



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ
ΒΛΕΝΝΑΣ ΤΟΥ ΣΑΛΙΓΚΑΡΙΟΥ *Helix aspersa*»



ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Φαρμακοποιός

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Προκόπιος Μαγιάτης

ΑΘΗΝΑ 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία είναι το αποτέλεσμα της φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα του Φαρμακευτικού Τμήματος Αθηνών, στον Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων. Η εκπόνηση της παρούσας εργασίας επετεύχθη χάρη στην πολύτιμη συμβολή φίλων και συνεργατών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την συμβολή αυτή:

- Τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, την καθηγήτρια κ. Ελένη Σκαλτσά, την καθηγήτρια κ. Ιωάννα Χήνου και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Προκόπιο Μαγιάτη, οι οποίοι δέχτηκαν να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία.
- Τον αναπληρωτή καθηγητή κύριο Προκόπιο Μαγιάτη, για την ανάθεση του θέματος, την διαρκή παρακολούθηση και καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια των δύο αυτών χρόνων.
- Την ΕΔΙΠ κ. Ελένη Μέλλιου για την επιστημονική και ψυχολογική συμβολή της στην εκπόνηση της εργασίας και για την ευρύτερη συνεργασία.
- Τους καθηγητές του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας φυσικών Προϊόντων για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσαν κατά την διάρκεια των μαθημάτων και τις συμβουλές τους κατά την διάρκεια της παρουσίας μου στον Τομέα.
- Την εταιρεία Benefit Farm Α.Ε και τον κύριο Καρέλλα Γιάννη για την παραχώρηση των δειγμάτων και την οικονομική ενίσχυση που μας προσέφεραν.
- Τον επίκουρο καθηγητή φαρμακολογίας κ. Νικόλαο Δρακούλη και την μεταδιδάκτορα Μάρθα Κατσαρού για την βοήθεια ολοκλήρωσης της κλινικής δοκιμής και την παροχή του απαραίτητου εξοπλισμού.
- Τον υποψήφιο διδάκτορα Παναγιώτη Διαμαντάκο για τις πολύτιμες συμβουλές του, την υπομονή του και τη συνεχή στήριξή του σε όλη τη διάρκεια της εργασίας μου.
- Τους φίλους μου και συνεργάτες Αιμιλία, Αννία, Ηλιάνα, Χρυσάνθη, Χρήστο και Βίκυ για την φιλία τους και για τις ευχάριστες στιγμές που ζήσαμε στο εργαστήριο.
- Τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του τμήματος για το ευχάριστο κλίμα
- Την οικογένεια μου και τους φίλους μου, για την διαρκή υλική και ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Βασικό αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της χημική σύστασης της βλέννας του σαλιγκαριού *Helix aspersa*, η απομόνωση μορίων μικρού μοριακού βάρους και η ταυτοποίηση τους καθώς επίσης και η ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικοποίησης για τις σημαντικότερες από αυτές. Επίσης, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε μια μικρής κλίμακας κλινική δοκιμή σχετικά με την επίδραση της βλέννας σαλιγκαριού στο δέρμα, όσο αφορά την ενυδάτωση και την αντιγήρανση, με σκοπό την ενσωμάτωσή της σε καλλυντικά προϊόντα.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας αυτής, αρχικά αναφέρονται κάποια γενικά στοιχεία για τα σαλιγκάρια, και ειδικότερα για το είδος *Helix aspersa* και τα δυο υποείδη του *Helix aspersa muller* και *Helix aspersa maxima* με τα οποία κυρίως θα ασχοληθούμε. Παραθέτονται πληροφορίες σχετικά με τη μορφολογία, την κατάταξή τους και τη χρήση τους από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα. Στη συνέχεια δίνονται βιβλιογραφικά στοιχεία σχετικά με τη χημική σύσταση της βλέννας του συγκεκριμένου είδους και την επίδραση της στο δέρμα. Τέλος, στα επόμενα κεφάλαια του πρώτου μέρους, περιγράφονται οι χημικές ιδιότητες, η βιολογική σημασία και ορισμένες μέθοδοι προσδιορισμού για τις κυριότερες ουσίες με τις οποίες θα ασχοληθούμε - την τριμεθυλογλυκίνη, την αλλαντοΐνη και το γλυκολικό οξύ.

Στο δεύτερο μέρος, παρουσιάζονται αναλυτικά όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκαν. Αρχικά, γίνεται μια γενική διερεύνηση της βλέννας με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR και έπειτα αναπτύσσεται η μέθοδος ανάλυσης του υλικού που θα χρησιμοποιηθεί στην συνέχεια. Ακολουθεί η απομόνωση με χρωματογραφία στήλης τεσσάρων ουσιών και ταυτοποίηση τους με φασματοσκοπία NMR, εκ των οποίων για πρώτη φορά από τη βλέννα σαλιγκαριού, απομονώθηκε η τριμεθυλογλυκίνη. Ακολούθως, γίνεται διαλεύκανση της απόδοσης της δομής πρότυπης αλλαντοΐνης, καθώς πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα ήταν εσφαλμένα. Στη συνέχεια, περιγράφεται η απομόνωση από την βλέννα του σαλιγκαριού της ιονισμένης μορφής της αλλαντοΐνης, η οποία περιγράφεται για πρώτη φορά με φασματοσκοπία NMR. Πραγματοποιήθηκε επίσης έλεγχος ύπαρξης κάποιων μικρών μορίων στη βλέννα σαλιγκαριού, συμπεριλαμβανομένου του γλυκολικού οξέος, ενώ μετά από ανάλυση της βλέννας σαλιγκαριού με σιλυλίωση σε αέριο χρωματογράφο (GC-MS) ανιχνεύθηκαν σε μικρές ποσότητες 11 ουσίες. Στη συνέχεια, αναπτύσσεται μέθοδος ταυτόχρονου ποσοτικού προσδιορισμού για την τριμεθυλογλυκίνη και την ιονισμένη μορφή της αλλαντοΐνης με φασματοσκοπία NMR, ενώ για το γλυκολικό οξύ με GC-MS, και παρατίθενται μετρήσεις σε διάφορα δείγματα για την διεξαγωγή συμπερασμάτων. Σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα του γλυκολικού οξέος που μετρούνται με το GC-MS είναι παρά πολύ χαμηλά, σε σύγκριση με αντίστοιχη μέθοδο μέτρησης με HPLC. Τέλος, περιγράφεται μια μικρής κλίμακας κλινική δοκιμή που πραγματοποιήθηκε σχετικά με την επίδραση της βλέννας του σαλιγκαριού *Helix aspersa* στο δέρμα.

ABSTRACT

The main subject of this thesis is the study of the chemical composition of the snail mucus of *Helix aspersa*, the small molecule isolation and identification and the development of quantitative analytical methods. Moreover, during this study a small scale clinical trial was conducted regarding the effect of snail mucus on the skin, and more specifically its benefits on skin hydration and antiaging. The ultimate goal is the use of snail mucus in cosmetic creams.

The first part of the thesis refers to some general information about snails and especially the *Helix aspersa* species and its two subspecies (*Helix aspersa muller* and *Helix aspersa maxima*). Particularly, it presents the snail's general features, classification and their therapeutic usage since antiquity. Next, it gives a deeper insight on the snail mucus chemical composition and its effect on the skin according to literature study. In the last section of this part, the chemical properties and the biological role of the main substances (trimethylglycine, allantoin and glycolic acid) are described as well as some methods for their quantification.

In the second part, the whole experimental procedure is presented. Initially, a general investigation of snail mucus is performed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy and the analytical method is then set up. The next section includes the isolation and identification of four substances by column chromatography, of which trimethylglycine is isolated for the first time from snail mucus. Moreover, the NMR spectroscopy data for allantoin is elucidated, and then the isolation and identification of the ionized form of allantoin. It is first isolated from snail mucus and described by NMR spectroscopy. In addition, glycolic acid are detected in snail mucus and after analysis of mucus by gas chromatography 11 substances were detected in small amounts. Furthermore, a method is developed for the simultaneous quantification of trimethylglycine and the ion of allantoin by NMR spectroscopy, while another method is set up for quantification of glycolic acid by GC-MS. Glycolic acid levels measured by GC-MS were much lower, in comparison with an equivalent method by HPLC described in literature. Finally, a small scale clinical trial is conducted concerning the beneficial effects of snail mucus on skin's health.

ΣΤΟΧΟΙ - ΙΔΕΑ

Η αρχική ιδέα για την πραγματοποίηση της εργασίας αυτής δόθηκε από τον κύριο Καρέλλα Γιάννη, ο οποίος μας προμήθευσε με όλα τα δείγματα βλέννας που χρειαστήκαμε καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας. Μάλιστα, κρέμες που έχουν ως κύριο συστατικό τη βλέννα σαλιγκαριού, φαίνεται να διαθέτουν αξιόλογα αποτελέσματα σε πληθώρα δερματικών παθήσεων λόγω των αναπλαστικών ιδιοτήτων τους, γεγονός που μας κέντρισε το ενδιαφέρον.

Κύριος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάλυση της χημικής σύστασης της βλέννας σαλιγκαριού, διότι παρατηρήσαμε ότι δεν υπάρχουν επαρκή βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τα συστατικά του υλικού αυτού. Η βλέννα σαλιγκαριού είναι ένα υλικό αρκετά δύσκολο στην επεξεργασία του, λόγω του ότι αποτελείται κυρίως από νερό και έχει παχύρρευστη υφή. Έτσι, ήταν επίσης αναγκαίο να αναπτυχθεί κάποιο πρωτόκολλο επεξεργασίας του, ώστε να είναι δυνατή η χημική του ανάλυση. Ακόμη, το ενδιαφέρον μας στράφηκε στο πως επηρεάζεται η σύσταση της βλέννας από διάφορους παράγοντες κυρίως κατά τη διαδικασία παραλαβής της, ώστε να πετύχουμε την πλουσιότερη δυνατή σε συστατικά βλέννα. Τέλος, στόχος μας ήταν επίσης, να μελετήσουμε την επίδραση του υλικού αυτού στην επιδερμίδα για να αξιολογήσουμε την ευεργετική δράση που εμφανίζουν τα διάφορα καλλυντικά προϊόντα που περιέχουν βλέννα σαλιγκαριού.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	3
Abstract	4
Στόχοι - Ιδέα.....	5
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
Κεφάλαιο 1: Σαλιγκάρια	11
1.1 Μαλάκια.....	11
1.2 Γαστερόποδα	12
1.3 Το σαλιγκάρι	12
1.4 Είδος <i>Helix aspersa subsp. aspersa</i>	14
1.4.1 Γενικά	14
1.4.1.1 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά	16
1.4.2 Αναπαραγωγή.....	17
1.5 Υποείδος <i>Helix aspersa maxima</i>	17
1.6 Χρήσεις των σαλιγκαριών από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα.....	18
1.6.1 Αρχαιότητα.....	18
1.6.2 19ος αιώνας.....	19
1.6.3 20ος Αιώνας.....	20
1.7 Τα σαλιγκάρια σήμερα	20
1.7.1 Χρήσεις στη θεραπευτική.....	20
1.7.2 Διατροφική αξία.....	21
Κεφάλαιο 2: Το έκκριμα του σαλιγκαριού <i>Helix aspersa</i>	22
2.1 Γενικά	22
2.2 Σύσταση	22
2.3 Το <i>Helix aspersa</i> στη θεραπευτική κοσμητολογία	24
2.3.1 Φυσιολογία Δέρματος	24
2.3.2 Γήρανση	25
2.3.3 Το έκκριμα σαλιγκαριού κατά της γήρανσης	25

2.3.4 Το έκκριμα του σαλιγκαριού σε δερματικές παθήσεις.....	28
Κεφάλαιο 3: Τριμεθυλογλυκίνη	30
3.1 Γενικά στοιχεία	30
3.2 Χημικές ιδιότητες τριμεθυλογλυκίνης.....	30
3.3 Πηγές.....	31
3.4 Βιοσύνθεση.....	31
3.5 Βιολογική σημασία για τον άνθρωπο.....	32
3.6 Βιολογική σημασία για άλλους οργανισμούς	33
3.7 Χρήσεις τριμεθυλογλυκίνης για θεραπευτικούς σκοπούς.....	33
3.8 Μέθοδοι προσδιορισμού τριμεθυλογλυκίνης	35
3.8.1 Απομόνωση και προσδιορισμός.....	35
3.8.2 Ποσοτικός προσδιορισμός.....	35
Κεφάλαιο 4 : Αλλαντοΐνη	38
4.1 Γενικά στοιχεία	38
4.2 Χημικές ιδιότητες αλλαντοΐνης	38
4.3 Πηγές.....	40
4.4 Βιοσύνθεση.....	41
4.5 Βιολογική σημασία για τον άνθρωπο.....	42
4.6 Βιολογική σημασία για τα φυτά και άλλους οργανισμούς.....	42
4.7 Χρήσεις της αλλαντοΐνης στο δέρμα	43
4.8 Χρήσεις της αλλαντοΐνης στα καλλυντικά.....	44
4.9 Μέθοδοι προσδιορισμού αλλαντοΐνης	45
4.9.1 Ποιοτικός προσδιορισμός.....	45
4.9.2 Ποσοτικός προσδιορισμός.....	47
Κεφάλαιο 5: Γλυκολικό οξύ	51
5.1 Τα α-υδροξυ-οξέα.....	51
5.2 Χημικές ιδιότητες γλυκολικού οξέος.....	51
5.3 Σύνθεση και παραγωγή γλυκολικού οξέος	52
5.4 Επιδράσεις του γλυκολικού οξέος στο δέρμα.....	53

5.5	Χρήσεις του γλυκολικού οξέος στα καλλυντικά και ασφάλεια	55
5.6	Μέθοδοι προσδιορισμού γλυκολικού οξέος.....	56
5.6.1	Ποιοτικός προσδιορισμός.....	56
5.6.2	Ποσοτικός προσδιορισμός.....	56
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		59
Κεφάλαιο 6: Υλικά και Μέθοδοι.....		60
6.1	Αντιδραστήρια & διαλύτες	60
6.2	Οργανολογία.....	60
6.2.1	Χρωματογραφία λεπτής στειβάδας (Thin Layer Chromatography, T.L.C)	60
6.2.2	Υγρή χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης.....	61
6.2.3	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Συντονισμού NMR.....	61
6.2.4	Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (GC-MS)	61
Κεφάλαιο 7: Διερεύνηση υλικού		62
7.1	Διερεύνηση λυοφιλοποιημένης βλέννας	62
7.1.1	Δοκιμαστικές χρωματογραφίες λεπτής στειβάδας (TLC).....	62
7.1.2	Φασματοσκοπικός έλεγχος με φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού NMR ..	63
7.2	Διερεύνηση υγρής βλέννας σαλιγκαριών	64
7.2.1	Δοκιμασία εξάτμισης αυτούσιας βλέννας και φασματοσκοπικός έλεγχος.....	64
7.3	Ανάπτυξη μεθόδου επεξεργασίας υλικού.....	65
7.3.1	Σύγκριση χημικού προφίλ <i>Helix aspersa muller</i> και <i>Helix aspersa maxima</i>	66
Κεφάλαιο 8: Απομονώσεις		68
8.1	Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στειβάδας.....	68
8.2	Υγρή χρωματογραφία στήλης R-18	70
8.3	Διαλεύκανση της απόδοσης δομής της αλλαντοΐνης με φασματοσκοπία NMR...	76
8.4	Έλεγχος ύπαρξης αλλαντοΐνης – Απομόνωση	82
8.4.1	Διαδικασία απομόνωσης της ιονισμένης μορφής της αλλαντοΐνης.....	84
8.4.2	Ταυτοποίηση δομής της ιονισμένης μορφής της αλλαντοΐνης	87
8.5	Έλεγχος ύπαρξης γλυκολικού οξέος σε περιεκτικότητα 4000 mg/l με φασματοσκοπία NMR	93
8.6	Έλεγχος ύπαρξης γλυκολικού οξέος με αέρια χρωματογραφία	94

8.7	Ανίχνευση ουσιών με αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών	96
8.8	Έλεγχος ύπαρξης γαλακτικού οξέος και οξικού οξέος	100
Κεφάλαιο 9: Καμπύλες αναφοράς		103
9.1	Μέθοδος εσωτερικού προτύπου	103
9.2	Ποσοτικοποίηση τριμεθυλογλυκίνης και της ιονισμένης αλλαντοΐνης με φασματοσκοπία NMR	104
9.2.1	Φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (NMR)	104
9.2.2	Ανάπτυξη καμπύλης αναφοράς τριμεθυλογλυκίνης	104
9.2.3	Ανάπτυξη καμπύλης αναφοράς της ιονισμένης μορφής της αλλαντοΐνης	106
9.2.4	Μέτρηση τριμεθυλογλυκίνης και της ιονισμένης μορφής της αλλαντοΐνης σε διάφορα είδη βλέννας.....	107
9.2.5	Μελέτη διακύμανσης τριμεθυλογλυκίνης και της ιονισμένης αλλαντοΐνης	111
9.3	Ποσοτικοποίηση γλυκολικού οξέος με αέρια χρωματογραφία.....	113
9.3.1	Αέρια χρωματογραφία (GC-MS)	113
9.3.2	Ανάπτυξη καμπύλης αναφοράς	114
Κεφάλαιο 10: Σχόλια και συζήτηση		117
Κεφάλαιο 11: Κλινική δοκιμή		120
11.1	Οργανολογία - Αρχή μεθόδου	120
11.2	Καταγραφή αποτελεσμάτων	122
Βιβλιογραφία		125

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΣΑΛΙΓΚΑΡΙΑ

1.1 ΜΑΛΑΚΙΑ

Τα μαλάκια αποτελούν μια συνομοταξία ζώων, την πληθέστερη μετά τα αρθρόποδα, με πάνω από 100.000 είδη. Η συνομοταξία αυτή χρονολογείται από το Προκάμβριο, όταν η ζωή ήταν δυνατή μόνο στη θάλασσα. Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι το μαλακό τους σώμα, εξού και το όνομα «Μαλάκια». Το σώμα τους, στα περισσότερα είδη, περικλείεται από ένα όστρακο ή κέλυφος. Οι οργανισμοί της ομάδας αυτής κυμαίνονται από πολύ απλούς οργανισμούς, μέχρι πολύπλοκους και σε μέγεθος, από πολύ μικροσκοπικούς μέχρι και το γιγάντιο καλαμάρι *Architeuthis*. Παρά τις μεγάλες διαφορές τους, τόσο στην εσωτερική όσο και στην εξωτερική μορφολογία του οργανισμού τους, έχουν την ίδια βασική κατασκευή. Το δέρμα τους πτυχώνεται σχηματίζοντας τον μανδυακό σάκο μέσα στον οποίο περικλείονται όλα τα μαλακά τους μέρη και τα σπλάχνα τους. Ο μανδύας εκκρίνει ασβεστιτική ουσία και σχηματίζει το όστρακο μέσα στο οποίο περικλείεται για προστασία το ζώο. Στην πλειοψηφία τους τα όστρακα είναι εξωτερικά, μερικά όμως μαλάκια φέρουν εσωτερικό όστρακο, ενώ άλλα στερούνται οστράκου. Τα μαλάκια είναι από τις πιο διαφοροποιημένες συνομοταξίες ασπόνδυλων και περιλαμβάνουν ζώα που με πρώτη ματιά φαίνονται τόσο διαφορετικά που θα μπορούσαν να θεωρηθούν άσχετα μεταξύ τους. Στην συνομοταξία αυτή περιλαμβάνονται τα αμφίτερα, τα δίθυρα, τα κεφαλόποδα, τα γαστερόποδα και τα σκαφόποδα, ενώ κάποια από τα πιο γνωστά είδη της συνομοταξίας είναι τα σαλιγκάρια, οι αχιβάδες, τα καλαμάρια, τα χταπόδια κ.ά. Το όστρακο των μαλακίων είναι το μόνο τμήμα τους που απολιθώνεται και η μορφολογία του είναι σημαντική στον προσδιορισμό των απολιθωμάτων. Σύμφωνα με παλαιοντολογικές μελέτες, τα μαλάκια χρονολογούνται από το Προκάμβριο, όταν η ζωή ήταν δυνατή μόνο στη θάλασσα και εξελίχθηκαν κατά μήκος των ακτών, όπου η τροφή ήταν άφθονη. Ωστόσο από τα διάφορα είδη μόνο τα Δίθυρα και τα Γαστερόποδα μετακινήθηκαν προς υφάλμυρα και γλυκά νερά, ενώ τα χερσαία σαλιγκάρια εξαιτίας της ανάγκης τους για υγρασία και ασβέστιο ήταν τα μόνα που περιορίστηκαν στο έδαφος.

