietary factors, *Lancet*, 1991, vol. 338, pp. 985-992.
193. J. Santos-Silva, R.J.B. Bessa and F. Santos-Silva, Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat, *Livestock Production Science,* 2002, vol. 77, pp. 187–194.
194. D.B. Zilversmit, *Cholesterol index of foods, Journal of the American Dietetic Association*, 1979, vol. 74, pp. 562–565.
195. S.L. Connor, J.R. Gustafson, S.M. Artaud-Wild, D.P. Favell, C.J. Classick-Kohn, L.F. Hatcher, W.E. Connor, The cholesterol/saturated-fat index an indication of the hypercholesterolemic and atherogenic potential of food, *Lancet*, 1986, vol. 327, pp. 1229–1232.
196. V.J. Sinanoglou, P. Koutsouli, C. Fotakis, G. Sotiropoulou, D. Cavouras, I. Bizelis, Assessment of lactation stage and breed effect on sheep milk fatty acids' profile and lipid quality indice, *Dairy Science and Technology*, 2015, vol. 95, pp. 509–531.
197. S. Takeungwongtrakul, S. Benjakul and A.H-kittikun, Lipids from cephalothorax and hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Compositions and deterioration as affected by iced storage, *Food Chemistry*, 2012, vol. 134, pp. 2066-2074.
198. A. Clarke, Lipid content and composition of the pink shrimp *Pandalus montagui* (Leach) (Crustacea: Decapoda), *Journal* of Experimental *Marine Biology* and *Ecology,* 1979, vol. 38, pp. 1-17.
199. N.M. Sachindra, N. Bhaskar and N.S. Mahendrakar, Carotenoids in different body components of Indian shrimps, *Journal* of the *Science* of *Food* and *Agriculture*, 2005, vol. 85, no. 1, pp. 167–172.
200. R. Armenta and I. Guerrero-Legarreta, Amino acid profile and enhancement of the enzymatic hydrolysis of fermented shrimp carotenoproteins, *Food Chemistry*, 2009, vol. 112, no. 2, pp. 310–315.

201. P. Kandra, M.M. Challa and H.K.P. Jyothi, Efficient use of shrimp waste: Present and future trends, *Applied Microbiology* and *Biotechnology*, 2012, vol. 93, no. 1, pp. 17–29.
202. M. E. Franco-Zavaleta, R. Jiménez-Pichardo, A. Tomasini-Campocosio and I. Guerrero-Legarreta, Astaxanthin extraction from shrimp wastes and its stability in 2 model systems, *Journal of Food Science*, 2010, vol. 75, no. 5, pp. C394–C399.
203. Y. Yanar, M. Çelik and M. Yanar, Seasonal changes in total carotenoid of wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus* and *Metapenaeus monoceros*) inhabiting the eastern Mediterranean, *Food Chemistry,* 2004, vol.88, no. 2, pp.267–269.
204. A.P. Sánchez-Camargo, M.A. Almeida Meireles, B.L.F. Lopes and F.A. Cabral, Proximate composition and extraction of carotenoids and lipids from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*), *Journal of Food Engineering*, 2011, vol. 102, no. 1, pp. 87–93.
205. C.Y. Politou, P. Maiorano, G. D'Onghia and C.H. Mytilineou, Deep water decapods crustacean fauna of the eastern Ionian Sea, *Belgian Journal of Zoology*, 2005, vol. 135, pp. 235-241.
206. S.E. Shumway, H.C. Perkins, D.F. Schick and A.P. Stickney, Synopsis of biological data on the pink shrimp, *Pandalus borealis* Krφyer, 1838., *FAO Fisheries Synopsis,* 1985, pp. 144.
207. A.H. Dökmeci, T. Yildiz, A. Ongen and N. Sivri, Heavy metal concentration in deepwater rose shrimp species (*Parapenaeus longirostris*, Lucas, 1846) collected from the Marmara Sea Coast in Tekirdağ, *Environmental Monitoring and Assessment*, 2014, vol. 186, pp. 2449–2454.
208. M.P. Olgunoğlu, I.A. Olgunoğlu, and Y.K. Bayhan, Heavy metal concentrations (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe) in giant red shrimp (*Aristaeomorpha foliacea* Risso 1827) from the Mediterranean Sea, *Polish Journal of Environmental Studies,* 2015, vol. 24, no. 2, pp. 631-635.
209. J. Tapia, L. Vargas-Chacoff, C. Bertrán, F. Peña-Cortés, E. Hauenstein, R. Schlatter, C. Jiménez and C. Tapia, Heavy metals in the liver and muscle of *Micropogonias manni* fish from Budi lake, Araucania region, Chile: Potential risk for humans, *Environmental Monitoring and Assessmen*t, 2012, vol. 184, no. 5, pp. 3141-3151.