1.2 ΓΑΣΤΕΡΟΠΟΔΑ

Τα γαστερόποδα ή γαστρόποδα αποτελούν μια από τις πέντε ομοταξίες της συνομοταξίας των μαλακίων. Είναι η μεγαλύτερη και πιο πολυποικίλη ομοταξία των μαλακίων με περίπου 40000 αρτίγονα και 15000 απολιθωμένα είδη. Από τα είδη αυτά, άλλα είναι θαλάσσια, με πολλά πρωτόγονα χαρακτηριστικά και άλλα έχουν εξελιχθεί σε χερσαία σαλιγκάρια και γυμνοσαλιγκάρους, που αναπνέουν στον αέρα. Έχουν σύνθετη ονομασία, η οποία προέρχεται από τις λέξεις γαστήρ (κοιλιά) και πόδες (πόδια), λόγω του ότι καθώς περπατάνε φαινομενικά δείχνουν να έρπουν με την κοιλιά τους, ενώ στη πραγματικότητα αυτό που φαίνεται είναι ένα σαρκώδες πόδι. Το σώμα των γαστεροπόδων είναι ασύμμετρο, που σκεπάζεται συνηθέστερα με όστρακο, με το οποίο συνδέεται με πολύ ισχυρούς μύες που απολήγουν στη στυλίδα (άξονας) και μπορούν να τραβούν το όστρακο κατά την κίνηση ή το σώμα τους που βρίσκεται εντός αυτού. Περισσότερο αναπτυγμένα όργανα στο σώμα των γαστεροπόδων είναι το κεφάλι και το πόδι, το οποίο χρησιμοποιείται από τα ζώα ως μέσο μετακίνησης είτε έρποντας είτε ως κολυμπώντας. Το κεφάλι των γαστερόποδων είναι μυώδες και αναπτυγμένο και είναι εφοδιασμένο με το λεγόμενο "ξύστρον" που αποτελεί ένα ιδιαίτερα ευλύγιστο όργανο με πολλά κεράτινα δόντια χρήσιμα στο "ροκάνισμα" των τροφών τους. Επίσης, στο κεφάλι τους φέρουν συνήθως δύο ζεύγη κεραιών που μπορούν να συστέλλονται ή να διαστέλλονται, αυξομειώνοντας την έκτασή τους. Το πρώτο ζεύγος χρησιμεύει περισσότερο ως όργανο αφής και αντίληψης του χώρου, το δε δεύτερο φέρει στην άκρη ή στη βάση του μάτια. Τα γαστερόποδα αναπνέουν είτε με πνεύμονες (γυμνοσαλιγκακας, σαλιγκάρι) είτε με βράγχια (θαλάσσια είδη και κάποια που ζουν σε λίμνες). Τέλος, το όστρακο μπορεί να έχει διάφορα σχήματα όπως, κωνικό, σπειροειδές στην κορυφή ή με πλήρη ελικοειδή κορυφή όπως στο σαλιγκάρι. (Hickman *et al.*, 2014)

1.3 ΤΟ ΣΑΛΙΓΚΑΡΙ

Στα γαστερόποδα πνευμονιοφόρα ανήκουν και τα σαλιγκάρια, τα οποία ανήκουν στο γένος *Helix*. Έχουν βρεθεί κελύφη σαλιγκαριών σε αρχαιολογικές ανασκαφές, μια ένδειξη ότι τα σαλιγκάρια υπήρχαν από τα προϊστορικά χρόνια. Από ανασκαφές αρχαιολογικών χώρων γύρω από τη Μεσόγειο αποδεικνύεται η χρήση διαφόρων ειδών σαλιγκαριών εδώ και εκατοντάδες χρόνια. Το γένος αυτό περιγράφηκε πρώτη φορά από το Λινναίο το 1758 και η επίσημη ταξινόμηση του σύμφωνα με το National Center for Biotechnology Information (NCBI) φαίνεται παρακάτω:

Επικράτεια:	<i>Eukaryotika</i> (Ευκαρυωτικά)
Βασίλειο:	<i>Animals</i> (ζώα)
Κλάδος:	<i>Protostomia</i> (Πρωτοστόμια)
Συνομοταξία:	<i>Mollusca</i> (Μαλάκια)

Κατηγορία: *Gastropoda* (Γαστερόποδα)
Υπερτάξη: *Heterobranchia* (Ετεροβράγχια)
Υφομοταξία: *Pulmonata* (πνευμονοφόρα)
Ανθυποτάξη: *Stylommatophora* (στυλοματοφόρα)
Υπεροικογένεια: *Helicoidea*
Οικογένεια: *Helicidae*
Υποοικογένεια: *Helicinae*
Γένος: *Helix* - Γ. Linnaeus, 1758
Είδος: *H. aspersa*, *H. pomatia*, *H. lucorum*
("National Center of Biotechnology Information," n.d.)

Σε όλο τον κόσμο έχουν καταγραφεί 4000 είδη σαλιγκαριών, στην Ευρώπη 400, ενώ η Ελλάδα και η Ισπανία θεωρούνται από τις πιο πλούσιες χώρες. Η γνώση μας για τα ζώα της Ελλάδας ξεκινά πολύ παλιά, ουσιαστικά από τον Αριστοτέλη που πριν από 2.300 χρόνια έγραψε το «Περί ζώων ιστορίαι», όπου περιέγραψε με ιδιαίτερη λεπτομέρεια περίπου 600 είδη. Σήμερα, μετά από επίσημες καταγραφές, η Ελλάδα είναι από τις πλουσιότερες χώρες της Ευρώπης σε χερσαία σαλιγκάρια, μαζί με την Ισπανία, καθώς η ελληνική χερσαία μαλακοπανίδα περιλαμβάνει 680 είδη σαλιγκαριών, που ανήκουν σε 38 οικογένειες. Από τα 680 είδη που συναντώνται στην Ελλάδα τα μισά είναι ενδημικά και έχουν μικρή έως πάρα πολύ μικρή εξάπλωση. Οι πιο πλούσιες οικογένειες, κατά σειρά, είναι τα Clausiliidae, τα Zonitidae, τα Hygromiidae, τα Helicidae και τα Enidae. Γενικά, τα σαλιγκάρια τα βρίσκουμε συνήθως σε βιότοπους, προτιμούν υγρές περιοχές, ενώ αντίθετα δεν αντέχουν την ξηρασία. Προτιμούν ασβεστούχα εδάφη, γιατί το ασβέστιο είναι απαραίτητο στην κατασκευή του κελύφους τους, ενώ αποφεύγουν τα όξινα εδάφη. Τρέφονται με νεκρή φυτική ουσία αλλά και με χλωρά φυτά, όπως φύλλα, βλαστούς και προκαλούν σοβαρές ζημιές στα φυτά που προσβάλλουν.(Βαρδινογιάννη *et al.*, 2009)

Τα πιο διαδεδομένα είδη *Helix* στην Ελλάδα είναι το *Helix pomatia*, *Helix aspersa* και το *Helix lucorum*

- ***Helix pomatia* L.ή ο Έλιξ ο Εδώδιμος**

Το είδος αυτό περιγράφηκε πρώτη φορά από τον Linnaeus, C. το 1758. Η καταγωγή του είναι από τις Άλπεις και είναι διαδεδομένο στην Κ. Ευρώπη, ενώ στην χώρα μας απαντάται κυρίως στην Α. Μακεδονία και Θράκη. Το βρίσκουμε σε υψόμετρο, απο 1500 μέχρι τα 2000 μέτρα περίπου και παρουσιάζει έντονη κινητικότητα μετά από βροχή ή νωρίς το πρωί, όσο ακόμη διατηρείται η πρωινή υγρασία. Μορφολογικά μοιάζει αρκετά με τον κρητικό κοχλίο, ωστόσο εμφανίζει



Figure 1: *Helix pomatia*

μεγαλύτερες διαστάσεις, με ύψος από 30- 45 mm και διάμετρο από 30–50mm. Τέλος, το κέλυφος είναι κωνικό, ανοιχτό καφετί με κάθετες ακανόνιστες ραβδώσεις.

- ***Helix lucorum* L. ή το Μαύρο σαλιγκάρι**

Ένα ακόμη είδος που ευδοκιμεί στην Ελλάδα είναι το *Helix lucorum* L. Απαντάται στη Βαλκανική χερσόνησο, την κεντρική και Ν.Α. Ευρώπη και την Μικρά Ασία, ενώ στην Ιταλία είναι γνωστό για το πολύ καλής ποιότητας κρέας του. Το κέλυφος του έχει μέγεθος 40-65 χιλιοστά και θεωρείται από τα μεγαλύτερα του είδους. Το βασικό χρώμα του κελύφους είναι καφετί με λωρίδες άσπρες πολύ ζωηρές που ακολουθούν σπείρες και καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος του κελύφους. (Βαρδινογιάννη, 2013)



Figure 2: *Helix lucorum*

1.4 ΕΙΔΟΣ *HELIX ASPERSA SUBSP. ASPERSA*

1.4.1 Γενικά

Το είδος περιγράφηκε ως *Helix aspersa* πρώτη φορά από τον Δανό φυσιοδίφη Otto Friedrich Müller, το 1774, από είδη που βρέθηκαν στην Ιταλία, στο βιβλίο που δημοσίευσε με τίτλο «Vermium Terrestrium et Fluviatilium seu animalium infusorium, helminthicorum, et testaceorum non marinorum succincta historia». Μέχρι τότε μάλιστα δεν είχε γίνει επίσημη ταξινόμηση του είδους και όλα τα σαλιγκάρια ήταν γνωστά ως *Helix*, ενώ ακόμη και μέχρι σήμερα η κατάταξη του είδους είναι αρκετά αμφιλεγόμενη. Πιο συγκεκριμένα, λίγα χρόνια μετά τον Müller, ο Ignaz von Born (1742-1791) στο βιβλίο του “Index rerum naturalium Musei Caesarei Vindobonensis” αναφέρει το σαλιγκάρι με το όνομα *Cornu coriaae*, που σημαίνει «το κέρασ της αφθονίας», ενώ ο Jean de Charpentier το περιέγραψε το 1837 ως *Cryptomphalus aspersus*. Πιο πρόσφατα, το 1996 μια αντιτιθέμενη γνώμη δημοσιεύθηκε από τους Giusti *et al.* όπου συγκαταλέγει το καφέ χερσαίο σαλιγκάρι στο είδος *Cantareus apertus*, λόγω κοινών μορφολογικών χαρακτηριστικών. Τελικά, στον κατάλογο των Ευρωπαϊκών ειδών χερσαίων Μαλακίων το είδος αναφέρεται ως *Cornu aspersum aspersum* (Müller, 1774) και εντάσσεται στο γένος *Cornu* Born, 1778, κάτι που όμως δεν είναι αποδεκτό από το σύνολο της επιστημονικής κοινότητας (“The Cornu problem, <http://www.molluscs.at/>,” n.d.). Παρόλα αυτά,

τα ονόματα που πιο συχνά χρησιμοποιούνται πλέον είναι το *Cornu aspersum aspersum*, το *Helix aspersa aspersa* και το *Helix aspersa muller*, ενώ συνώνυμο του είναι το *Colchea vulgaris* και το *Helix sprumosa*. (“animalbase,” n.d.) Στην παρούσα διπλωματική λοιπόν, από εδώ και στο εξής με το όνομα *Helix aspersa muller* αναφερόμαστε στο είδος *Helix aspersa subsp. aspersa*.

Το *Helix aspersa* στα λατινικά σημαίνει “διάστικτο σαλιγκάρι” και είναι γνωστό ως Κρητικός κοχλίας. Αυτό το είδος είναι ιθαγενές στη Μεσογειακή περιοχή (συμπεριλαμβανομένης της Αιγύπτου), από τη βορειοδυτική Αφρική και την Ιβηρική χερσόνησο έως τη Μικρά Ασία ανατολικά και έως τα Βρετανικά νησιά. (Guiller and Madec, 2010) Χαρακτηρίζεται ως ένα τυπικά ανθρωπόχωρο είδος, δηλαδή είδος που διαδίδεται σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές με τον άνθρωπο εκούσια ή ακούσια. Διαδόθηκε αρχικά από τους Ρωμαίους σε πολλές περιοχές της Ευρώπης, ενώ αργότερα η εξάπλωση τους συνέβη είτε μέσω της μεταφοράς λαχανικών και φρούτων είτε από συλλέκτες σαλιγκαριών, είτε ως φαγητό. Τέλος, από το 1859 το είδος αυτό έχει μεταφερθεί και στην περιοχή της Καλιφόρνιας και από εκεί εξαπλώθηκε και σε άλλες δυτικές πολιτείες των Η.Π.Α. (Fasulo *et al*, 2014). Παρακάτω εμφανίζονται με πράσινο χρώμα οι περιοχές της Ευρώπης στις οποίες ευδοκimeί το είδος *Helix aspersa*.



Figure 3: *Helix aspersa*

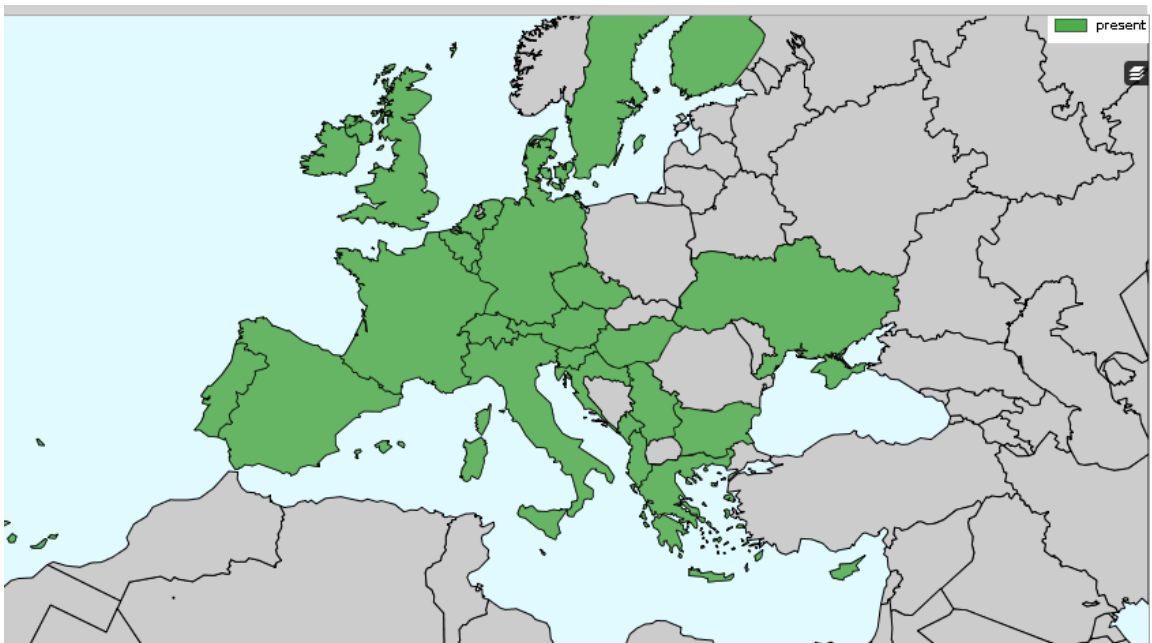


Figure 4: Η εξάπλωση του *Helix aspersa* στην Ευρώπη

(“*Cornu aspersum* (O.F. Muller, 1774) | Fauna Europaea,” n.d.)

1.4.1.1 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά

Τα εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του σαλιγκαριού είναι το κέλυφος και το σώμα. Το κέλυφος έχει σύσταση ασβεστολιθική και το απαιτούμενο ασβέστιο το παίρνουν είτε από τους φυτικούς ιστούς που καταναλώνουν, είτε από το χώμα το οποίο καμιά φορά τρώνε, ή τέλος από το νερό το οποίο πίνουν ή απορροφούν μέσω δέρματος. Στην αρχή της ζωής του το κέλυφος είναι διαφανές και εύθραυστο και καθώς αναπτύσσεται εμπλουτίζεται με CaCO_3 κάτι που το καθιστά αδιαφανές και σκληρό. Το κέλυφος των ώριμων ατόμων μπορεί να φτάσει στα 25-35 mm ύψος και στα 25-40 mm διάμετρο. Στο είδος *Helix aspersa* το κέλυφος περιελίσσεται δεξιόστροφα γύρω από έναν κεντρικό άξονα, σχηματίζοντας 4-5 σπείρες χωρίς να σχηματίζει ομφαλό. Κάθετα στην περιέλιξη του κελύφους υπάρχουν γραμμές που είναι γνωστές σαν γραμμές αύξησης. Αυτές οι γραμμές υποδηλώνουν την παύση της ανάπτυξης του κελύφους όταν το ζώο πέφτει σε θερινή διάπαυση και από το πλήθος αυτών των γραμμών μπορεί να υπολογιστεί η ηλικία του σαλιγκαριού. Τέλος, άλλο στοιχείο που χαρακτηρίζει το κέλυφος, αλλά βρίσκεται στο εσωτερικό του είναι ο στύλος. Το ζώο προσδένεται με μυς, επάνω στο στύλο και κατά αυτό τον τρόπο με συσπάσεις των μυών, το σαλιγκάρι αποτραβιέται στο εσωτερικό του κελύφους. Το χρώμα του κελύφους ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία του ζώου και το περιβάλλον στο οποίο ζει. Το βασικό χρώμα του κελύφους του είναι γκριζο ή κιτρινωπό διακοπτόμενο από σκούρες λωρίδες, με ποικιλία αριθμού και πλάτους, διασταυρούμενες με ζώνες πιο ανοιχτόχρωμες από το βασικό χρώμα. Το χρώμα του σώματος είναι καστανό σκούρο, κιτρινωπό/γκρίζο διακοσμημένο με πιο ανοιχτόχρωμες γραμμές. Επίσης, το σώμα διακρίνεται στο κεφάλι, στον πόδα και στη σπλαχνική μάζα. Το κεφάλι φέρει τις κεραίες, που λειτουργούν κυρίως ως αισθητήρια αφής και ως χημειοϋποδοχείς και το στόμα, το οποίο βρίσκεται στο κάτω μέρος του κεφαλιού. Ο πόδας είναι ένας μυώδης σχηματισμός, βασική λειτουργία του οποίου είναι η κίνηση, η οποία διευκολύνεται πάρα πολύ από τη βλέννα που εκκρίνεται από αδένες της επιδερμίδας. Η βλέννα αυτή λειαίνει το υπόστρωμα πάνω στο οποίο κινείται το ζώο, μειώνει την τριβή, ενώ παράλληλα προστατεύει τον πόδα από τραυματισμό. Τέλος, η σπλαχνική μάζα δεν είναι ορατή εξωτερικά γιατί καλύπτεται από το κέλυφος και από τον μανδύα. (Βαρδινογιάννη, 2013; Παρμακέλης, 2000)

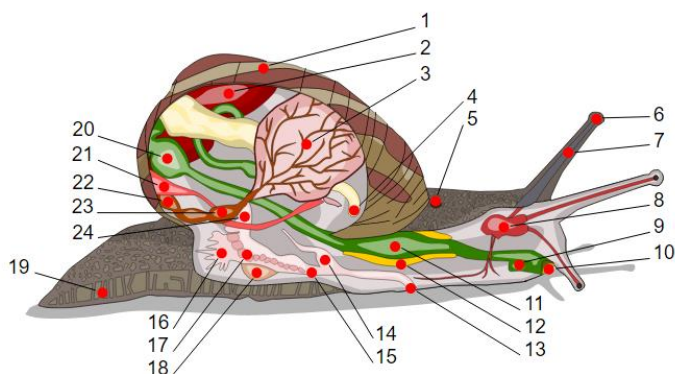


Figure 5: Γενική Ανατομία σαλιγκαριού

1: Κέλυφος 2: συκώτι 3: πνευμόνι 4: πρωκτός 5: αναπνευστικοί πόροι 6: Μάτι 7: εγκεφαλικά γάγγλια 8: σιελογόνοι αγωγοί 9: στόμα 10: πρόλοθος 11: σιελογόνοι αδένες 12: γεννητικοί πόροι 13: πέος 14: κόλπος 15: βλεννογόνος αδένας, σάλπιγγα 16: βελάκια 17: πόδι 18: στόμα 19: στόμα 20: στόμα 21: στόμα 22: στόμα 23: καρδιά 24: σπερματικός πόρος

1.4.2 Αναπαραγωγή

Το συγκεκριμένο είδος, όπως και όλα τα χερσαία γαστερόποδα, είναι ερμαφρόδιτο, που παράγει αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες και υποχρεωτικά ετερογονιμοποιούμενο. Η αναπαραγωγική περιόδός του στις περιοχές της Μεσογείου, λαμβάνει χώρα αργά την άνοιξη ή νωρίς το καλοκαίρι, ενώ στην Ελλάδα το είδος αυτό εμφανίζει και μια αναπαραγωγική περίοδο το φθινόπωρο. Η γονιμοποίηση του είναι εσωτερική και η ανάπτυξη των εμβρύων του δεν έχει προνυμφικά στάδια. Κάθε σαλιγκάρι ψάχνει για μαλακό έδαφος για να σκάψει και να αφήσει τα αυγά του, τα οποία τα εναποθέτει σε μικρούς λάκκους. Συνήθως, γεννά περίπου 85 αυγά και τα μικρά σαλιγκαράκια γεννιούνται μετά από 2-4 εβδομάδες. (Παρμακέλης, 2000)



Figure 4: Αυγά *Cornu aspersum*

1.5 ΥΠΟΕΙΔΟΣ *HELIX ASPERSA MAXIMA*

Το σαλιγκάρι *Helix aspersa maxima* είναι υποείδος του *Helix aspersa* σύμφωνα με το NCBI ("National Center of Biotechnology Information," n.d.). Είναι γνωστό με τη γαλλική του ονομασία ως *μεγάλο γκρι* (gros-gris) ή απλώς ως *μεγάλο σαλιγκάρι*. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1883 από τον Taylor και λόγω της ποιότητας του κρέατος του αλλά και του ότι παράγει εύκολα μεγάλες ποσότητες βλέννας, χρησιμοποιείται πάρα πολύ πλέον από τους εκτροφείς.

Μορφολογικά διαφέρει από το *Helix aspersa aspersa* κυρίως στο μέγεθος καθώς το κέλυφος του *maxima* μπορεί να φτάσει τα 40-45 mm, ενώ ένα ώριμο σαλιγκάρι μπορεί να ζυγίζει έως και 18 γραμμάρια. Το βασικό χρώμα του κελύφους του είναι γκριζο ή κιτρινωπό διακοπτόμενο από έντονα σκούρες λωρίδες και μοιάζει αρκετά με αυτό του *Helix aspersa aspersa*. Τέλος, το χρώμα του σώματος είναι πιο σκούρο καφέ από αυτό του *Helix aspersa aspersa*, ενώ όταν το σαλιγκάρι βρίσκεται εντός του κελύφους εμφανίζεται στην πύλη ένα σκούρο τμήμα του πόδα το οποίο στο άλλο είδος δεν υπάρχει.



Figure 5 : *Helix aspersa muller* vs *maxima*

Helix aspersa muller *Helix aspersa maxima*

1.6 ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΣΑΛΙΓΚΑΡΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΡΧΑΙΟΤΗΤΑ ΜΕΧΡΙ ΣΗΜΕΡΑ

1.6.1 Αρχαιότητα

Το σαλιγκάρι έχει χρησιμοποιηθεί στην ιατρική από την αρχαιότητα, γεγονός που αποδεικνύεται από τα σωζόμενα κείμενα πολλών ιατρών της αρχαιότητας, των ρωμαϊκών και των βυζαντινών χρόνων, όπως του Ιπποκράτη, του Πλίνιου, του Διοσκουρίδη, του Γαληνού, του Κέλσου, του Αμιδηνού, του Αρχιγένη, του Ορειβάσιου και άλλων. Στα αρχαία κείμενα, η χρήση των σαλιγκαριών ή της βλέννας τους αναφέρεται για την αντιμετώπιση πλήθους ασθενειών, από πολύ απλές μέχρι πολύ σοβαρές. Στην αρχαιότητα πίστευαν ότι τα σαλιγκάρια συσχετίζονταν με τη θηλυκότητα και τη γονιμότητα, έτσι συχνά χρησιμοποιούνταν για την αντιμετώπιση ασθενειών γυναικολογικής φύσης. Ο Ιπποκράτης πρότεινε τη βλέννα του σαλιγκαριού για την καταπολέμηση του ασθενειών του γαστρεντερικού. Επίσης, ο αρχαίος φιλόσοφος Κέλσος υποστήριζε ότι το σαλιγκάρι, πολτοποιημένο μαζί με το κέλυφος του, έχει επουλωτικές ιδιότητες, ενώ βρασμένο χρησιμοποιούνταν ως μαλακτικό (Cranga F, 1991). Ο Πλίνιος θεωρούσε ότι το σαλιγκάρι αύξανε την ταχύτητα του τοκετού, βοηθούσε στην καταπολέμηση του πόνου των εγκαυμάτων και των άλλων τραυμάτων, ενώ το συνιστούσε ως αιμοστατικό για την αιμορραγία της μύτης και της μήτρας. Ακόμη, για τον πόνο στο στομάχι θεωρούνταν θεραπευτική η κατανάλωση βρασμένων σαλιγκαριών, τα οποία έχουν ψηθεί στη σχάρα και τα οποία πρέπει να καταναλωθούν με κόκκινο κρασί. Η κατανάλωση των σαλιγκαριών ήταν επίσης ευεργετική για όσους υπέφεραν από ιλλίγγους, λιποθυμία, κεφαλαλγίες ημικρανίες και σε τσιμπήματα. (Reutter, 1915) Η βλέννα σαλιγκαριού αναφέρεται και στην «Παγκόσμια Φαρμακοποιία», η οποία γράφτηκε από τον Lemery Nicolas και στην οποία περιγράφεται η παρασκευή ενός είδους γαλακτώματος για την ερυθρότητα του δέρματος ή γενικά για τον καθαρισμό του προσώπου. Τέλος, αναφέρεται ότι το σκεύασμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με φυματίωση ή που υποφέρουν από νεφρίτιδα. (Lemery, 1738)

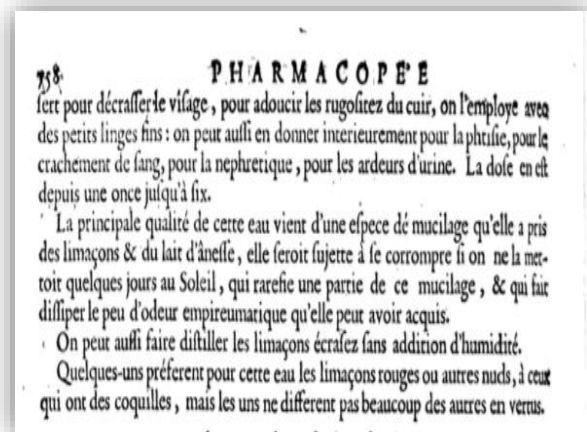
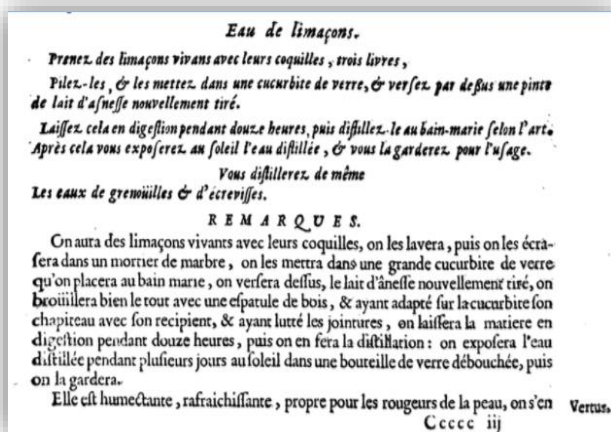


Figure8: Αποσπάσματα από την «Παγκόσμια Φαρμακοποιία»

Όσον αφορά την κατανάλωση των σαλιγκαριών ως τροφή, έχει διαπιστωθεί ότι από την Παλαιολιθική εποχή μέχρι την Ύστερη Εποχή του Χαλκού τα μαλάκια αποτέλεσαν σημαντική πηγή τροφής για τον άνθρωπο. Ανασκαφές στον ελληνικό χώρο δείχνουν ότι ήδη από την Προϊστορική εποχή υπήρξε κατανάλωση συγκεκριμένων ειδών θαλάσσιων μαλακίων (*Patella* sp., *Cardium edule* L., *Monodonta turbinata* L., *Cerithium vulgatum* Br., *Mytilus galloprovincialis* κ.ά.) καθώς και χερσαίων σαλιγκαριών του γένους *Helix*. Οι Ρωμαίοι, συγκεκριμένα, θεωρούσαν τα σαλιγκάρια εκλεκτή τροφή και τα διατηρούσαν σε ειδικούς κήπους για πάχυνση πριν τα καταναλώσουν ως έδεσμα. (Bonnemain, 2005)

1.6.2 19ος αιώνας

Με το πέρασμα των χρόνων, η θεραπευτική αξία των σαλιγκαριών άρχισε να αναγνωρίζεται, ώσπου στις αρχές του 19ου αιώνα το σαλιγκάρι άρχισε να αποτελεί σύμβολο-σήμα για τα φαρμακεία. Πιο συγκεκριμένα, ο George Tareppe με το βιβλίο που εξέδωσε το 1808, αναδεικνύει τη μεγάλη θεραπευτική αξία των σαλιγκαριων, αναφερόμενος στην ικανότητα τους να θεραπεύουν κήλες.(Pierre Charroppin and Pierre Julien, 1983) Λίγο αργότερα, το 1840, ο Louis Figuier, γάλλος επιστήμονας, αναφέρει ότι πολλοί χρησιμοποιούσαν το έκκριμα σαλιγκαριού έναντι ασθενειών του στήθους, ενώ σημειώνει ότι αρκετοί ιατροί της εποχής χρησιμοποιούσαν την παραπάνω θεραπεία για τη φυματίωση. Μάλιστα, σε ένα από τα βιβλία του αναφέρει πολλές φαρμακευτικές μορφές με βάση το σαλιγκάρι, τα οποία λαμβανόμενα από το στόμα χρησιμοποιούνταν στην προστασία από το κρυολόγημα, σε φυματίωση πρώτου και δεύτερου βαθμού,

σε οξεία υπέρταση ή χρόνια καρδιακα νοσήματα και σε ερεθισμούς του έντερου. Τέλος, ο Figuier αναφέρεται στις θεραπευτικές ιδιότητες του «κίτρινου εκχυλίσματος» που προκύπτει από το σαλιγκάρι *Helix pomatia*, το οποίο ονομάζει «hélicine» και έτσι το ενδιαφέρον για τα σαλιγκάρια συνεχίστηκε και τον 20° αιώνα. (Bonnemain, 2005; Figuier O., 1840)

1.6.3 20ος Αιώνας

Αν και θα μπορούσε κάποιος να σκεφτεί ότι αυτό ήταν το τέλος της ιατρικής σταδιοδρομίας των σαλιγκαριών, δεν επρόκειτο για κάτι τέτοιο, δεδομένου ότι διάφορα επιστημονικά άρθρα επαναπροσδιόρισαν το συγκεκριμένο θέμα ακόμα μια φορά. Ο Quevaunviller αναφέρθηκε εκτενώς στις θεραπευτικές ιδιότητες των σαλιγκαριών το 1953 και συσχέτισε τη χρήση του σιροπιού σαλιγκαριών για την αντιμετώπιση της χρόνιας βρογχίτιδας. Μάλιστα, για πρώτη φορά, απέδειξε την *in vitro* βλεννολυτική δραστηριότητα της βλέννας του *H.pomatia* και την σπασμολυτική δράση της στην αναπνευστική οδό, ενώ περιέγραψε και την πραγματική προετοιμασία του προϊόντος που χρησιμοποιούνταν τότε. (Quevaunviller A, 1953; “Société d’Histoire de la Pharmacie,” n.d.)

1.7 ΤΑ ΣΑΛΙΓΚΑΡΙΑ ΣΗΜΕΡΑ

Μέχρι και σήμερα έχουν γίνει πολλές μελέτες γύρω από τη χημεία της βλέννας του σαλιγκαριού, τόσο για την εφαρμογή της στα καλλυντικά, όσο και για τη διατροφική αξία ακόμη και ολόκληρου του οργανισμού.

1.7.1 Χρήσεις στη θεραπευτική

Όσον αφορά τη χρήση του εκκρίματος σαλιγκαριού στη θεραπεία ή την πρόγνωση σοβαρών ασθενειών, υπάρχουν αναφορές τόσο για το είδος *Helix pomatia*, όσο και για το *Helix aspersa*. Συγκεκριμένα, το 1999, οι Pons *et al.* απέδειξαν ότι η βρογχο-μυοχαλαρωτική επίδραση της helicidine, του εκχυλίσματος του *H.pomatia*, σχετίζονταν με την απελευθέρωση των προσταγλανδινών E2 και αναστέλλονταν μέσω προ-θεραπείας με ινδομεθακίνη, ενός αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης, εμφανίζοντας αξιολογικά αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα. Λίγο αργότερα, το 2001 οι Dwek MV *et al.* δημοσίευσαν ότι από το *Helix pomatia*, προέρχεται μια λεκτίνη που ονομάζεται *Helix pomatia agglutinin* (συγκολλητίνη-HPA) που χρησιμοποιείται ως προγνωστικός δείκτης για ορισμένες μορφές καρκίνου, όπως του μαστού, του στομάχου και του παχέος εντέρου, ενώ η πρόσδεση της HPA σε ιστολογικά παρασκευάσματα των παραπάνω ιστών υποδεικνύει την μετάσταση του καρκίνου. (Dwek *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 1994) Ακόμη, πολύ πρόσφατα, το 2016, οι Benoit Cudennec *et al.* μελέτησαν την αντιυπερτασική δράση ενός παραπροϊόντος υδρόλυσης του *H. aspersa* (SBH) το οποίο παράγεται μέσω βιομηχανικής διαδικασίας. Κατά την μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκαν τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* πειράματα. Στα *in vitro* πειράματα μετρήθηκε η αναστολή της αγγειοτενσίνης (ACE) δίνοντας ένα IC₅₀ της τάξης του 23 μg·ml⁻¹, ενώ παράλληλα με LC/MS απομονώθηκαν 17 ακολουθίες πεπτιδίων από τα οποία τα 7 είναι γνωστοί αναστολείς ACE. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έδειξαν και τα *in vivo* πειράματα σε ποντίκια στα οποία παρατηρήθηκε αξιολογική μείωση της συστολικής πίεσης του αίματος, κάτι που καθιστά το προϊόν

SBH ένα νέο συστατικό για το σχεδιασμό λειτουργικών τροφίμων κατά της υπέρτασης. (Cudennec *et al.*, 2016)

1.7.2 Διατροφική αξία

Επίσης μεγάλο ενδιαφέρον παρουσίασε η μελέτη του προσδόκιμου ζωής πληθυσμών που τρέφονται με σαλιγκάρια. Η έρευνα των Επτά Χωρών αποτελεί μια έρευνα ορόσημο στην οποία συμμετείχε και η Ελλάδα με δείγμα την Κρήτη. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι από όλες τις χώρες που συμμετείχαν στην έρευνα ο πληθυσμός της Κρήτης είχε τη μικρότερη νοσηρότητα και θνησιμότητα από καρδιαγγειακές παθήσεις. Το φαινόμενο αυτό έχει αποδοθεί ότι οφείλεται στην «Μεσογειακή Διατροφή» η οποία χαρακτηρίζεται από την κατανάλωση ελαιολάδου, μειωμένα κορεσμένα λιπαρά, αφθονία τροφών φυτικής προέλευσης, τροφών πλούσιων σε ω-3 λιπαρά οξέα αλλά είναι πλούσια και σε σαλιγκάρια, τους γνωστούς Κρητικούς κοχλίου. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι τα σαλιγκάρια είναι πλούσια σε α-λινολενικό οξύ που προστατεύει από πολλά καρδιαγγειακά νοσήματα όπως κοιλιακή μαρμαρυγή και θρομβώσεις. Έτσι θεωρείται ότι το παρθένο ελαιόλαδο και η κατανάλωση σαλιγκαριών είναι υπεύθυνα σε μεγάλο ποσοστό για την διάσημη μακροβιότητα των Κρητικών.(Bonnemain, 2005)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΟ ΕΚΚΡΙΜΑ ΤΟΥ ΣΑΛΙΓΚΑΡΙΟΥ *HELIX ASPERSA*

2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Το έκκριμα του σαλιγκαριού είναι ένας γλοιώδης σχηματισμός, με χρώμα ασημί ή πρασινωπό, ο οποίος, όπως έχει ήδη αναφερθεί, εκκρίνεται από αδένες που βρίσκονται στον πόδα και βοηθά στην κίνηση. Εκτός από αυτόν το ρόλο, η βλέννα του σαλιγκαριού φαίνεται να παίζει σημαντικό προστατευτικό ρόλο για το σαλιγκάρι, όταν αυτό εκτίθεται σε ακραίες συνθήκες ακτινοβολίας, όταν τραυματιστεί ή γενικά όταν για κάποιο εξωγενή παράγοντα υποστεί στρες.

2.2 ΣΥΣΤΑΣΗ

Το έκκριμα αυτό αποτελεί ένα μίγμα ουσιών που παράγονται από τρεις ομάδες αδένων που βρίσκονται στην κοιλιά και στη ράχη: τους αδένες του βλεννογόνου της επιδερμίδας, τους σιελογόνους αδένες και τους πρωτεϊνικούς αδένες. Η ακριβής χημική σύσταση του υλικού αυτού δεν είναι πλήρως περιγραφμένη. Επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα κύρια συστατικά του μίγματος είναι πρωτεΐνες και σάκχαρα. Το πρωτεϊνικό κομμάτι έχει αναλυθεί με ηλεκτροφόρηση και έδειξε 4 κλάσματα. Τα δυο κλάσματα αποτελούνταν από πρωτεΐνες με μοριακό βάρος >250 kDa και τα άλλα δυο από πρωτεΐνες με μοριακό βάρος <250 kDa. Οι μεγάλοι μοριακοί βάρους πρωτεΐνες αποτελούνταν κυρίως από αιμοκυανίνη, η οποία ως κύριο ρόλο έχει την πρόσληψη, τη μεταφορά και την απελευθέρωση οξυγόνου στους ιστούς. Όσον αφορά τα μικρού μοριακού βάρους κλάσματα, περιέχουν αλληλουχίες αμινοτελικών αμινοξέων, οι οποίες δεν σχετίζονται με γνωστές πρωτεΐνες και είναι αρκετά χρησιμες για τον ανθρώπινο μεταβολισμό. Οι πρωτεϊνογλυκάνες και οι γλυκοζαμινογλυκάνες αποτελούν μέρος των σακχάρων που υπάρχουν στο έκκριμα σαλιγκαριού, με πιο γνωστό το υαλουρονικό οξύ, μια γλυκοζαμινοπρωτεΐνη εξαιρετικά υδρόφιλη. Ακόμη, η βλέννα σαλιγκαριού είναι πλούσια σε ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους με έντονη αντιοξειδωτική δράση, ενώ φάσματομετρία ατομικής απορρόφησης έδειξε ότι είναι αρκετά πλούσια σε ασβέστιο. ("Endocare- Scientific dossier," n.d.)

Table 1: Σύσταση εκκρίματος σαλιγκαριού

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΟΥΣΙΕΣ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
Πρωτεΐνες MB>250 kDa	Αιμοκυανίνη	1.0-3.0 mg/ml
Πρωτεΐνες MB<250 kDa	Αλληλουχίες αμινοξέων	
Γλυκοζαμινογλυκάνες- Πρωτεογλυκάνες	Υαλουρονικό, λεκτίνη, κολλαγόνο	0.5-0.7 mg/ml
Ουσίες μικρού MB	-	-
Ανόργανα συστατικά	Ca	1.3 mg/ml.

Συχνά αναφέρεται ότι το έκκριμα του σαλιγκαριού περιέχει επίσης γλυκολικό οξύ και αλλαντοΐνη, πληροφορία που δεν τεκμηριώνεται από κάποια επιστημονική πηγή, εκτός από μια δημοσίευση στην οποία αναπτύσσεται μια μέθοδος ποσοτικοποίηση των δύο ουσιών με HPLC, χωρίς να γίνεται ταυτοποίηση με κάποιο τρόπο ότι πρόκειται για τις ουσίες αυτές (El Mubarak et al., 2013). Μάλιστα, πολλές εταιρίες καλλυντικών αναφέρουν την ύπαρξη αλλαντοΐνης και γλυκολικού οξέος στο έκκριμα σαλιγκαριού λόγω των πολύ ευεργετικών ιδιοτήτων τους στην ανάπλαση του δέρματος.



Το Αριστούργημα της Φύσης στην Ανάπλαση του Δέρματος

είναι μια διεθνής καλλυντική κρέμα ημέρας και νύκτας για το πρόσωπο ή το σώμα. Έχει αναπλαστική δράση και άλλες πολλαπλές ιδιότητες. Ανήκει στην κατηγορία των (Cosmeceutical) καλλυντικών και στην Ελλάδα έχει κωδικό

Ανακαλύφθηκε τυχαία από την οικογένεια Bascunan και παρασκευάζεται στη Χιλή από την εταιρεία και προστατεύεται από διεθνή πατέντα.

Είναι φτιαγμένη από τις εκκρίσεις του σαλιγκαριού που ζει στη Χιλή και ονομάζεται Helix Aspersa Muller.

Η σύνθεση της είναι εντελώς φυσική και περιλαμβάνει τις εκκρίσεις του σαλιγκαριού: αλλαντοΐνη, κολλαγόνο, ελαστίνη, γλυκολικό οξύ και βιταμίνες A, C, και E. Επίσης βοηθά στη φυσική καταπολέμηση καταστάσεων λόγω της Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus, Pseudomonas Aeruginosa και Propionibacterium Acnes.

Το μεγάλο μυστικό της είναι το μικροσκοπικό μέγεθος των μορίων που περιέχει που της δίνει τη δυνατότητα να απορροφάται γρήγορα και να φθάνει βαθιά στη ρίζα του προβλήματος. Όλα τα συστατικά της είναι συνδυασμένα από μία ουσία: το σάλιο του σαλιγκαριού.

Οι καταπληκτικές ιδιότητες της βλέννας του σαλιγκαριού είναι γνωστές από την αρχαιότητα και χρησιμοποιούνταν από την εποχή του Ιπποκράτη στην παραδοσιακή ιατρική. Θα μπορούσε κάποιος να την χαρακτηρίσει ακόμη και ως «μαγικό φίλτρο», καθώς έχει σωρεία θεραπευτικών ιδιοτήτων που εμπλέκουν σχεδόν όλα τα λειτουργικά συστήματα του ανθρώπου. Παράγεται από τον αλβουμινικό αδένά του σαλιγκαριού και είναι ουσία πρωτεϊνικής φύσεως όμοια με τα αντιβιοτικά.

Αποτελείται από αλλαντοΐνη, γλυκολικό οξύ, κολλαγόνο, ελαστίνη, gag, νερό και άλλα ειδικά πεπτίδια.

Μια εταιρεία από τις Ήβρες, αποφάσισε να αναλάβει ένα επιχειρηματικό ρίσκο, σε μία περίοδο που η Μέση «επένδυση», είναι λίγο έως πολύ απαγορευμένη. Αποφάσισε να επενδύσει και να εκμεταλλευτεί τα οφέλη της βλέννας του σαλιγκαριού.

Η με έδρα το Κρίνος Τερρών, ξεκίνησε τη λειτουργία της στις αρχές του 2012.