210. G.P. Zauke, and I. Schmalenbach, Heavy metals in zooplankton and decapod crustacean from the Barents Sea, *Science of the Total Environment*, 2006, vol. 359, pp. 283– 294.
211. K. Julshamn, A.K. Lundebye, K. Heggstad, M.H.G. Berntssen and B. Boe, Norwegian monitoring program on the inorganic and organic contaminants in fish caught in the Barents Sea, Norwegian Sea and North Sea, 1994–2001*, Food Additives and Contaminants,* 2004, vol. 21, pp. 365–376.
212. A.L. Maulvault, P. Anacleto, H.M. Lourenço, M.L. Carvalho, M.L. Nunes, and A. Marques, Nutritional quality and safety of cooked edible crab (Cancer pagurus), *Food Chemistry*, 2012, vol. 133, pp. 227-283.
213. K. Julshamn, B.M. Nilsen, S. Frantzen, S. Valdersnes, A. Maage, K. Nedreaas and J. J. Sloth, Total and inorganic arsenic in fish samples from Norwegian waters*, Food Additives and Contaminants: Part B,* 2012, vol. 5, no. 4, pp. 229–35.
214. C. Copat, F. Bella, M. Castaing, R. Fallico, S. Sciacca and M. Ferrante, Heavy metals concentrations in fish from Sicily (Mediterranean Sea) and evaluation of possible health risks to consumers, *Bulletin* of *Environmental Contamination and Toxicology,* 2012c, vol. 88, pp. 78-83.
215. EFSA (European Food Safety Authority*),* Scientific opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food, *EFSA Journal,* 2012a, vol. 10, no. 12, pp. 2985.
216. M.S. Heu, J.S. Kim and F. Shahidi, Components and nutritional quality of shrimp processing by-products, *Food Chemistry*, 2003, vol. 82, pp. 235–242.
217. S.A. Olsen, A. Ervik and O. Grahl-Nielsen, Tracing fish farm waste in the northern shrimp *Pandalus borealis* (Krøyer, 1838) using lipid biomarkers, *Aquaculture Environment Interactions*, 2012, vol. 2, pp.133-144.
218. G. Flores-Mateo, A. Navas-Acien, R. Pastor-Barriuso and E. Guallar, Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2006, vol. 84, no. 4, pp.762-73.
219. K. Park and D. Mozaffarian, Omega-3 fatty acids, mercury, and selenium in fish and the risk of cardiovascular diseases, *Current Atherosclerosis Reports*, 2010, vol. 12, no. 6, pp. 414-22.
220. J. Burger, M. Gochfeld, C. Jeitner, M. Donio and T. Pittfield, Selenium: Mercury molar ratios in freshwater fish from Tennessee: Individual, species, and

geographical variations have implications for management, *EcoHealth*, 2012, vol. 9, no. 2, pp. 171–182.

221. G. Drava, R. Capelli, V. Minganti, R. De Pellegrini, L. Orsi Relini and M. Ivaldi, Trace elements in the muscle of red shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) (Crustacea, Decapoda) from Ligurian sea (NW Mediterranean): Variations related to the reproductive cycle, *Article in Science of The Total Environment*, 2004, vol. 321, no. 1-3, pp. 87-92.
222. E. Hernández-Marin, A. Barbosa and A. Martínez, The metal cation chelating capacity of astaxanthin. Does this have any influence on antiradical activity?, *Molecules*, 2012, vol.17, no. 1, pp. 1039-54.
223. A. Martínez, Astaxanthin interacting with metal clusters: free radical scavenger and photovoltaic materials, *Theoretical Chemistry Accounts*, 2016, vol. 135, pp. 130.
224. A. Martínez, Y. Romero, T. Castillo, M. Mascaró, I. López-Rull, N. Simões, F. Arcega-Cabrera, G. Gaxiola and A. Barbosa, The effect of copper on the color of shrimps: redder is not always healthier, *Plos One*, 2014, vol. 9, no. 9, pp. 1-5.
225. M. Plessi, D. Bertelli and A. Monzani, Mercury and selenium content in selected seafood, *Journal of Food Composition and Analysis,* 2001, vol. 14, pp. 461-467.
226. H.A. Kehrig, T.G. Seixas, A.P. Di Beneditto and O. Malm, Selenium and mercury in widely consumed seafood from South Atlantic Ocean*, Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, vol. 93, pp. 156-162.
227. E.H. Larsen, C.R. Quetel, R. Munoz, A. Fiala-Medioni and O.F.X. Donard, Arsenic speciation in shrimp and mussel from the Mid-Atlantic hydrothermal vents, *Marine Chemistry*, 1997, vol. 57, no. 3-4, pp. 341-346.
228. K.O. Amayo, A. Raab, E.M. Krupp and J. Feldmann, Identification of arsenolipids and their degradation products in cod-liver oil, *Talanta*, 2014, vol. 118, pp. 217-23.
229. M.S. Taleshi, R.K. Seidler-Egdal, K.B. Jensen, T. Schwerdtle and K.A. Francesconi, Synthesis and characterization of arsenolipids: naturally occurring arsenic compounds in fish and algae, *Organometallics*, 2014, vol. 33, no. 6, pp 1397–1403.
230. M.S. Taleshi, G. Raber, J.S. Edmonds, K.B. Jensen and K.A. Francesconi, Arsenolipids in oil from blue whiting *Micromesistius poutassou*-evidence for arsenic-containing esters, *Scientific Reports*, 2014, vol.4, no. 7492, pp. 1-7.

231. S. Meyer, J. Schulz, A. Jeibmann, M.S. Taleshi, F. Ebert, K.A. Francesconi and T. Schwerdtle, Arsenic-containing hydrocarbons are toxic in the in vivo model, *Metallomics,* 2014, vol. 6, no. 11, pp. 2010-4.
232. S. Meyer, M. Matissek, S.M. Müller, M.S. Taleshi, F. Ebert, K.A. Francesconi, T. Schwerdtle, In vitro toxicological characterisation of three arsenic-containing hydrocarbons, *Metallomics*, 2014, vol. 6, no. 5, pp. 1023-33.
233. D.W. Engel, M. Brouwer and S. McKenna, Hemocyanin concentrations in marine crustaceans as a function of environmental conditions, *Marine Ecology Progress Series*, 1993, vol. 93, pp. 235-244.
234. M. Brouwer, Oxygen carriers as molecular models of allosteric behavior, *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, 1992, vol. 13, pp 1-21.