Με αγάπη, φροντίδα και επαγγελματισμό, ξεκίνησε την καλλιέργεια των σαλιγκαριών σε εγκαταστάσεις με προηγμένες μεθόδους τεχνολογίας και τεχνογνωσίας, προκειμένου να πετύχει την ποιοτική εκτροφή τους. Το εκτροφείο, βρίσκεται σε ιδιόκτητη έκταση οκτώ στρεμμάτων ανοικτού τύπου, όπου εκτρέφονται τα σαλιγκάρια τύπου Helix Aspersa Maxima.



2.3 ΤΟ *HELIX ASPERSA* ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΚΟΣΜΗΤΟΛΟΓΙΑ

Για να γίνει πιο κατανοητή η δράση του εκκρίματος σαλιγκαριού στο δέρμα, πρέπει πρώτα να γίνει μια αναφορά στη μορφολογία του μεγάλου αυτού οργάνου, στη φυσιολογία και στο πώς επηρεάζεται από το περιβάλλον. Παραθέτουμε, λοιπόν, κάποια γενικά στοιχεία που αφορούν τις αλλαγές που επιφέρει η γήρανση στο δέρμα αλλά και τι επίδραση έχει η ακτινοβολία.

2.3.1 Φυσιολογία Δέρματος

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του σώματος με μέση επιφάνεια περίπου 2 m² και βάρος περίπου 4 kg. Είναι ένα ζωτικό όργανο επικοινωνίας του ανθρώπου με το περιβάλλον, με κύριους ρόλους τη μηχανική προστασία από επιβλαβή εξωτερικά ερεθίσματα, τη ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος και την υποδοχή ερεθισμάτων. Αποτελείται από δύο κύριες στιβάδες, την επιδερμίδα και το χόριο ή κυρίως δέρμα. Πιο συγκεκριμένα, η επιδερμίδα είναι η εξωτερική, επιθηλιακή στιβάδα και περιλαμβάνει όλα τα εξαρτήματα, όπως τρίχες, σμηγματογόνους, ιδρωτοποιούς και αποκρινείς αδένες, ενώ το χόριο αποτελεί την εσωτερική στιβάδα κάτω από την επιδερμίδα, το οποίο σχηματίζεται από δίκτυο κολλαγόνων ινών και τη βασική ουσία, ενώ περιλαμβάνει τα αιμοφόρα αγγεία και τα νεύρα του δέρματος. (Παπαϊωάννου, 2010)

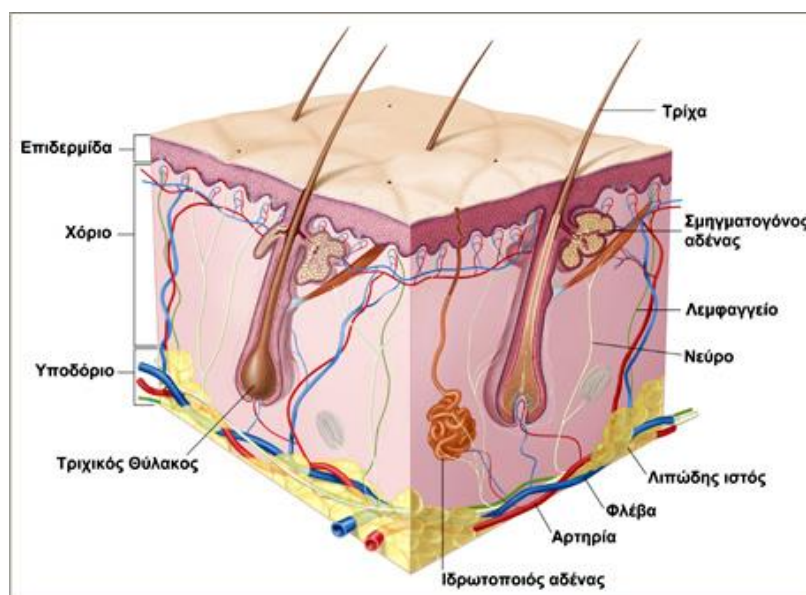


Figure 9: Εγκάρσια διατομή δέρματος (<http://www.epidermis.gr/skin.php>)

2.3.2 Γήρανση

Όμως, με την πάροδο του χρόνου οι μηχανιστικές, προστατευτικές και αποκαταστατικές ιδιότητες του δέρματος μειώνονται με αποτέλεσμα την γήρανση. Η γήρανση διακρίνεται σε ενδογενή ή βιολογική, που παρουσιάζεται ταυτόχρονα σε όλους τους ιστούς του ανθρώπινου σώματος και έχει κληρονομική βάση και σε εξωτερική γήρανση, που παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των ατόμων και των ιστών και επηρεάζονται καθοριστικά από εξωγενείς παράγοντες, όπως η ηλιακή ακτινοβολία, το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση κ.ο.κ. Κατά την εσωτερική γήρανση, παρατηρείται μέτρια μείωση του αριθμού των κυττάρων του Langerhans του δέρματος, μείωση του αριθμού των μελανοκυττάρων και της λειτουργικότητάς τους και μείωση των πρωτεογλυκάνων και του υαλουρονικού οξέος στο χόριο.

Στην εξωτερική γήρανση συγκαταλέγεται και η φωτογήρανση, που είναι η γήρανση του δέρματος λόγω της επίδρασης της ηλιακής ακτινοβολίας. Η φωτογήρανση είναι μια συσσωρευτική διαδικασία που συμβαίνει με βάση το βαθμό έκθεσης στον ήλιο και το επίπεδο της χρωστικής του δέρματος. Σε μοριακό επίπεδο, η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία προκαλεί την ενεργοποίηση ειδικών μεταλλοπρωτεϊνών (MMP) που είναι υπεύθυνες για μεταβολές στο κολλαγόνο και την ελαστίνη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία τεμαχισμένων ινιδίων κολλαγόνου και την εξασθένιση της ακεραιότητας του δέρματος (Fisher, 2005; Naru *et al.*, 2005). Επίσης, κατά τη διαδικασία της φωτογήρανσης μειώνεται ο κυτταρικός μεταβολισμός και κατά συνέπεια η βιοσύνθεση βασικών ουσιών, όπως πρωτεΐνες και λιπίδια, που συμβάλλουν στην ανανέωση του ιστού, ενώ τα κύτταρα της επιδερμίδας χάνουν την ικανότητα μεταβολισμού και διαφοροποίησής τους. (Tribó-Boixareu, 2009) Επίσης, εμφανίζονται γηρασμένα κύτταρα ινοβλαστών και ταυτόχρονα προκαλείται μείωση της δράσης του υαλουρονικού οξέος, που είναι απαραίτητο στοιχείο για την ενυδάτωση του δέρματος, καθώς επίσης και του θειικού δερματάνιου, δημιουργώντας έτσι χαλάρωση.

Κλινικά, η γήρανση του δέρματος εκδηλώνεται με ξηρότητα, μείωση της ελαστικότητας του δέρματος, λέπτυνση της επιδερμίδας, δυσχρωμία, τραχύτητα, απώλεια λάμψης δέρματος και εμφάνιση βαθιών ρυτίδων. Είναι λοιπόν φανερό ότι η αναζήτηση ασφαλούς, μη επεμβατικής θεραπείας για την αναστροφή αυτών των παθοφυσιολογικών αλλαγών με τη γήρανση του δέρματος καθιστάται αναγκαία. (Glogau, 1996; Κεφαλά, 2014)

2.3.3 Το έκκριμα σαλιγκαριού κατά της γήρανσης

Τα τελευταία χρόνια όλο και μεγαλύτερο μέρος της έρευνας ασχολείται με αυξητικούς παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν έναντι της φωτογήρανσης και γενικά στην ανάπτυξη-αναγέννηση του δέρματος. Ενώ υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι αυξητικοί παράγοντες προερχόμενοι από τον άνθρωπο, εμφανίζουν αξιολογα αποτελέσματα στον τομέα αυτό, υπάρχουν ανησυχίες για άσχημες παρενέργειες αυτών των ουσιών, μέχρι και για ογκογένεση. (Lázár-Molnár *et al.*, 2000) Έτσι, οι έρευνες στράφηκαν στην εύρεση τέτοιων παραγόντων από φύτα ή ζώα. Ο ογκολόγος-ακτινολόγος Rafael Abad Iglesias MD, αναφέρει για πρώτη φορά, ότι το έκκριμα του

σαλιγκαριού *Cryptomphalus aspersa* αποτελεί έναν πολύ καλό αυξητικό παράγοντα. Συγκεκριμένα, παρατήρησε ότι το συγκεκριμένο σαλιγκάρι όταν εκτίθεται σε ακτινοβολία UVA ή ακτίνες X, παράγει μια βλέννα που αποτελεί μίγμα γλυκοζαμυνογλυκάνων και είναι ικανή να επουλώσει το δέρμα του ζώου εντός 48 ωρών. (Abad RF., 1999)

Λόγω όλων αυτών των δεδομένων, αρκετές έρευνες έχουν γίνει σχετικά με τη δράση του εκκρίματος σαλιγκαριού έναντι της φωτογήρανσης, και άλλων δερματολογικών παθήσεων. Αρχικά, οι Brieva A. και οι συνεργάτες, το 2008, μελέτησαν τις ιδιότητες του εκκρίματος σαλιγκαριού σε μοριακό επίπεδο. Από την μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι το μίγμα αυτό έχει έντονη αντιοξειδωτική δράση έναντι των ελεύθερων ριζών που δημιουργούνται από την UV ακτινοβολία, ενώ ταυτόχρονα προκαλεί διέγερση του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών και αναδιάταξη του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Ακόμη, φάνηκε ότι το έκκριμα σαλιγκαριού, προκαλεί αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας του χορίου και ρύθμιση της δραστηριότητας των μεταλλοπρωτεασών που καταστρέφουν το κολλαγόνο και την ελαστίνη, δράσεις που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπλαση-αναγέννηση του δέρματος. (Brieva *et al.*, 2008)

Για την αξιολόγηση λοιπόν της δράσης του εκκρίματος σαλιγκαριού στη φωτογήρανση, πραγματοποιήθηκε το 2013 μια αξιολογή κλινική μελέτη από το Πανεπιστήμιο της Καλιφόρνια, στην οποία συμμετείχαν 25 ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή μορφή φωτογήρανσης προσώπου και είχε διάρκεια 14 εβδομάδων. Στους ασθενείς χορηγήθηκε, για 12 εβδομάδες, στη μία πλευρά του προσώπου γαλάκτωμα με 8% έκκριμα σαλιγκαριού *Helix (Cryptomphalus) aspersa* συνδυαστικά με υγρό ορό (με 40% έκκριμα), ενώ στην άλλη πλευρά του προσώπου χορηγήθηκε γαλάκτωμα χωρίς έκκριμα. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε με αποτυπώσεις δέρματος σιλικόνης στην αρχή και στο τέλος της χορήγησης. Στο τέλος των 12 εβδομάδων φάνηκε αξιολογή βελτίωση των ρυτίδων στην πλευρά που είχε χορηγηθεί το έκκριμα συγκριτικά με την άλλη πλευρά, ενώ η αποτελεσματικότητα στην υφή του δέρματος φάνηκε ακόμη και 2 εβδομάδες μετά το τέλος της θεραπείας (14 εβδομάδες). Έτσι αποδεικνύεται ότι η καθημερινή εφαρμογή προϊόντων που περιέχουν έκκριμα σαλιγκαριού είναι καλά ανεκτή και αποτελεσματική στη βελτίωση των ρυτίδων του προσώπου. (Fabi *et al.*, 2013)



Figure 10: Γυναίκα ασθενής στην αρχή της θεραπείας



Figure 11: Γυναίκα ασθενής μετά από 12 μήνες θεραπείας

2.3.4 Το έκκριμα του σαλιγκαριού σε δερματικές παθήσεις

i. Οξεία ακτινοδερματίτιδα

Η οξεία ακτινοδερματίτιδα είναι φλεγμονή του δέρματος που προκαλείται είτε από την έκθεση του δέρματος σε υψηλές δόσεις ακτινοβολίας (π.χ. για θεραπευτικούς λόγους) είτε από τη συνεχή ακτινοβολία (π.χ. για επαγγελματικούς λόγους). Το πρώιμο στάδιο εμφανίζεται λίγες μέρες μετά την ακτινοβολία, με μορφή ερυθμάτος, ενώ εάν το ποσό της ακτινοβολίας είναι υψηλό, μπορεί να δημιουργηθεί και εξέλκωση ή ακόμη και καρκίνωμα.

Από μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπους το 1999 από τον Ledo και τους συνεργάτες του φάνηκε η ευεργετική δράση του εκκρίματος στην οξεία ακτινοδερματίτιδα. Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν 100 ασθενείς με οξεία ακτινοδερματίτιδα, οι οποίοι έλαβαν θεραπεία με έκκριμα *Helix (Cryptomphalus) aspersa* για τρεις μήνες και η πρόοδος τους ελέγχθηκε την πρώτη εβδομάδα και μετά από το πρώτο, δεύτερο, τρίτο και έκτο μήνα μετά την έναρξη της θεραπείας. Τελικά, στην ομάδα που υποβλήθηκε σε θεραπεία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική κλινική βελτίωση στο ερύθημα, στον κνησμό, και στον πόνο, τόσο την πρώτη εβδομάδα όσο και ένα μήνα μετά. (Ledo *et al.*, 1999)



Figure 12: Σάρκωμα οξείας ακτινοδερματίτιδας και θεραπεία με έκκριμα σαλιγκαριού

Συμπερασματικά, η θεραπεία με έκκριμα σαλιγκαριού βελτιώνει σημαντικά το ερύθημα, τον κνησμό και την αίσθηση της καύσης στη ραδιοδερμική νόσο, συμβάλλοντας στην καλύτερη ποιότητα ζωής των ασθενών.

ii. Εγκαύματα

Η επούλωση τραυμάτων περιλαμβάνει πολλαπλούς πληθυσμούς κυττάρων, την εξωκυτταρική μήτρα και τη δράση διαλυτών μεσολαβητών, όπως παράγοντες ανάπτυξης και κυτοκίνες. Αν και η διαδικασία επούλωσης είναι συνεχής, μπορεί αυθαίρετα να χωριστεί σε τέσσερις φάσεις: (i) πήξη και αιμόσταση, (ii) φλεγμονή, (iii) κυτταρικός πολλαπλασιασμός, σχηματισμός ιστού, μετανάστευση

των κερατινοκυττάρων, αναγέννηση ινοβλαστών και αγγειογένεση και (iv) αναδιαμόρφωση τραύματος με σχηματισμό ουλώδους ιστού, αναγέννηση πρωτεογλυκάνων και κολλαγόνου. (Velnar *et al.*, 2009)

Σε μοριακό επίπεδο, το έκκριμα σαλιγκαριού επηρεάζει και τις τρεις αυτές φάσεις. Ειδικότερα, στη φάση της φλεγμονής δρα παρέχοντας οξυγόνο και συνεισφέροντας στη σύνθεση του κολλαγόνου. Στη φάση 2, ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων διεργείροντας τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και την ενεργοποίησή τους, παρέχοντας υαλουρονικό οξύ και ενισχύοντας την εξωκυτταρική μήτρα. Τέλος, στη φάση 3 βοηθά στην αναγέννηση των ιστών. (“Endocare- Scientific dossier,” n.d.)

Αυτές οι δράσεις του εκκρίματος επιβεβαιώνονται από τους Tsoutsos *et al.* το 2009, οι οποίοι αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα του εκχυλίσματος σε ανοιχτή πληγή από βαθιά εγκαύματα σε κλινική μελέτη που συμμετείχαν 27 ασθενείς. Τα αποτελέσματα μετά από θεραπεία 14 ημερών ή μέχρι την πλήρη επούλωση του εγκαύματος ήταν εντυπωσιακά, κάτι που μας αποδεικνύει τις επουλωτικές και αναπλαστικές ιδιότητες του εκχυλίσματος σαλιγκαριού και τη δυνατότητα χρήσης του στην ανάπλαση του δέρματος. (Tsoutsos *et al.*, 2009) Μάλιστα, στην επουλωτική αυτή δράση του εκχυλίσματος σημαντικό ρόλο παίζουν και οι αντιμικροβιακές ιδιότητες που εμφανίζει το έκκριμα σαλιγκαριού, όπως έχει αναφερθεί στην μελέτη των Pitt *et al.* 2015, με αξιολογή δράση έναντι αρκετών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και ασθενούς αποτελέσματος κατά του *Staphylococcus aureus*. (Pitt *et al.*, 2015)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΡΙΜΕΘΥΛΟΓΛΥΚΙΝΗ

3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η τριμεθυλογλυκίνη (TMG) είναι ένα παράγωγο αμινοξέος το οποίο εμφανίζεται πιο συχνά στα φυτά αλλά και σε ορισμένα ζώα. Δομικά ανήκει στην χημική ομάδα των μπεταϊνών (betaine) και αποτελείται από το αμινοξύ γλυκίνη, στο οποίο υπάρχουν τρία μεθύλια προσδεδεμένα στο άζωτο της αμινομάδας. Μια μπεταΐνη στη χημεία είναι οποιαδήποτε χημική ένωση, η οποία διαθέτει μια θετικά φορτισμένη κατιονική ομάδα, όπως ένα κατιόν τεταρτοταγούς αμμωνίου ή φωσφονίου, που δεν φέρει άτομο υδρογόνου και μια αρνητικά φορτισμένη ομάδα, όπως μία καρβοξυλική ομάδα, η οποία μπορεί να μην είναι γειτονική προς την κατιονική θέση. Η τριμεθυλογλυκίνη απομονώθηκε πρώτη φορά από τα ζαχαρότευτλα το 19^ο αιώνα και επειδή ήταν η πρώτη μπεταΐνη που ανακαλύφθηκε, πολλές φορές ο όρος «μπεταΐνη» χρησιμοποιείται εναλλακτικά και για την τριμεθυλογλυκίνη.

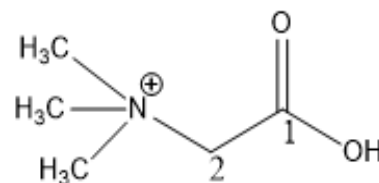


Figure 6: Χημική Δομή TMG

3.2 ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΡΙΜΕΘΥΛΟΓΛΥΚΙΝΗΣ

Είναι μια λευκή, άοσμη κρυσταλλική σκόνη με μοριακή μάζα 117.146 g mol⁻¹ και με σημείο τήξης στους 180°C. Είναι πολύ καλά διαλυτή στο νερό και αρκετά διαλυτή στη μεθανόλη, ενώ το τεταρτοταγές αμμώνιο που διαθέτει είναι σταθερό σε ουδέτερα pH.

Table 2: Χημικές Ιδιότητες

Χημικές ιδιότητες	
Μοριακός Τύπος	C ₅ H ₁₁ NO ₂
Μοριακή Μάζα	117.146
Σημείο τήξης	180 °C (356 °F; 453 K)
Διαλυτότητα στο DMSO	5 mg/ml

Διαλυτότητα σε μεθανόλη	1 mg/ml
pK _a	1.84

("ChemSpider | Search and share chemistry," n.d.)

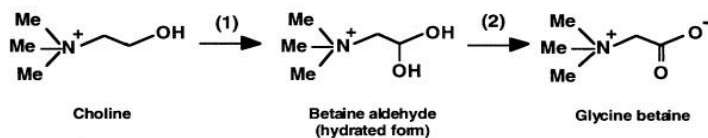
3.3 ΠΗΓΕΣ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η τριμεθυλογλυκίνη βρέθηκε για πρώτη φορά στα ζαχαρότευτλα, ωστόσο έχει βρεθεί και σε πολλά άλλα φυτά και ζώα, τα οποία αποτελούν μεγάλο μέρος της ανθρώπινης διατροφής. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί σε όλα τα σιτηρά και τα παράγωγα αυτών, σε διάφορα λαχανικά όπως σπανάκι, σπαράγγια, πατάτες, πιπεριές αλλά και σε κάποια φρούτα, όπως αβοκάντο, μανταρίνι και σταφύλι. Τέλος, μπεταΐνη υπάρχει σε πολλά θαλασσινά όπως γαρίδες, τόνος και σολωμός. (Craig, 2004; Zeisel *et al.*, 2003).

3.4 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ

Σε γνωστά βιολογικά συστήματα, η τριμεθυλογλυκίνη συντίθεται μέσω δύο διαφορετικών οδών από δύο διαφορετικά υποστρώματα: τη χολίνη και τη γλυκίνη αντίστοιχα. Η μετατροπή της χολίνης σε τριμεθυλογλυκίνη έχει μελετηθεί σε έναν αριθμό οργανισμών και η πορεία περιλαμβάνει ένα ή δύο ένζυμα, ανάλογα με τον τρόπο οξείδωσης της χολίνης (Figure 7). Στην οδό δυο ενζύμων, η τριμεθυλογλυκίνη σχηματίζεται ως αποτέλεσμα της οξείδωσης της χολίνης σε δύο βαθμίδες με το σχηματισμό της τοξικής ενδιάμεσης αλδεΐδης μπεταΐνης. Στα ανώτερα φυτά, οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από τη μιτοχονδριακή οξειδάση της χολίνης (CMO) και την αλδεΐδική αφυδρογονάση της μπεταΐνης (BADH). Τέλος, η πορεία από τη γλυκίνη προς τριμεθυλογλυκίνη ανακαλύφθηκε πρόσφατα και μέχρι σήμερα έχει αναγνωριστεί μόνο σε δύο εξαιρετικά αλοφιλικούς μικροοργανισμούς, το *Ectothiorhodospira halochloris* και το *Actinopolyspora halophila*. Στους μικροοργανισμούς αυτούς, η τριμεθυλογλυκίνη δημιουργείται από τη γλυκίνη μέσω τριών διαδοχικών N-μεθυλιώσεων, οι οποίες καταλύονται από δύο εξαρτώμενες από S-αδενοσυλομεθειονίνη μεθυλοτρανσφεράσες. (Sakamoto and Murata, 2002)

(a)



(b)

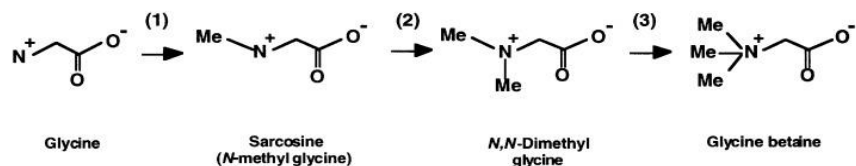


Figure 7 : Βιοσυνθετικές πορείες της TMG (Sakamoto and Murata, 2002)

3.5 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Το ανθρώπινο σώμα μπορεί να μετατρέψει στο ήπαρ την χολίνη που προσλαμβάνει από την διατροφή του σε τριμεθυλογλυκίνη. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αρχικά η χολίνη μετατρέπεται στην αλδεύδη της μεταΐνης μέσω μιτοχονδριακής οξειδάσης της χολίνης, και στη συνέχεια σχηματίζεται η τριμεθυλογλυκίνη μέσω της αφυδρογονάσης της αλδεύδης της μεταΐνης. Αυτό το μεταβολικό μονοπάτι αποτελεί το βασικό μεταβολικό ρόλο της χολίνης στον ανθρώπινο οργανισμό, καθιστώντας την τριμεθυλογλυκίνη τον κύριο ενεργό μεταβολίτη της χολίνης, χωρίς ωστόσο αυτό να σημαίνει ότι είναι και πιο δραστική από την χολίνη. (Lin and Wu, 1986) Η υπόλοιπη χολίνη χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ακετυλοχολίνης και φωσφολιπιδίων, όπως της φωσφατιδυλοχολίνης, ουσίας που εμπλέκεται στη σύνθεση της ομοκυστεΐνης. Στη διαδικασία αυτή, φαίνεται ότι σημαντικό ρόλο παίζει η τριμεθυλογλυκίνη ως δότης μονάδων άνθρακα μέσω του ενζύμου betaine-homocysteine-S-methyltransferase (BHMT). Συγκεκριμένα η τριμεθυλογλυκίνη προκαλεί μείωση της ομοκυστεΐνης μετατρέποντας την σε μεθειονίνη και έτσι αποτελεί έναν ενδογενή μηχανισμό ελέγχου των επιπέδων ομοκυστεΐνης στον ανθρώπινο οργανισμό (Ueland, 2011). Τέλος, η τριμεθυλογλυκίνη εκτός από υποστρώμα του ενζύμου BHMT, αποτελεί ένα φυσικό ωσμοπροστατευτικό, βοηθάει δηλαδή στη σταθεροποίηση της ωσμωτικής πίεσης μέσα και έξω από τα κύτταρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ινδικά χοιρίδια, όπου παρατηρήθηκε χαρακτηριστική μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου BHMT στα πειραματόζωα που χορηγήθηκε αλμυρό νερό. (Delgado-Reyes and Garrow, 2005)

3.6 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΑΛΛΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Τόσο στα φυτά όσο και σε πολλούς θαλάσσιους οργανισμούς, αλλά και σε πολλούς μικροοργανισμούς η τριμεθυλογλυκίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση τους κάτω από ακραίες συνθήκες, λόγω των ωσμολυτικών της ιδιοτήτων. Γενικά, τα περισσότερα φυτά όταν βρίσκονται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας ή έντονων θερμοκρασιακών αλλαγών, παράγουν αρκετές ουσίες με ωσμολυτική δράση όπως προλίνη, βαλίνη, ισολευκίνη κ.ά. συμπεριλαμβανομένης και της τριμεθυλογλυκίνης, με σκοπό την επιβίωσή τους (Parida and Das, 2005). Όσον αφορά τη τριμεθυλογλυκίνη, κάποια φυτά που μπορούν να συνθέτουν την τριμεθυλογλυκίνη, όπως το σπανάκι και το κριθάρι, συσσωρεύουν σχετικά υψηλά επίπεδα της ουσίας στους χλωροπλάστες τους, ενώ άλλα, όπως ο καπνός, δεν τη συνθέτουν καθόλου. Σε αυτά που την συνθέτουν, η τριμεθυλογλυκίνη βιοσυντίθεται από την χολίνη με οξείδωση δύο σταδίων (όπως συμβαίνει και στους μικροοργανισμούς) και η συγκέντρωση της στα φύλλα αυξάνεται όταν αυτά υποβάλλονται σε στρες, μέσω αύξησης της έκφρασης των γονιδίων των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτή τη βιοσυνθετική πορεία (Burgand Ferraris, 2008)(Sakamoto *et al.*, 2002)

Τέλος, μεγάλο ενδιαφέρον εμφανίζει η δράση της τριμεθυλογλυκίνης στους θαλάσσιους οργανισμούς που ζούν σε μικρά ή μεγάλα βάθη. Συγκεκριμένα, αυτά τα ζώα συσσωρεύουν ουρία μαζί με μεθυλαμίνες, συμπεριλαμβανομένης και της τριμεθυλογλυκίνης, στους ιστούς τους και το εξωκυτταρικό υγρό για να εξισορροπήσουν την υψηλή πίεση του θαλάσσιου νερού.(Burg and Ferraris, 2008)

3.7 ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΡΙΜΕΘΥΛΟΓΛΥΚΙΝΗΣ ΓΙΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΥΣ ΣΚΟΠΟΥΣ

Η τριμεθυλογλυκίνη είναι μια ουσία που λόγω της μεγάλης διατροφικής αξίας η χρήση της περιορίζεται κυρίως στα συμπληρώματα διατροφής. Λόγω των τριών μεθυλίων που διαθέτει αποτελεί ένα πολύ καλό δότη μεθυλίων, τα οποία είναι σημαντικά για την αναπαραγωγή κυττάρων και άλλες χημικές διεργασίες στο σώμα, γεγονός που μας υποδεικνύει την πιθανή χρήση της ουσίας στην θεραπεία αρκετών ασθενιών. Ακόμη η ιδιότητά της να δρα ως μια φυσική ωσμολυτική ουσία θεωρείται ότι προστατεύει τα κύτταρα από το οσμωτικό στρες, ενώ παράλληλα βοηθάει στην ενυδάτωση τους.

Η ανεπάρκεια τριμεθυλογλυκίνης ή οι ανωμαλίες στο μεταβολισμό της έχουν συνδεθεί με μια ποικιλία ασθενειών, π.χ. διαβήτη, καρδιαγγειακή νόσο και νευρογνωστικές διαταραχές, ενώ αντίθετα, η συστηματική αύξηση τριμεθυλογλυκίνης έχει συνδεθεί με βελτιωμένα κλινικά αποτελέσματα στις γνωστικές διαταραχές όπως η επιληψία, η νόσος Alzheimer και άλλες μορφές άνοιας / γνωστικών ελλειμμάτων. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε τριαντατέσσερις υγιείς αντρες και γυναίκες, φάνηκε ότι η χορήγηση μεταΐνης σε δόσεις 3-6 g/d είναι ικανή να μειώσει αρκετά την ολική ομοκυστεΐνη του πλάσματος, ένας σημαντικός παράγοντας

κινδύνου για την εμφάνιση αγγειακών παθήσεων. Μάλιστα, η χορήγηση συνδυασμού μεταϊνής με φολικό οξύ φάνηκε να εμφανίζει ακόμη καλύτερα αποτελέσματα, γεγονός που μας οδηγεί να σκεφτούμε την πιθανή μελλοντική χρήση της ουσίας στη πρόληψη αγγειακών νοσημάτων. (Alfthan et al., 2004) Ωστόσο, μελέτες σε νεφροπαθείς και σε παχύσαρκους ανθρώπους που βρίσκονται σε δίαιτα απώλειας βάρους υποδηλώνουν ότι η χορήγηση τριμεθυλογλυκίνης αυξάνει τη χοληστερόλη στο αίμα. Όμοια αποδείχθηκε και σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε υγιείς ανθρώπους, γεγονός που υποδηλώνει ότι η χρήση της στη μείωση της ομοκυστεΐνης και την πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι ακόμη αρκετά αμφιλεγόμενη. (Olthof et al., 2005) Ακόμη, τα μέτρια αυξημένα επίπεδα ολικής ομοκυστεΐνης στο πλάσμα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ασθένειας Alzheimer, έτσι ο έλεγχος της ομοκυστεΐνης με τη βοήθεια της μεταϊνής μπορεί να μειώσει τον ρυθμό της γνωσιακής παρακμής σε σχετικά νεαρούς ασθενείς με νόσο Alzheimer (Oulhaj et al., 2010). Όσον αφορά την συσχέτιση της τριμεθυλογλυκίνης με το διαβήτη έχει αποδειχθεί ότι όταν τα επίπεδα μεταϊνής στον ορό είναι χαμηλά και τα επίπεδα ομοκυστεΐνης υψηλά, εμφανίζεται αυξημένος κίνδυνος μικροαγγειοπάθειας σε ασθενείς με διαβήτη. (Chen et al., 2013) Μάλιστα, σε πολλούς ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, έχει παρατηρηθεί ότι η απέκκριση τριμεθυλογλυκίνης από τα ούρα αυξάνεται είτε λόγω της διατροφής είτε λόγω της θεραπευτικής αγωγής, έτσι στις περιπτώσεις αυτές η χορήγηση peros μεταϊνής ίσως είναι αρκετά επωφελής. (Lever et al., 2014).

Τέλος, σε κυτταρικό επίπεδο, η τριμεθυλογλυκίνη είναι μια ωσμολυτικά δραστική ουσία η οποία προστατεύει τα κύτταρα από το ωσμωτικό στρες και βοηθά στην ενυδάτωσή τους. Πιθανώς λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα της μπορεί να μετακινηθεί μέσα ή έξω από το κύτταρο και να επηρεάσει την ενυδάτωση του, επηρεάζοντας την τονικότητα του ενδοκυττάριου ή εξωκυττάριου υγρού. Αυτές οι ενυδατικές ιδιότητές της σε συνδυασμό με την δυνατότητα ανταλλαγής μεθυλομάδων έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανές να επηρεάζουν την αθλητική δραστηριότητα στο ανθρώπινο σώμα ενισχύοντας την αθλητική απόδοση και προστατεύοντας από την αφυδάτωση κατά τη διάρκεια φυσιολογικής άσκησης (Armstrong et al., 2008; Cholewa et al., 2013).

3.8 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΘΥΛΟΓΛΥΚΙΝΗΣ

3.8.1 Απομόνωση και προσδιορισμός

Η τριμεθυλογλυκίνη έχει βρεθεί σε πολλά φυτά και ρίζες και έχουν αναπτυχθεί κάποιες αναλυτικές μέθοδοι για την απομόνωση του από τις ρίζες. Η πιο πρόσφατη και αξιόπιστη μέθοδος αναπτύχθηκε από τους Rivoira *et al.* Πρόκειται για μια νέα, γρήγορη και αποτελεσματική διαδικασία για την απομόνωση και τον προσδιορισμό της τριμεθυλογλυκίνης από τις ρίζες δύο διαφορετικών ποικιλιών του *B.vulgaris*. Για την απομόνωση της μπεταΐνης από τις ρίζες χρησιμοποιήθηκε επιταχυνόμενη εκχύλιση (ASE) συνδυασμένη με εκχύλιση στερεής φάσης, ενώ ο προσδιορισμός της ουσίας έγινε με χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης, σε συνδυασμό με διπλή φασματομετρία μάζας. (Rivoira *et al.*, 2017) Τέλος, έχει αναπτυχθεί πρωτόκολο απομόνωσης της τριμεθυλογλυκίνης και από ανθρώπινα ούρα, σύμφωνα με το οποίο το από το μεθανολικό εκχύλισμα ούρων γίνεται κατακρίμνηση της τριμεθυλογλυκίνης σε όξινο περιβάλλον και αφού το υλικό διηθηθεί, καθαρίζεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης. Με την μέθοδο αυτή πραγματοποιήθηκε απομόνωση τόσο της τριμεθυλογλυκίνης όσο και της μπεταΐνης της προλίνης και η τελική ταυτοποίηση τους έγινε με φασματοσκοπία NMR (Chambers and Kunin, 1987).

3.8.2 Ποσοτικός προσδιορισμός

i. Βιολογικά υγρά

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα επίπεδα της τριμεθυλογλυκίνης σε ανθρώπινα βιολογικά υγρά μπορεί να σχετίζεται με την ύπαρξη διαφόρων ασθενειών. Η φασματοσκοπία NMR είναι μια από τις μεθόδους που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλών μεταβολιτών σε βιολογικά υγρά, συμπεριλαμβανομένης και της τριμεθυλογλυκίνης. Συγκεκριμένα, το 1995 οι Peter Lundberg *et al.* χρησιμοποίησαν τη φασματοσκοπία NMR για τον προσδιορισμό της τριμεθυλογλυκίνης στα ούρα ασθενών με πρόωρη αγγειακή ασθένεια και ήπια ομοκυστεϊνέμια. Σύμφωνα με τη μεθοδολογία που ανέπτυξαν, χρησιμοποιούνται 10 ml ούρα τα οποία διαλύονται σε 2ml D₂O και στο διάλυμα προστίθεται, ως εσωτερικό πρότυπο, διάλυμα 3-(Trimethylsilyl)-1-propanesulfonic acid (DSS), γνωστής συγκέντρωσης. Η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης ήταν εξαιρετική ($r = 0,997$, $P = 0,0001$) στην περιοχή συγκέντρωσης 0,2-1,2 mmol/L, όμως η ευαισθησία της μεθόδου δεν ήταν ικανοποιητική (Lundberg *et al.*, 1995). Μια σημαντική βελτίωση στην ανάλυση της τριμεθυλογλυκίνης πραγματοποιήθηκε από τους Allen *et al.* σύμφωνα με τους οποίους γίνεται μετατροπή της τριμεθυλογλυκίνης σε διμεθυλογλυκίνη, παραγωγοποίηση της και μέτρηση με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συνδυασμένης με φασματομετρία μάζας. (Allen *et al.*, 1993) Ωστόσο, η μέθοδος είναι πολύ επίπονη και χρονοβόρα επειδή απαιτεί μετατροπή της τριμεθυλογλυκίνης. Ακόμη, όσον αφορά το αίμα και τα ούρα, έχει αναπτυχθεί μέθοδος

ποσοτικοποίησης της τριμεθυλογλυκίνης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, αφού πρώτα το δείγμα έχει υποστεί επεξεργασία παραγωγοποίησης. Ο διαχωρισμός γίνεται με ισοκρατικό σύστημα ακετονιτριλίου και νερού που περιέχει χολίνη και η ανίχνευση της ουσίας γίνεται στα 254 nm. Η μέθοδος είναι ακριβής και οικονομικά αποδοτική και έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων μπεταΐνης και DMG στο ανθρώπινο πλάσμα και στα ούρα, ενώ αποτέλεσε τη βάση ανάπτυξης μεθόδων προσδιορισμού και σε τρόφιμα, όπως θα αναφερθεί παρακάτω.(Laryea *et al.*, 1998)

Η πιο πρόσφατη και αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού της τριμεθυλογλυκίνης σε βιολογικά υγρά αναπτύχθηκε το 2003 από τους Pal I. Holm *et al.*, χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία στήλης - κανονικής φάσης και φασματοσκοπία μάζας. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή τα δείγματα ορού ή πλάσματος αρχικά αποπρωτεϊνοποιούνται με ανάμιξη με τρεις όγκους ακετονιτριλίου που περιέχουν d₉-χολίνη και d₉-βεταΐνη ως εσωτερικά πρότυπα. Έπειτα, χρησιμοποιείται στήλη πυριτίου κανονικής φάσης για τον διαχωρισμό της χολίνης (χρόνος κατακράτησης, 2.8 λεπτά), τριμεθυλογλυκίνης (1.3 λεπτά), διμεθυλογλυκίνης (1.15 λεπτά) και εσωτερικά πρότυπα, τα οποία ανιχνεύονται ως θετικά ιόντα με διπλή φασματοσκοπία μάζας. Αυτή είναι η πρώτη μέθοδος για τη συνδυασμένη μέτρηση χολίνης, μπεταΐνης και DMG σε ανθρώπινο πλάσμα ή ορό. Τέλος, και για τους τρεις μεταβολίτες ο προσδιορισμός ήταν γραμμικός στην περιοχή 0.4-400 $\mu\text{mol} / \text{L}$ και το κατώτατο όριο ανίχνευσης ήταν $<0.3 \mu\text{mol} / \text{L}$.(Holm *et al.*, 2003)

ii. **Τρόφιμα**

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την διατροφική αξία της τριμεθυλογλυκίνης έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη αρκετών μεθόδων προσδιορισμού της σε διάφορα τροφικά. Με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό της τριμεθυλογλυκίνης στην αλευρόνη, στο πίτουρο και στο αλεύρι (*Triticum aestivum* L.), αναπτύχθηκε μέθοδος βασισμένη στην φασματοσκοπία NMR. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα τελικά επεξεργασμένα δείγματα διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος 0,1 M (pH 7,0) και έπειτα σε D₂O, που περιέχει 1 mM του εσωτερικού προτύπου τριμεθυλοσιλυλο-2,2,3,3-τετραδετεροπροπιονικού νατρίου και μετρούνται. (Graham *et al.*, 2009) Η καμπύλη ήταν αρκετά γραμμική και η ευαισθησία της μεθόδου μεγάλη, όμως η οργανολογία είναι αρκετά ακρίβη. Έτσι, λίγο αργότερα, οι Hyun Du Shin *et al.* ανέπτυξαν μια μέθοδο ποσοτικοποίησης της μπεταΐνης με υγρή χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων με ανίχνευση διάχυτου φωτός σκέδασης (HILIC-ELSD). Στη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιήθηκε στήλη Kinetex HILIC (2,1 x 100 mm, 2,6 μm) γεμάτο με σωματίδια σύντηξης πυρήνα με κινητή φάση ακετονιτρίλιο και 10 mM μυρμηκικό αμμώνιο (pH 3.0) / ακετονιτρίλιο (90/10, v / v). Ο διαχωρισμός έγινε με βαθμιδωτή έκλουση με ρυθμό ροής 0.7 ml / min και χρησιμοποιήθηκε σταχυδρίνη ως εσωτερικό πρότυπο. Η μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ποσότητας μπεταΐνης σε δεκατέσσερα δείγματα *Fructus Lycii* από διαφορετικές τοποθεσίες, αποδεικνύοντας ότι αποτελεί μια απλή, γρήγορη και κατάλληλη για ποιοτικό έλεγχο του *Fructus Lycii* (Shin *et al.*, 2012). Ακόμη ο ποσοτικός προσδιορισμός

τριμεθυλογλυκίνης και γενικά παραγώγων χολίνης έχει γίνει με liquid chromatography - mass spectrometry (LC/MS-MS) και με liquid chromatography/electrospray ionization-isotope dilution mass spectrometry (LC/ESI-IDMS) (Bruce et al., 2010; Koc et al., 2002), όμως αυτές οι τεχνικές είναι αρκετά ακριβές, εξειδικευμένες και χρειάζονται μεγάλη εμπειρία χρήσης. Για το λόγο αυτό, το 2016 επικυρώθηκε η μέθοδος προσδιορισμού τριμεθυλογλυκίνης με HPLC-UV που είναι μια αρκετά απλή και ευρέως διαθέσιμη τεχνική. Βασιζόμενοι στην αντίστοιχη μέθοδο ποσοτικοποίησης για τα βιολογικά υγρά (Laryea et al., 1998), οι Mohammed Hefni et al. προχώρησαν στην επικύρωση της μεθόδου για την ανάλυση τροφίμων και τη σύγκριση της με τις μεθόδους LC/MS. Αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μελέτης ήταν ότι η παραγωγοποίηση της μπεταΐνης, σε συνδυασμό με έναν απλό χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιώντας HPLC-UV, καθιστά ευρύτερα διαθέσιμη την ανάλυση ρουτίνας της μπεταΐνης στα τρόφιμα, ενώ παράλληλα δίνει συγκρίσιμα αποτελέσματα με τις μεθόδους LC-MS. (Hefni et al., 2016)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΑΛΛΑΝΤΟΪΝΗ

4.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η αλλαντοΐνη είναι διουρεϊδίο και αποτελεί μεταβολικό ενδιάμεσο, σε πολλά είδη οργανισμών, στον καταβολισμό των πουρινών. Μπορεί να βρεθεί σε πολλούς οργανισμούς, από βακτήρια, φυτά, θαλάσσιους οργανισμούς μέχρι και θηλαστικά. Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1800 από τον ιταλό ιατρό Michele Francesco Buniva και το γάλλο χημικό Louis Nicolas Vauquelin, οι οποίοι λανθασμένα πίστευαν ότι είναι συστατικό του αμνιακού υγρού. Το 1821, ο γάλλος χημικός Jean Louis Lassaigne το βρήκε στο ρευστό υγρό της αλλαντοΐδας, μίας από τις τέσσερις εμβρυικές μεμβράνες που υπάρχει στο αμνιωτικό αυγό των αμνιωτών οργανισμών, (ερπετά, πτηνά και θηλαστικά) και το ονόμασε "l'acide allantoïque". Λίγο αργότερα, το 1837, οι γερμανοί χημικοί Friedrich Wöhler και Justus Liebig το συνθέτουν από ουρικό οξύ και το μετονομάζουν σε "allantoïn". Τα επόμενα χρόνια ακολούθησαν και άλλες μελέτες οι οποίες αποκάλυψαν την ύπαρξη ουρικού οξέος και αλλαντοΐνης στα ούρα σκύλων και άλλων θηλαστικών ζώων, ενώ το 1909 αποδείχθηκε ότι η αλλαντοΐνη αποτελεί έναν από τους μεταβολίτες απέκκρισης του ουρικού οξέος σε αρκετά θηλαστικά (Uyeno, 1919). Τέλος, σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι μικρές ποσότητες της αλλαντοΐνης έχουν ανιχνευθεί στα ούρα φυσιολογικών ανθρώπων όμως, ο Viekhonskii απέδειξε ότι το ουρικό οξύ δεν μπορεί να οξειδωθεί στον ανθρώπινο οργανισμό λόγω έλλειψης του ειδικού ενζύμου.(Folin *et al.*, 1924; Shestopalov *et al.*, 2006)

4.2 ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΛΛΑΝΤΟΪΝΗΣ

Η αλλαντοΐνη χημικά αποτελεί ένα διουρεϊδίο του γλυοξυλικού οξέος με μοριακό βάρος 158.12 g·mol⁻¹ και είναι σταθερή σε εύρος pH 2-8. Είναι μια άοσμη, λευκή, κρυσταλλική σκόνη με σημείο τήξης στους 230 °C και είναι καλά διαλυτή στο θερμό νερό, αρκετά διαλυτή σε αλκοολικά διαλύματα, ενώ είναι αδιάλυτη στον αιθυλαιθέρα και άπολους διαλύτες.(Pubchem, n.d.)

Table 3: Χημικές Ιδιότητες αλλαντοΐνης

Χημικές Ιδιότητες			
Μοριακός Τύπος	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	Σημείο Βρασμού	478 °C (892 F; 751 K)
Όνομα κατά IUPAC	2,5-διοξο-4-ιμιδαζολιδινυλουρία	Διαλυτότητα στο νερό	0.57 g/100 ml (25 °C), 4.0 g/100 ml (75 °C)
Μοριακή Μάζα	158.12 g·mol ⁻¹	Διαλυτότητα	Διαλυτή σε alcohol, pyridine, NaOH Αδιάλυτη σε ethyl ether
Πυκνότητα	1.45 g/cm ³	log P	-3.14
Σημείο Τήξης	230 °C (446 °F; 503 K)	pK _a	8.48

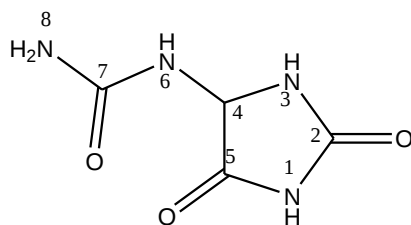


Figure 8: Χημική δομή αλλαντοΐνης

Τέλος, στα διαλύματα αλλαντοΐνης υπάρχουν σε ισορροπία η ενολική και η κετονική μορφή όπως φαίνεται παρακάτω:

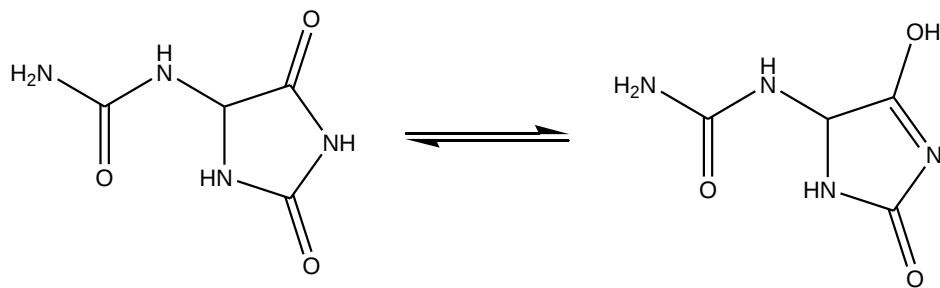


Figure 9: AKEMA fine chemicals/pres-allantoin

4.3 ΠΗΓΕΣ

Η αλλαντοΐνη έχει απομονωθεί από πολλούς οργανισμούς κυρίως από φυτά και ζώα. Στα φυτά φαίνεται να υπάρχει κυρίως στα φύλλα και στις ρίζες και σε αρκετά μεγάλες περιεκτικότητες. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι υπάρχει στο φυτό *Symphytum officinale* στα φύλλα και τις ρίζες σε ποσοστό 0.1-6%. Εκτός από φυτά της οικογένειας Boraginaceae, όπως το *Symphytum* και το *Borago officinalis*, έχει βρεθεί και στις οικογένειες Gramineae (*Triticum*, *Zea mays*), Fabacea (*Glycine max*, *Trifolium pretense*) κ.ά. (Table 4)

Table 4: Φυτά με μεγάλη περιεκτικότητα σε αλλαντοΐνη

Λατινικό όνομα			
<i>Symphytum officinale</i>	<i>Borago officinalis</i>	<i>Lupinus albus</i>	<i>Triticum aestivus</i>
<i>Aesculus hippocastanum</i>	<i>Brassica sp.</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Trifolium pretense</i>
<i>Argostemma githago</i>	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Pisum sativum</i>	<i>Vinga mungo</i>
<i>Aristolochia debilis</i>	<i>Coffee Arabica</i>	<i>Prunus cerasus</i>	<i>Zea mays</i>
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	

("Akema Fine Chemicals," n.d.)

4.4 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ

Η οδός βιοσύνθεσης της αλλαντοΐνης αποτελεί ένα κομμάτι του μεταβολισμού αζωτούχων ενώσεων στους διάφορους οργανισμούς. Συνήθως, αποτελεί προϊόν οξείδωσης του ουρικού οξέος και ανάλογα με τον οργανισμό, σταματάει σε διαφορετικό στάδιο. Πιο συγκεκριμένα, στα φυτά οι οδοί που προτείνονται για τη σύνθεση ουρεϊδίων είναι δύο:

- Με συμπύκνωση δύο μορίων ουρίας και ενός γλυοξυλικού οξέος και
 - Με αναερόβια οξείδωση πουρινών
- (Woo *et al.*, 1980)

Σύμφωνα με την δεύτερη θεωρία, η γουανίνη και η αδενοσίνη μετατρέπονται σε ξανθίνη και μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης σχηματίζεται ουρικό οξύ. Αυτό στη συνέχεια, μέσω της ουρικάσης, οξειδώνεται σε αλλαντοΐνη, η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε αλλαντοϊκό οξύ όπως φαίνεται στην εικόνα 10. (Woo *et al.*, 1980)

Αν και ευρέως πιστεύεται ότι η αλλαντοΐνη είναι το προϊόν της αντίδρασης οξειδάσης ουρίας, έχει αποδειχθεί ότι δεν είναι το άμεσο προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης και οι λεπτομέρειες της βιογένεσης της αλλαντοΐνης παραμένουν άγνωστες (Kahn and Tipton, 2000). Η μη ενζυματική αποσύνθεση του οπτικά ενεργού ενδιάμεσου της οξείδωσης ουρικού οξέος (5-hydroxyisourate) παράγει ρακεμική αλλαντοΐνη (Kahn, 1998) και έχει αναφερθεί ότι το ένζυμο αλλαντοϊνάση, το οποίο καταλύει τη μετατροπή της αλλαντοΐνης στο αλλαντοϊκό, είναι ειδικό για το S-εναντιομερές της αλλαντοΐνης (Xu *et al.*, 2011).

Στα μαλάκια και στα θηλαστικά, εκτός από τα πρωτεύοντα, το ουρικό οξύ οξειδώνεται σε αλλαντοΐνη και με αυτή τη μορφή απεκκρίνεται στα ούρα. Στα περισσότερα ψάρια, η μεταβολική πορεία προχωράει ένα βήμα παρακάτω και η αλλαντοΐνη υδρολύεται στο αλλαντοϊκό οξύ, μέσω του ενζύμου αλλαντοϊνάση και εκκρίνεται από τον οργανισμό με αυτή τη μορφή. Τέλος, άλλα ψάρια, αμφίβια και κάποια μαλάκια του γλυκού νερού, μετατρέπουν το αλλαντοϊκό οξύ σε δυο μόρια ουρίας, η οποία απεκκρίνεται από τα ούρα, ενώ τα υπόλοιπα ζωικά είδη αποικοδομούν την ουρία σε αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα χρησιμοποιώντας το ένζυμο ουρεάση. (Garrett and Grisham, 2016)

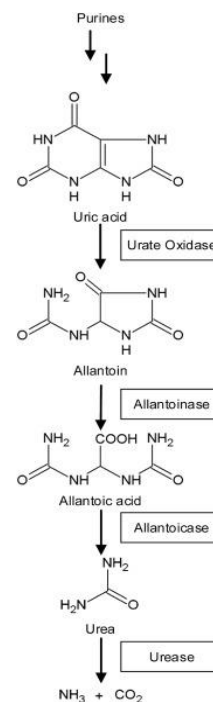


Figure 10:
Αναερόβια οξείδωση
πουρινών

4.5 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Στον άνθρωπο, λόγω έλλειψης του ενζύμου ουρικής, το ουρικό οξύ δεν μπορεί να μετατραπεί σε αλλαντοΐνη. Η παρουσία αλλαντοΐνης στο πλάσμα ανθρώπων προκύπτει από μη ενζυματική οξείδωση του ουρικού οξέος, με την βοήθεια ελεύθερων ριζών ή με το κυτόχρωμα. Οι ελεύθερες ρίζες συσχετίζονται με πολλές ασθένειες, όπως αθηροσκλήρωση, ρευματοειδής αρθρίτιδα, ισχαιμικές ασθένειες και καρκίνο. Στις αρχές της δεκαετίας του 90', λοιπόν, λόγω αυτής της συσχέτισης της αλλαντοΐνης με τις ελεύθερες ρίζες, πολλοί ερευνητές υποστήριξαν ότι η ύπαρξη της αλλαντοΐνης στο ανθρώπινο πλάσμα, μπορεί να σηματοδοτεί την αύξηση των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό (Benzie *et al.*, 1999; Lagendijk *et al.*, 1995; Marklund *et al.*, 2000). Η άποψη αυτή, εξακριβώθηκε από κλινικές μελέτες στις οποίες γινόταν ποσοτικοποίηση της αλλαντοΐνης και του ουρικού οξέος στο πλάσμα και στα ούρα ανθρώπων που βρίσκονταν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες οξειδωτικού στρες, όπως έντονη σωματική άσκηση (Mikami *et al.*, 2000; Räsänen *et al.*, 1993) και σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (Yardim-Akaydin *et al.*, 2004). Έτσι, συμπεραίνουμε ότι η αλλαντοΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας καλός *in vivo* δείκτης οξειδωτικού στρες, ωστόσο απαιτούνται ακόμη αρκετές μελέτες ώστε να αποτελεί ασφαλές κριτήριο.

4.6 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΑΛΛΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αλλαντοΐνη αποτελεί μεταβολίτη τόσο των φυτών όσο και άλλων οργανισμών όπως μικροοργανισμών. Όσον αφορά τα φυτά, υπάρχει σε αρκετά είδη σε μεγάλες ποσότητες, με κυριότερο το *Symphytum officinale* L. Αποτελεί ενδιαμέσο μεταβολίτη στον καταβολισμό των πουρινών και χρησιμεύει κατά κύριο λόγο σαν φορέας αποθήκευσης και μεταφοράς του αζώτου στα φυτά (Smith and Atkins, 2002). Πόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η αλλαντοΐνη φαίνεται να εμπλέκεται σε ένα ακόμη πιο ενδιαφέρον κομμάτι της ζωής ενός φυτού. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η αλλαντοΐνη παράγεται σε μεγάλες ποσότητες σε φυτά τα οποία βρίσκονται υπό συνθήκες στρες, όπως σε ξηρασία (Yobi *et al.*, 2013), σε υψηλή αλατότητα (Wang *et al.*, 2016) και στο εκτεταμένο σκοτάδι (Brychkova *et al.*, 2008). Επίσης, μελέτη που πραγματοποιήθηκε στις ρίζες και στα ριζώματα του φυτού *Symphytum officinale* L., έδειξε ότι η αύξηση της φωτοπεριόδου προκάλεσε αύξηση της περιεκτικότητας αλλαντοΐνης στις ρίζες και μείωση στα ριζώματα. Έτσι φαίνεται, ότι ο χρόνος έκθεσης στον ήλιο επηρεάζει τόσο τη σύνθεση της αλλαντοΐνης από τις ρίζες όσο και την αποθήκευση της στα ριζώματα. (Castro *et al.*, 2001)

Στα βακτήρια η αλλαντοΐνη, όπως και άλλα παράγωγα πουρινών, χρησιμοποιούνται ως δευτερεύουσες πηγές αζώτου υπό συνθήκες μειωμένου θρεπτικού υλικού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το *Bacillus subtilis* το οποίο μπορεί να χρησιμοποιεί την αλλαντοΐνη ως μοναδική πηγή αζώτου (Goelzer *et al.*, 2008). Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι σε πολλά είδη βακτηρίων, όπως στο *Streptomyces coelicolor*, ο καταβολισμός της αλλαντοΐνης αναστέλλει την παραγωγή

αντιβιοτικών, γεγονός που δείχνει μια συσχέτιση της βιοσύνθεσης των αντιβιοτικών με το μεταβολισμό της αλλαντοΐνης. (Navone *et al.*, 2014)

4.7 ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΛΛΑΝΤΟΪΝΗΣ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ

Η αλλαντοΐνη έχει ευρέως αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως μόριο με πολλές φαρμακολογικές δράσεις, κυρίως στο δέρμα, μεταξύ των οποίων: επούλωση τραυμάτων, αντι-ερεθιστική, ενυδάτωση και απομάκρυνση νεκρωτικού ιστού (Araújo *et al.*, 2010), διεγείροντας τη μιτώση των κυττάρων, καθώς και προαγωγέας επιθηλιακής διέγερσης, αναλγητικής και κερατολυτικής δράσης. (W. S. Loots, 1979)

Το φυτό *Symphytum officinalis* έχει δείξει εξαιρετικές επουλωτικές δράσεις σε τραύματα από εγκαύματα, αντιφλεγμονώδη δράση και γενικά εμφανίζει πολύ καλές αναπλαστικές ιδιότητες. Εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητας του φυτού σε αλλαντοΐνη, πολλοί αποδίδουν τις ευεργετικές αυτές ιδιότητες, κατά κύριο λόγο, στην ύπαρξη της ουσίας αυτής, σε συνδυασμό φυσικά και με άλλα συστατικά του φυτού. (Savic *et al.*, 2015; Sowa *et al.*, 2017) Επιστημονικές μελέτες σε πειραματόζωα, έχουν δείξει ότι η αλλαντοΐνη βοηθά στην επούλωση τραυμάτων στο δέρμα, μέσω της ρύθμισης της φλεγμονώδους απόκρισης, της διέγερσης του πολλαπλασιασμού των ινοβλαστών και της σύνθεσης της εξωκυττάριας μήτρας. (Araújo *et al.*, 2010) Μάλιστα, φαίνεται να έχει αξιόλογα αποτελέσματα στην καταπολέμηση των ουλών από εγκαύματα, τόσο σε λειτουργικό επίπεδο (επαναπορρόφηση και λείανση) για τους ιστούς όσο και σε αισθητικό επίπεδο (ελαφρύτερο χρώμα των ουλών) αλλά παράλληλα βοηθά και στην ανάκτηση των φυσικών ιδιοτήτων του νεοσχηματιζόμενου ιστού (Magliaro *et al.*, 1999). Επίσης, μία από τις κυριότερες δράσεις της στο δέρμα είναι η εξαιρετική κερατολυτική δράση της οποίας όμως ο μηχανισμός δεν είναι πλήρως περιγραφμένος. Φαίνεται πως η αλλαντοΐνη, λόγω της δομής της, εισχωρεί στο μεσοκυττάριο χώρο μεταξύ των κερατινοκυττάρων με αποτέλεσμα την απομάκρυνση του νεκρού ιστού και τη φυσική απολέπιση του δέρματος, κάτι που συμβάλλει σημαντικά τόσο στην επούλωση και την ανάπτυξη του δέρματος, όσο και στην υγιή εμφάνισή του και την απαλότητα (Szymańska, 2012). Ένας ακόμη παράγοντας που την καθιστά τόσο ευεργετική για το δέρμα είναι η επίδραση της στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ειδικότερα, διεγείρει την μίτωση των κυττάρων, προάγει τον πολλαπλασιασμό τους και την αναγέννηση κατεστραμμένων επιθηλιακών κυττάρων. Έτσι, προκαλεί ταχύτερη αποκατάσταση του δέρματος, καθιστώντας έτσι την επιδερμίδα να συγκρατεί πιο εύκολα περισσότερο νερό, στοιχείο πολύ σημαντικό για την ανάπτυξη του δέρματος (Szymańska, 2012; W. S. Loots, 1979). Αξίζει μάλιστα να αναφερθεί ότι η αλλαντοΐνη εμφανίζει τις κερατολυτικές και ενυδατικές ιδιότητες της ουρίας σε δέκα φορές μικρότερες συγκεντρώσεις, μάλλον λόγω του ότι είναι πιο καλά διαλυτή στο νερό. Τέλος, εκτός από την επούλωση τραυμάτων-εγκαυμάτων και την περιποίηση του δέρματος, η αλλαντοΐνη είναι

ασφαλούς και αποτελεσματικής, συνδυαστικά με άλλα φάρμακα, έναντι της ψωρίασης, του εκζέματος και της σημγματορροϊκής δερματίτιδας. (“Akema Fine Chemicals,” n.d.)

4.8 ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΛΛΑΝΤΟΪΝΗΣ ΣΤΑ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΑ

Λόγω όλων αυτών των ευεργετικών της ιδιοτήτων, η αλλαντοΐνη χρησιμοποιείται εδώ και πάρα πολλά χρόνια στη κοσμητολογία. Είναι μία μη τοξική, μη ερεθιστική, μη αλλεργιογόνος ουσία και ο Οργανισμός Τροφίμων & Φαρμάκων των ΗΠΑ (U.S. Food and Drug Administration - FDA) την ταξινόμησε στην πρώτη κατηγορία (ασφαλών και αποτελεσματικών) των δραστικών συστατικών για την προστασία του δέρματος, με δοσολογικό εύρος 0,5-2 %. (“21 CFR 347.10 - Skin protectant active ingredients,” n.d.) Μάλιστα, ο FDA έχει εγκρίνει προϊόντα που περιέχουν αλλαντοΐνη, ως μη συνταγογραφούμενα φαρμακευτικά προϊόντα για:

1. την προσωρινή προστασία τραυμάτων, εγκαυμάτων και ηλιακών εγκαυμάτων,
2. την πρόληψη και την προστασία του δέρματος και των χειλιών από τη ξηρότητα λόγω περιβαλλοντικών συνθηκών
3. ανακούφιση της ξηρότητας και την καταπράυνση των κρύων πληγών και των φυσαλίδων πυρετού.(Xu *et al.*, 2011)

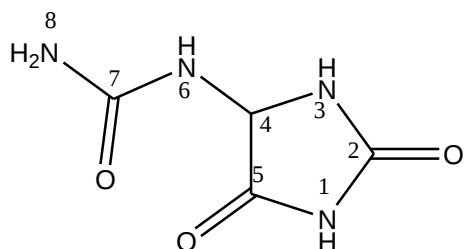
4.9 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΛΛΑΝΤΟΪΝΗΣ

4.9.1 Ποιοτικός προσδιορισμός

i. Πυρηνικός μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

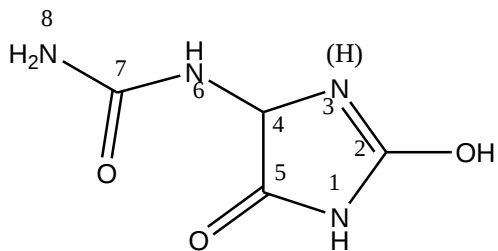
Η φασματοσκοπία NMR είναι μία από τις κύριες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη λήψη φυσικών, χημικών και δομικών πληροφοριών για τα μόρια. Χρησιμοποιείται ευρέως για την ακριβή περιγραφή της χημικής δομής ουσιών και για τον προσδιορισμό της καθαρότητας τους. Ένα φάσμα NMR μας δίνει πληροφορίες για την τοπολογία, τη δυναμική και την τρισδιάστατη δομή των μορίων, ενώ μπορεί να γίνει και ανάλυση δομής πολύπλοκων μορίων, όπως πρωτεϊνών. Οι πιο συχνά μελετούμενοι πυρήνες με το NMR είναι του ^1H , ^{13}C και του ^{14}N .

Η αλλαντοΐνη έχει περιγραφεί με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό πρωτονίου ^1H – NMR και άνθρακα ^{13}C – NMR από αρκετά άρθρα της βιβλιογραφίας. (Coxon et al., 1977; Rashed et al., 2004; Sang et al., 1998; Shubashini et al., 2011; Xu et al., 2011; Yamamoto et al., 1993; Yin et al., 2004) Ωστόσο, η απόδοση των κορυφών σε πρωτόνια δεν είναι ίδια σε όλα τα άρθρα. Πιο συγκεκριμένα, το 1998 απομονώθηκε αλλαντοΐνη από το φυτό *Vaccaria segetalis* και η δομή της περιγράφηκε με φασματοσκοπία NMR όπως παρακάτω.



^1H -NMR (600 MHz, DMSO): δ 5.24 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-4), 5.78 (1H, s, H-8), 6.89 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-6), 8.04 (1H, s, H-3), 10.54 (1H, s, H-1)
 ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO): δ 173.4 (s, C-5), 157.21 (s, C-7), 156.6 (s, C-2), 62.2 (d, C-4). (Sang et al., 1998)

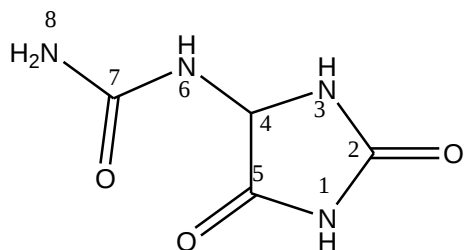
Ακόμη, το 1993 σε μια μελέτη σταθερότητας της αλλαντοΐνης οι Yamamoto *et al.* αναφέρεται ότι η αλλαντοΐνη υπάρχει σε μία ισορροπία μεταξύ της ενολικής και της κετονικής μορφής της και περιγράφουν με φασματοσκοπία NMR την ενολική μορφή, όπως φαίνεται στην παρακάτω δομή.



Η απόδοση του φάσματος της ενολικής μορφής της αλλαντοΐνης σε DMSO δίνεται ως εξής:

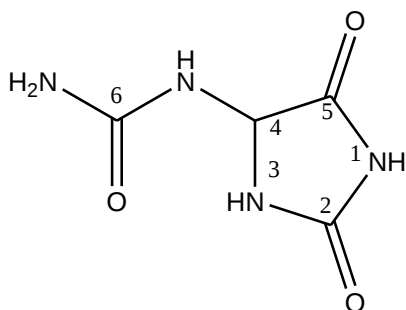
^1H -NMR (DMSO- d_6): δ 5.25 (dd, 1H, H-4), 5.72 (s, 2H, H-8), 6.85 (d, 1H, H-6), 7.98 (s, 1H, H-1), 10.48 (s, 1H, H-2)
 ^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ 173.39 (C-5), 157.29 (C-7), 156.64 (C-2) και 62.38 (C-4) (Yamamoto et al., 1993)

Αντίθετα με τα παραπάνω άρθρο, το 2004 οι Rashed *et al.* απομόνωσαν την αλλαντοΐνη από το φυτό *Portulaca oleracea* και απέδωσαν την δομή με φασματοσκοπία NMR πρωτονίου και άνθρακα με βάση την κετονική μορφή της με τελείως διαφορετικό τρόπο σε σχέση με τους Shang *et al.* 1998.



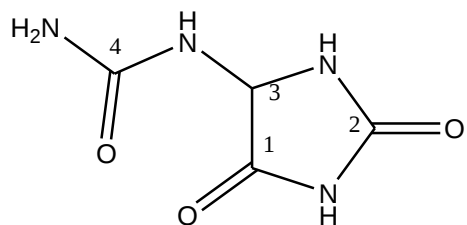
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ 5.3 (d, 1H, H-6), 5.83 (s, 2H, H-8), 6.9 (d, 1H, H-3), 8.1 (s, 1H, H-4), 10.5 (s, 1H, H-1)
 $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 174.0 (C-5), 157.6 (C-7), 157.1 (C-2) και 62.7 (C-4) (Rashed *et al.*, 2004)

Επίσης το 2004, η αλλαντοΐνη απομονώθηκε από το φυτό *Genostemma pentaphyllum*, και η δομή της ταυτοποιήθηκε με βάση τη βιβλιογραφία με φασματοσκοπία NMR με την αρίθμηση που φαίνεται παρακάτω. (Coxon *et al.*, 1977; Yin *et al.*, 2004)



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, in DMSO-d_6): δ 10.54 (1H, br s, NH-3), 8.05 (1H, br s, NH-1), 6.90 (1H, d, -NH-4), 5.79 (2H, br s, NH₂-6), 5.24 (1H, d, H-4)
 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, in DMSO-d_6): δ 173.6 (C-5), 157.2 (C-6), 156.8 (C-2), 62.5 (C-4).

Τέλος, η πιο πρόσφατη μελέτη είναι των Xu *et al.* το 2011, οι οποίοι περιέγραψαν την δομή της αλλαντοΐνης σε Varian Unity 600 NMR (600 MHz για ^1H , 150 MHz για ^{13}C), σε DMSO-d_6 . Στο συγκεκριμένο άρθρο χρησιμοποιείται η παρακάτω αρίθμηση της ένωσης, ενώ οι κορυφές αποδίδονται στα αντίστοιχα πρωτόνια και άνθρακες όπως παρακάτω:



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6): δ 8.06 (1H, s, N₄-H₄), 6.90 (1H, d, N₃-H₃), 5.79 (2H, s, N₁-H_{1α}, 1β), 5.25 (1H, t, N₂-H₂) και 3.35 (1H, s, C₃-H₃)
 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6): δ 173.60 (C-4), 157.35 (C-2), 156.76 (C-1), και 62.41 (C-3).

ii. **Φασματομετρία μάζας**

Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) ονομάζεται η αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Ένας τυπικός φασματογράφος μαζών αποτελείται από: συστήμα εισαγωγής δείγματος, πηγή ιόντων, αναλυτή μαζών, ανιχνευτή, σύστημα κενού και ηλεκτρονικό υπολογιστή για την επεξεργασία των δεδομένων. Η πηγή ιόντων είναι από τα σημαντικότερα κομμάτια του συστήματος και παίζει καθοριστικό ρόλο στο αναλυτικό αποτέλεσμα. Μια ευρέως γνωστή τεχνική ιονισμού είναι η δημιουργία ιόντων με εκρόφηση στην οποία περιλαμβάνεται και η τεχνική βομβαρτισμού με άτομα (FAB). Με τη χρήση αυτής της τεχνικής μετρήθηκε η αλλαντοΐνη από τους Baojun Xu *et al* και προέκυψε ότι : m/z 180.9 [M + Na].(Θεοδωρίδης, n.d.)(Xu *et al.*, 2011)

4.9.2 Ποσοτικός προσδιορισμός

i. **Φασματοφωτομετρία- Αντίδραση Rimini-Schryver**

Η φασματοφωτομετρία χρησιμοποιείται ευρέως και για ουσίες που απορροφούν στο υπεριώδες, αλλά και για ουσίες που δεν έχουν χρωμοφόρες ομάδες στο μόριο τους (αόρατες), αλλά γίνονται ορατές μετά από σχετικές αντιδράσεις. Η αντίδραση Rimini-Schryver είναι μια τέτοια αντίδραση, με την οποία προκύπτουν χρωμοφόρα προϊόντα που δίνουν απορρόφηση σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Είναι από τις πρώτες μεθόδους προσδιορισμού αλλαντοΐνης, η οποία βασίζεται στη φασματοφωτομετρία και εφαρμόστηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλλαντοΐνης στα ούρα και στο αίμα ζώων. Η αντίδραση αυτή στηρίζεται στη συμπύκνωση των παραγώγων της υδραζίνης σε κέτο οξύ για να δώσει έγχρωμο προϊόν ενώ η περιγραφή της για τη μέτρηση αλλαντοΐνης, έγινε πρώτη φορά από τους Young και Conway. Αρχικά γίνεται υδρόλυση της αλλαντοΐνης σε αλλαντοϊκό οξύ σε αλκαλικό διάλυμα υπό θέρμανση στους 100 °C και στην συνέχεια, το αλλαντοϊκό οξύ υδρολύεται σε γλυοξυλικό οξύ και ουρία, σε όξινο περιβάλλον υπό θέρμανση. Έπειτα το γλυοξυλικό οξύ αντιδρά με υδροχλωρική φαινυλϋδραζίνη, δίνει φαινυλϋδραζόνη, η οποία μετατρέπεται σε χρωμοφόρο προϊόν, μετά την οξείδωση με σιδηροκυανιούχο κάλιο. Το προϊόν αυτό δίνει απορρόφηση στα 520nm.(Young and Conway, 1942)

Βασιζόμενοι στην αρχή της μεθόδου αυτής, έχουν αναπτυχθεί αρκετές παραλλαγές, με διαφοροποιήσεις είτε στα αντιδραστήρια είτε στους χρόνους και τις θερμοκρασίες. Μάλιστα, η E. Irene Pentz και η ομάδα της το 1969, τροποποίησαν τη αντίδραση Rimini-Schryver για τον προσδιορισμό της αλλαντοΐνης στα ούρα προσαρμόζοντας μάλιστα αυτόματο αναλυτή. (Pentz, 1969) Αρκετά πρόσφατα, οι Raquel RennóBraga *et al.* 2012, ανέπτυξαν μια μέθοδο προσδιορισμού αλλαντοΐνης σε λιποσώματα και άλλες φαρμακευτικές μορφές, βασισμένη στη φασματοφωτομετρία UV-vis. Η μέθοδος αυτή διαφέρει από τις προηγούμενες καθώς δεν βασίζεται στην μέτρηση

χρωμοφόρων προϊόντων κάποιας αντίδρασης, αλλά στη μέτρηση της απορρόφησης διαλύματος αλλαντοΐνης σε 0.1 mol / L NaOH σε αιθανόλη: νερό (70:30, v / v). Η μέθοδος ελέγχθηκε ως προς την γραμμικότητα, την ακρίβεια, την ευαισθησία και την εκλεκτικότητα και θεωρείται μια γρήγορη και εύκολη μέθοδος προσδιορισμού της αλλαντοΐνης σε διάφορες φαρμακοτεχνικές μορφές. (Braga *et al.*, 2012)

ii. **Τιτλοδότηση**

Ογκομέτρηση ή τιτλοδότηση (titration) είναι η διεργασία του προσδιορισμού μιας ουσίας με μέτρηση της ποσότητας ενός αντιδραστήριου (τιτλοδότης, titrant), η οποία απαιτείται για ποσοτική αντίδραση με την ογκομετρούμενη ουσία (titrand). Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζεται ο όγκος του πρότυπου διαλύματος που είναι χημικά ισοδύναμος με την ουσία που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Η αλλαντοΐνη έχει προσδιοριστεί σε φαρμακευτικά σκευάσματα και κρέμες, με αλκαλική τιτλοδότηση του όξινου ηλεκτρίμιδικού πρωτονίου. Οι D.J.Weber *et al.* 1970, προσδιόρισαν την περιεκτικότητα της αλλαντοΐνης σε κρέμες, αφού πρώτα έκαναν ένα γρήγορο χρωματογραφικό διαχωρισμό, με τη χρήση στήλης celite 545. Η τιτλοδότηση της αλλαντοΐνης έγινε με 0.1 M υδροξείδιο του νατρίου σε εύρος pH 11.5 – 12.0. (Weber and Higgins, 1970) Γενικά, η μέθοδος της τιτλοδότησης έχει μικρό βαθμό εκλεκτικότητας και μικρή ευαισθησία, γι'αυτό και δεν μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί σε πολύπλοκα μίγματα διότι απαιτείται πρώτα καθαρισμός τους. Έτσι, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος προσδιορισμού σε βιολογικά υγρά και σε δείγματα όπου η συγκέντρωση της αλλαντοΐνης είναι πολύ μικρή.

iii. **Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis CE)**

Η Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE) μπορεί να θεωρηθεί ως η ενόργανη προσέγγιση της συμβατικής ηλεκτροφόρησης και είναι μια διαχωριστική τεχνική υψηλής απόδοσης, στην οποία η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται σε στενούς τριχοειδείς σωλήνες, μικρής εσωτερικής διαμέτρου, συνήθως 25 έως 100 μm , οι οποίοι έχουν πληρωθεί με ρυθμιστικό διάλυμα και πραγματοποιούνται διαχωρισμοί τόσο μικρών όσο και μεγάλων μορίων. Ο χωρισμός από την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση μπορεί να ανιχνευθεί από διάφορες συσκευές ανίχνευσης, με πιο συχνά χρησιμοποιούμενο τον ανιχνευτή UV ή UV- Vis. Βασιζόμενοι σε αυτό, οι Caussé E. *et al.* 2007, ανέπτυξαν μια γρήγορη μέθοδο προσδιορισμού τόσο της αλλαντοΐνης, όσο του ουρικού οξέος, της ξανθίνης και της υποξανθίνης στο πλάσμα αίματος. Τα δείγματα πλάσματος αραιώθηκαν 10 φορές και το pH αυξήθηκε στο 9, έτσι ώστε η αλλαντοΐνη να βρίσκεται σε ανιονική μορφή. Τέλος, όλα τα μετρούμενα συστατικά διαχωρίστηκαν σε 12 min, μετρήθηκαν σε μήκος κύματος 195 nm και το εύρος των ανιχνεύσιμων συγκεντρώσεων είναι 0.3-0.6 $\mu\text{mol/L}$. (Caussé *et al.*, 2007)

iv. *Χρωματογραφικοί μέθοδοι προσδιορισμού*

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μία διαχωριστική τεχνική με πολλές εφαρμογές τα τελευταία χρόνια, καθώς θεωρείται η πλέον κατάλληλη για τον προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού χημικών ενώσεων, τόσο οργανικών όσο και ανόργανων. Ο διαχωρισμός των συστατικών που εισάγονται στη στήλη είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Ως κινητή φάση στην HPLC αναφέρεται ο διαλύτης, ο οποίος διέρχεται συνεχώς μέσα από τη στήλη με τη βοήθεια αντλίας υψηλής πίεσης και λειτουργεί ως μεταφορέας του δείγματος, διαχωρίζοντας το στα διάφορα συστατικά του. Όμως, οι χημικές αλληλεπιδράσεις της κινητής φάσης και του δείγματος με τη στατική φάση είναι αυτές που καθορίζουν το βαθμό της μετακίνησης και του διαχωρισμού των συστατικών του δείγματος. Έτσι, η στατική φάση είναι το σπουδαιότερο μέρος μίας τέτοιας χρωματογραφικής διάταξης και ουσιαστικά καθορίζει και το είδος του διαχωρισμού που θα επιτευχθεί.

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιήθηκε από πολύ παλιά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αλλαντοΐνης, αρχικά σε βιολογικά υγρά και αργότερα σε κρέμες. Μια από τις πρώτες μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού της αλλαντοΐνης με HPLC αναπτύχθηκε το 1992. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνταν στήλη αντίστροφης φάσης και αναπτύχθηκε κυρίως για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγώγων πουρινών, όπως και της αλλαντοΐνης, στα ούρα μυρικαστικών. Ωστόσο, παρ'ότι ήταν αρκετά γρήγορη (15 min) και ευαίσθητη, υπήρχε πρόβλημα αλληλεπικάλυψης της αλλαντοΐνης και της κρεατινίνης από άλλες πολικές ουσίες που εκχυλίζονταν μαζί. (Díez *et al.*, 1992; Resines *et al.*, 1992) Έτσι αργότερα, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της μεθόδου ώστε να αποφευχθούν τα προβλήματα αυτά. Αλλάζοντας λοιπόν, το είδος της στήλης, την ταχύτητα ροής, το μήκος κύματος που χρησιμοποιούνταν για την ανίχνευση και τα φίλτρα διήθησης των δειγμάτων, επιτεύχθηκε η μέτρηση της αλλαντοΐνης χωρίς σφάλματα και αλληλεπικαλύψεις. (George *et al.*, 2006) Λίγο αργότερα, αναπτύχθηκε μια μέθοδος για την ποσοτικοποίηση της αλλαντοΐνης με HPLC σε ανθρώπινα ούρα. Σύμφωνα με την διαδικασία αυτή, αρχικά πραγματοποιείται ένας γρήγορος διαχωρισμός της αλλαντοΐνης από το ουρικό και το γλυκοξυλικό οξύ, με εκχύλιση από ιοντοανταλλακτική στερεή φάση και στη συνέχεια, γίνεται μετατροπή της αλλαντοΐνης σε γλυκοξυλικό οξύ. Το προϊόν αυτό παραγωγοποιείται με 2,4-δινιτροφαινυλδραζόνης και μετράται με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης με βαθμιδωτή έκλυση και ανίχνευση στα 360 nm. (Lagendijk *et al.*, 1995)

Επίσης, για την ποσοτικοποίηση της αλλαντοΐνης στα ανθρώπινα ούρα έχει χρησιμοποιηθεί η υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS). Η τεχνική αυτή είναι μια αρκετά σύγχρονη αναλυτική τεχνική που συνδυάζει τη διαχωριστική ικανότητα της υγρής χρωματογραφίας με τη δυνατότητα ανάλυσης των κλασμάτων με φασματομετρία μαζών. Χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοτεχνολογία, στην τεχνολογία τροφίμων και στη φαρμακευτική ανάλυση, ενώ βρίσκει εφαρμογές και στην ανάλυση καλλυντικών σκευασμάτων. Οι Kim *et al.* το

2009, βασιζόμενοι στην τεχνική αυτή ανέπτυξαν μια μέθοδο ποσοτικοποίησης μεταβολιτών ουρικού οξέος, συμπεριλαμβανομένης και της αλλαντοΐνης, στα ανθρώπινα ούρα. Τα δείγματα αρχικά αραιώνονται 10 φορές, διηθούνται και στη συνέχεια γίνεται διαχωρισμός με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με βαθμιδωτή έκλουση. Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των ουσιών πραγματοποιήθηκε με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού στη θετική κατάσταση και η ανάλυση των ουσιών έγινε με επιλεκτική παρακολούθηση αντίδρασης (SRM). (Kim *et al.*, 2009)

Εκτός από τα βιολογικά υγρά, η ποσοτικοποίηση της αλλαντοΐνης είναι απαραίτητη και σε μορφοποιημένα υλικά, καθώς χρησιμοποιείται ευρέως τόσο σε φαρμακευτικά σκευάσματα όσο και σε καλλυντικές κρέμες. Για το λόγο αυτό, έχει αναπτυχθεί μια μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ζεύγους ιόντων (HPLC) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της θειικής χονδροϊτίνης (CSS), της αλλαντοΐνης και της υδροχλωρικής πυριδοξίνης (VB6), σε οφθαλμικές σταγόνες του εμπορίου. Σύμφωνα με τη μέθοδο, πραγματοποιείται διαχωρισμός των ουσιών σε μια στήλη C18 (250 mm x 4,6 mm id, 5 μm) με κινητή φάση μίγμα δισόξινου φωσφορικού αμμώνιου/ακετονιτριλίου και με ρυθμό ροής 0,5 ml min⁻¹, ενώ η ανίχνευση των ουσιών γίνεται με ανιχνευτή UV-vis σε κατάλληλα μήκη κύματος για κάθε ουσία. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι είναι γρήγορη, απλή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άμεσο και ταυτόχρονο προσδιορισμό CSS, αλλαντοΐνης και VB6 απευθείας στο φαρμακευτικό παρασκεύασμα. (Jin *et al.*, 2009)

Όσον αφορά την ποσοτικοποίηση της αλλαντοΐνης στα καλλυντικά σκευάσματα, μια αρκετά πρωτοποριακή μέθοδος περιγράφηκε από τους Doi. *et al.* στην οποία χρησιμοποιείται υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης. Η τεχνική αυτή είναι μια τεχνική χρωματογραφίας, στην οποία χρησιμοποιείται μια υδρόφιλη (πολική ή μικτής λειτουργίας ή διπολικού ιόντος) στατική φάση με μια μη πολική κινητή φάση, η οποία όμως, περιέχει σημαντική ποσότητα νερού. Χαρακτηριστικό μάλιστα της τεχνικής αυτής είναι ότι όσο αυξάνεται το ποσοστό του νερού στην κινητή φάση, μειώνεται η συγκράτηση των πολικών ουσιών στη στατική, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για το προσδιορισμό πολύ πολικών μορίων και κατ'επέκταση στην ανάλυση καλλυντικών σκευασμάτων. (Doi *et al.*, 2009)

Τέλος, από τις πιο πρόσφατες μεθόδους προσδιορισμού αλλαντοΐνης τόσο σε κρέμες αλλά και στη βλέννα σαλιγκαριού, αναπτύχθηκε από τον El Mubarak *et al.* το 2013. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση της αλλαντοΐνης και του γλυκολικού οξέος. Ειδικότερα, το αρχικό δείγμα της βλέννας είτε της κρέμας, αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου υπό θέρμανση στους 60°C, γίνεται ρύθμιση του pH στα 2.9 και στην συνέχεια πραγματοποιείται εκχύλιση με εξάνιο. Έπειτα, πραγματοποιείται διαχωρισμός των ουσιών σε στήλη Synergi-Hydro RP εντός 7 λεπτών χρησιμοποιώντας ισοκρατική έκλουση με φωσφορικό κάλιο (pH 2.7, 10 mM) με ρυθμό ροής 0,7 ml / min στους 30 °C. Τέλος, η μελέτη αυτή έδειξε ότι η βλέννα σαλιγκαριού περιέχει περίπου 48.61 mg/L αλλαντοΐνης και 3750 mg/L γλυκολικού οξέος. (El Mubarak *et al.*, 2013)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΓΛΥΚΟΛΙΚΟ ΟΞΥ

5.1 ΤΑ Α-ΥΔΡΟΞΥ-ΟΞΕΑ

Τα α-υδροξυ-οξέα (AHAs) είναι οργανικά καρβοξυλικά οξέα με ένα υδροξύλιο που συνδέεται με την α-θέση της καρβοξυλικής ομάδας. Η ομάδα του υδροξυλίου στα AHAs είναι ουδέτερη, και μόνο η καρβοξυλική ομάδα παρέχει τις όξινες ιδιότητες του μορίου. Απαντώνται συχνά σε τρόφιμα και κυρίως σε φρούτα όπως σταφύλια, μπανανες, βερίκοκα κ.ά. Μερικά από τα πιο γνωστά AHAs είναι το γλυκολικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, το μηλικό οξύ, το κιτρικό οξύ, το τρυγικό οξύ κ.ά. Γενικά, έχει αποδειχθεί ότι τα AHAs έχουν ευεργετικές επιδράσεις στο δέρμα, γι' αυτό χρησιμοποιούνται είτε σε αισθητικές, είτε σε δερματολογικές παθήσεις, όπως η ξηροδερμία, η πιτυρίδα, οι σκληρύνσεις, η ακμή, η κεράτωση και οι ρυτίδες. Ανάλογα με το μέγεθος τους έχουν διαφορετική διεισδυτική ικανότητα στο δέρμα, έτσι το γλυκολικό οξύ (που περιέχει δυο άνθρακες) έχει πιο καλή δράση από το γαλακτικό (που περιέχει 3 άνθρακες) κ.ο.κ. Στα καλλυντικά χρησιμοποιούνται συνήθως σε προϊόντα καθαρισμού, συντήρησης και βελτίωσης της υφής του δέρματος, έναντι της ξηρότητας και της φωτογήρανσης ή ως απολεπιστικοί παράγοντες. Τέλος, χρησιμοποιούνται και έναντι δερματολογικών παθήσεων, όπως την ακμή, συνδυαστικά με άλλα φάρμακα για να βοηθήσουν στη βελτίωση της θεραπείας. (Green *et al.*, 2009)

5.2 ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΓΛΥΚΟΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Το γλυκολικό οξύ είναι ένα α-υδροξυ-οξύ (AHA) το οποίο απαντάται σε μεγάλο ποσοστό στο ζαχαροκάλαμο και χρησιμοποιείται ευρέως στη φροντίδα του δέρματος. Η ονομασία "γλυκολικό οξύ" δόθηκε το 1848 από το γάλλο χημικό Auguste Laurent (1807-1853). Ο Auguste πρότεινε ότι το αμινοξύ θα μπορούσε να είναι η αμίνη ενός υποθετικού οξέος, το οποίο ονόμασε "γλυκολικό οξύ". (Laurent, Auguste, 1848) Αργότερα, το 1851, η ομάδα του γερμανού χημικού Adolph Strecker και του ρώσου Nikolai Nikolaevich Sokolov συνέθεσαν τελικά το γλυκολικό οξύ και έδωσαν τιμητικά το όνομα του υποθετικού οξέος του Laurent.

Το γλυκολικό οξύ ονομάζεται αλλιώς και υδροξυαιθανικό οξύ ή υδροξυοξικό οξύ και είναι το απλούστερο από τα AHAs. Είναι άχρωμο, άοσμο, υγροσκοπικό κρυσταλλικό στερεό πολύ διαλυτό στο νερό με μοριακή μάζα 76.05 g mol^{-1} . Λόγω της ιδιαίτερης δομής του, έχει ιδιότητες τόσο οξέος όσο και αλκόολης. Συμμετέχει σε αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης, εστεροποίησης, αλογόνωσης, οξειδωσης και αναγωγής. Σε όξινα περιβάλλοντα, το γλυκολικό οξύ μπορεί να υποστεί αυτοεστεροποίηση σχηματίζοντας κυκλικά και γραμμικά πολυμερή, ενώ δημιουργεί και

συμπολυμερή με άλλα υδροξυοξέα (π.χ το PLGA πολυγαλακτογλυκολικό οξύ), τα οποία έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι βιοδιασπώμενα.

Table 4: Χημικές Ιδιότητες γλυκολικού οξέος

ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	
Χημικός τύπος	C ₂ H ₄ O ₃
Μοριακός Βάρος	76.05 g mol ⁻¹
Σημείο τήξης	75 °C
Σημείο βρασμού	Διασπάται
Πυκνότητα	1.270 kg/m ³
Διαλυτότητα	70% στο νερό Διαλυτό επίσης σε μεθανόλη, ακετόνη, οξικό αιθυλεστέρα, οξικό οξύ
Ιξώδες	1.22 mPa·s
pK _a	3.83

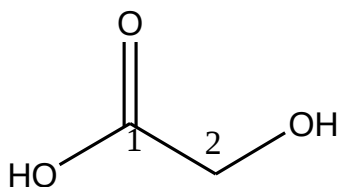


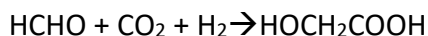
Figure 19: Χημική δομή γλυκολικού οξέος

5.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΛΥΚΟΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

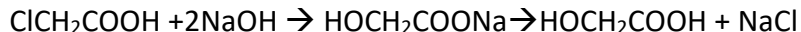
Η παραγωγή γλυκολικού οξέος, όπως και όλων των ΑΗΑs, μπορεί να γίνει είτε με εκχύλιση από φυτικά υλικά είτε μέσω χημικής σύνθεσης. Στα φυτά, το γλυκολικό οξύ παράγεται κατά τη διαδικασία της φωτοαναπνοής στους χλωροπλάστες.(Frederick *et al.*, 1973) Γενικά, απαντάται στα φύλλα, στο βλαστό και τις ρίζες των περισσότερων φυτών, όπως επίσης και στα περισσότερα φρούτα. Ωστόσο, μόνο από μερικά είδη είναι δυνατή η απομόνωση και παραγωγή του σε μεγάλες ποσότητες. Συγκεκριμένα, το γλυκολικό οξύ υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες στο ζαχαροκάλαμο *Saccharum Officinatum* (Blake *et al.*, 1987), στη μπανάνα (Faznurfariza, 2012), στην τομάτα (*Lycopersicum esculentum* Mill.), στα φύλλα του καλαμποκιού (*Zea mays* L.) (Jolivet *et al.*, 1985), ενώ έχει εντοπιστεί ακόμη και σε πολλά φύκη όπως το *Chlorella pyrenoidosa* (Colman *et al.*, 1974; Jolivet *et al.*, 1985).

Η ευρεία χρήση του γλυκολικού οξέος στα καλλυντικά, κατέστησε αναγκαία την παραγωγή του σε βιομηχανική κλίμακα, γι'αυτό τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν μέθοδοι παραγωγής γλυκολικού οξέος από μικροοργανισμούς, με ενζυματικές διαδικασίες. Ειδικότερα, γίνεται παραγωγή γλυκολικού οξέος από μικροοργανισμούς οι οποίοι οξειδώνουν την αιθυλεγκλόλη, όπως το *Pichia naganishii* και τα *Rhodotorula sp.* (Michihiko *et al.*, 2001) Μάλιστα, υπάρχει δημοσιευμένη ευρεσιτεχνία στην οποία περιγράφεται η παραγωγή γλυκολικού οξέος μέσω ενζυματικής υδρόλυσης του υδροξυαιθανονιτριλίου με τη βοήθεια της νιτριλάσης του βακτηρίου *Acidovorax facilis*. (Chauhan *et al.*, n.d.)

Επίσης, μπορεί να γίνει και παραγωγή γλυκολικού οξέος χημικά, με διάφορους τρόπους. Η πιο απλή και φθηνή μέθοδος είναι η καταλυόμενη χημική αντίδραση της μεθανάλης με συνθετικό αέριο (δηλαδή μίγμα μονοξειδίου του άνθρακα, υδρογόνου ή και διοξειδίου του άνθρακα), η οποία ονομάζεται «καρβονυλίωση της φορμαλδεΐδης» (Shattuck, n.d.).



Τέλος, η μέθοδος που χρησιμοποιείται πιο συχνά για την παραγωγή γλυκολικού οξέος, λόγω του ότι έχει πολύ καλή απόδοση, είναι η αντίδραση χλωραιθανικού οξέος με υδροξείδιο του νατρίου, ακολουθούμενη από επανοξύνιση, όπως φαίνεται παρακάτω.



5.4 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ

Τα τελευταία χρόνια, διεξάγονται όλο και περισσότερες μελέτες σχετικά με την επίδραση των ΑΗAs στο δέρμα. Γενικά, το γλυκολικό οξύ όπως και άλλα οξέα της συγκεκριμένης κατηγορίας (το γαλακτικό και το κιτρικό οξύ) βοηθά στην ενυδάτωση του δέρματος, έχει ευεργετικές δράσεις έναντι της φωτογήρανσης, της ακμής και εμφανίζει έντονες απολεπιστικές ιδιότητες. Λόγω του μικρού μεγέθους του έχει τη μεγαλύτερη διεισδυτική ικανότητα στα κύτταρα της επιδερμίδας από όλα τα ΑΗAs. Αρχικά, εισερχόμενο στα επιδερμικά κύτταρα διευκολύνει την απορρόφηση νερού μεταξύ των κυττάρων στα εξωτερικά στρώματα και ταυτόχρονα προκαλεί εξασθένιση της συνοχής του ενδοκυτταρικού υλικού της κεράτινης στιβάδας (SC), με αποτέλεσμα την έντονη ενυδάτωση και την αύξηση της πυκνότητας των στρωμάτων του δέρματος. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, το γλυκολικό οξύ χρησιμοποιείται συχνά στην αντιμετώπιση της ξηρότητας, της ιχθύωσης, της ακμής και γενικά βοηθά στο να διατηρηθεί το δέρμα λείο και απαλό, χωρίς ρυτίδες. (Morganti, 1996; Scott and Yu, 1974) Επίσης, κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η θεραπεία με γλυκολικό οξύ μπορεί να αναστρέψει τη διαδικασία φωτογήρανσης καθώς προκαλεί 25% αύξηση του πάχους του δέρματος, αύξηση της παραγωγής βλεννοπολυσακχαριτών, βελτίωση της ποιότητας των ινών ελαστίνης και αύξηση της

πυκνότητας του κολλαγόνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη εμφάνιση ρυτίδων στο δέρμα, σύσφιξη και ανόρθωση της επιδερμίδας. (Ditre *et al.*, 1996) Με στόχο την κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο το γλυκολικό οξύ δρα στο φωτογηρασμένο δέρμα, έχουν πραγματοποιηθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* μελέτες σε ποντίκια. Συγκεκριμένα, η δράση του γλυκολικού οξέος μελετήθηκε *in vivo* σε άτριχα ποντίκια και *in vitro* σε φυσιολογική καλλιέργεια ινοβλαστών του ανθρώπινου δέρματος και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και στις δύο περιπτώσεις, η θεραπεία με γλυκολικό οξύ αύξησε τον πολλαπλασιασμό κολλαγόνου και ινοβλαστών. Αυτές οι δράσεις αποτελούν τον πιθανό μηχανισμό με τον οποίο το γλυκολικό οξύ μπορεί να αναστρέψει τη φωτογήρανση. (Kim *et al.*, 1998) Ακόμη, το γλυκολικό οξύ είναι γνωστό για τις έντονες απολεπιστικές ιδιότητές του, γι' αυτό εδώ και πολλά χρόνια χρησιμοποιείται στην απολέπιση με χημικά *peeling*. Η απολέπιση με χημικά *peeling* βοηθά στην εξάλειψη σημαδιών γήρανσης, όπως αποχρωματισμούς, ρυτίδες και σκληρότητες και πολλές φορές χρησιμοποιούνται από τους δερματολόγους συμπληρωματικά για την αντιμετώπιση της ακμής. Το γλυκολικό οξύ δρα αποδυναμώνοντας τις δεσμευτικές ιδιότητες των λιπιδίων που συγκρατούν τα νεκρά κύτταρα του δέρματος με αποτέλεσμα τη διάλυση και απομάκρυνση αυτού του στρώματος και την αποκάλυψη του υποκείμενου δέρματος. Η ποσότητα του οξέος που θα χρησιμοποιηθεί, ο χρόνος επαφής του με το δέρμα και η προετοιμασία του δέρματος πριν τη διαδικασία απολέπισης είναι παράγοντες που καθορίζουν αν η απολέπιση θα γίνει στα επιφανειακά ή στα βαθύτερα στρώματα της επιδερμίδας. (VanScott *et al.*, 1996) Αν και τα τελευταία χρόνια ως μέθοδος απολέπισης χρησιμοποιείται και η μικροδερμοαπόξεση, οι δερματολόγοι θεωρούν ότι ο συνδυασμός των δυο μεθόδων δίνει το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα, λόγω των πολυ καλών απολεπιστικών και αντιγηραντικών ιδιοτήτων του γλυκολικού οξέος. (Briden *et al.*, 2007) Τέλος, συχνά χρησιμοποιείται συνδυαστικά με άλλα φάρμακα στη θεραπεία της ακμής, ως βοηθητικός παράγοντας και μάλιστα έχει παρατηρηθεί ότι θεραπεία με γλυκολικό οξύ εμφανίζει μειωμένη ξηρότητα και λιγότερο ερύθημα συγκριτικά με τη θεραπεία χωρίς. (Spellman and Pincus, 1998)

5.5 ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΑ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ

Οι ευεργετικές δράσεις του γλυκολικού οξέος στο δέρμα, έκαναν αναγκαία τη χρήση του σε πάρα πολλά καλλυντικά προϊόντα. Τα τελευταία 15 χρόνια η χρήση τόσο του γλυκολικού όσο και του γαλακτικού οξέος σε καλλυντικά σκευάσματα αυξάνεται συνεχώς. Αξίζει να αναφερθεί ότι το 1998, σύμφωνα με τον FDA, το γλυκολικό οξύ αναφέρθηκε ότι χρησιμοποιείται σε 42 σκευάσματα και το γαλακτικό οξύ σε 342 σκευάσματα, ενώ σύμφωνα με δεδομένα του 2013, το γλυκολικό οξύ χρησιμοποιείται σήμερα σε 337 σκευάσματα και το γαλακτικό οξύ σε 1042. (Chairman *et al.*, 2013) Στην προώθηση της χρήσης του γλυκολικού στα καλλυντικά σκευάσματα έπαιξαν καθοριστικό ρόλο ο δερματολόγος Van Scott και ο φαρμακολόγος YuR. J., οι οποίοι δημοσίευσαν το πρώτο κλινικό έγγραφο για τον έλεγχο της κερατινοποίησης με τη χρήση AHAs. (Yu and Van Scott, 1995) Από τότε λοιπόν, το γλυκολικό οξύ χρησιμοποιείται σε πληθώρα προϊόντων περιποίησης του δέρματος όπως κρέμες ή λοσιόν σώματος, αντιρυτιδικές κρέμες, χημικά απολεπιστικά, κρέμες ανάπλασης, γέλες αλλά επίσης χρησιμοποιείται και σε προϊόντα περιποίησης για τα μαλλιά και τα νύχια.

Η ασφάλεια χρήσης του γλυκολικού οξέος, είχε αμφισβητηθεί στις αρχές της δεκαετίας του 90, εξαιτίας κάποιων αναφορών από καταναλωτές για ερεθισμούς από την χρήση καλλυντικών που περιείχαν AHAs. Έτσι, ο FDA προέβη σε ξεχωριστή εξέταση ασφαλείας για το γλυκολικό οξύ και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το γλυκολικό και γαλακτικό οξύ, είναι ασφαλή για χρήση σε καλλυντικά προϊόντα, σε συγκεντρώσεις $\leq 10\%$, και σε τελικές τιμές pH ≥ 3.5 , όταν χρησιμοποιούνται για να αποφευχθεί η αυξανόμενη ευαισθησία στον ήλιο ή σε καθημερινή χρήση για την ηλιακή προστασία. Επίσης τα συστατικά αυτά, όταν χρησιμοποιούνται σε ειδικά ινστιτούτα είναι ασφαλή σε συγκεντρώσεις $\leq 30\%$, και σε τελικές τιμές pH ≥ 3.0 . (Nutrition, n.d.)

5.6 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΓΛΥΚΟΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

5.6.1 Ποιοτικός προσδιορισμός

Το γλυκολικό οξύ έχει προσδιοριστεί ποιοτικά με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Συγκεκριμένα, το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε δευτεριωμένο νερό (D_2O) δίνει μια μονή κορυφή σε δ 3.94, που αντιστοιχεί στα δυο πρωτόνια του C-2, ενώ το φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ επίσης σε D_2O εμφανίζει δύο κορυφές σε δ 177.04 και 60.16. (“Human Metabolome Database: $^1\text{H-NMR}$ Spectrum (HMDB0000115),” n.d.) Επίσης, μπορεί να ανιχνευθεί μέσω της αντίδρασης Eegriwe με άμεση δοκιμή με 2,7-διυδροξυναφθαλένιο (2,7-dihydroxynaphthalene) σε πυκνό θειϊκό οξύ και θέρμανση, όπου δίνει έντονο κόκκινο χρώμα. (Takahashi, 1972)

5.6.2 Ποσοτικός προσδιορισμός

i. Φασματοφωτομετρικά

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το γλυκολικό οξύ με την αντίδραση Eegriwe δίνει έντονο κόκκινο χρώμα, το οποίο με μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο UV-vis δίνει μέγιστη απορρόφηση στα 540 nm και μπορεί με αυτόν τον τρόπο να προσδιοριστεί ποσοτικά. (Takahashi, 1972) Η μέθοδος αυτή παρ’ότι χρησιμοποιούνταν ευρέως, αποδείχθηκε ότι ουσίες όπως το EDTA, η φορμαλδεΰδη, το ασκορβικό και το γαλακτικό οξύ, αλληλεπικαλύπτουν την απορρόφηση του γλυκολικού οξέος και έτσι προκύπτουν λαθεμένα αποτελέσματα. Μία ακόμη μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του γλυκολικού οξέος με φασματοφωτομετρία, χρησιμοποιεί την οξειδάση του γλυκολικού (glycolate oxidase) για να καταλύσει τη μετατροπή του γλυκολικού οξέος σε γλυοξυλικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με φαινυλϋδραζίνη (phenylhydrazine) για να σχηματίσει ένα έγχρωμο παράγωγο με μέγιστη απορρόφηση στα 324 nm. Ωστόσο, αργότερα διαπιστώθηκε ότι το ίδιο ένζυμο οξειδώνει και το γαλακτικό οξύ, έτσι ο προσδιορισμός και των δύο δεν είναι δυνατός. (Jolivet et al., 1985)

ii. Χρωματογραφικοί μέθοδοι προσδιορισμού

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι ποσοτικοποίησης του γλυκολικού οξέος με χρωματογραφικές τεχνικές, όπως αέρια χρωματογραφία (GC) ή υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Οι τεχνικές αυτές εφαρμόζονται για την ποσοτικοποίηση της ουσίας σε φυτικά υλικά, στη βλέννα του σαλιγκαριού, σε βιολογικά υγρά και σε καλλυντικά σκευάσματα.

Όσον αφορά τα φυτά, οι Blake *et. al* ανέπτυξαν μια μέθοδο προσδιορισμού του γλυκολικού οξέος στο χυμό του ζαχαροκάλαμου, με HPLC. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του γλυκολικού, γαλακτικού, μηλικού, τρυγικού, κιτρικού, πυροσταφυλικού οξέος

άλλα και άλλων συχνά εμφανιζόμενων AHAs. Αρχικά, τα οξέα διέρχονται από μια κατιοντανταλλακτική στήλη (cation-exchange), έπειτα γίνεται απομόνωση σε μια ανιοντανταλλακτική στήλη (anion-exchange), στη συνέχεια τα οξέα εκκλύονται με αραιωμένο θειικό οξύ και το έκλουσμα διαχωρίστηκε με HPLC, με κατιοντανταλλακτικές στήλες συνδεδεμένες σε σειρά στους 35 °C και 85 °C αντίστοιχα. Η ποσοτικοποίηση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με παρακολούθηση του δείκτη διάθλασης. (Blake *et al.*, 1987)

Με σκοπό να μελετηθούν οι διακυμάνσεις διάφορων μεταβολιτών σε βιολογικά υγρά και να συσχετιστούν με την ύπαρξη κάποιας ασθένειας, έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι ποσοτικοποίησης του γλυκολικού οξέος στα ούρα και στο αίμα ανθρώπων. Συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός του γλυκολικού οξέος στα ούρα μπορεί να γίνει με τη χρήση ιοντανταλλακτικής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή αγωγιμότητας και εξωτερικά πρότυπα. (Wandzilak *et al.*, 1991) Μάλιστα, η μέθοδος αυτή έχει μεγάλο βαθμό ευαισθησίας εξειδίκευσης και εκλεκτικότητας. Επίσης, έχει αναπτυχθεί μέθοδος για ανάλυση του πλάσματος αίματος με HPLC, σύμφωνα με την οποία τα α-κετοξέα των δειγμάτων αρχικά αντιδρούν με φαινυλδραζίνη και ταυτόχρονα γίνεται ενζυματική οξειδωση του γλυκολικού οξέος σε γλυοξυλικό. Στη συνέχεια, η σχηματιζόμενη φαινυλδραζόνη διαχωρίζεται με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και ανιχνεύεται με απορρόφηση UV. (Petrarulo *et al.*, 1991)

Οι πιο πρόσφατες χρωματογραφικές μέθοδοι για την ανάλυση μικρών καρβοξυλικών οξέων σε βιολογικά υγρά, συμπεριλαμβανομένου και του γλυκολικού οξέος, βασίζονται στην αέρια χρωματογραφία με τη διαδικασία της παραγωγοποίησης. Μάλιστα, οι τεχνικές που βασίζονται στο GC-MS θεωρούνται από τις πιο αξιόπιστες για εργαστηρική διάγνωση δηλητηρίασης από αιθυλενογλυκόλη, της οποίας κύριος τοξικός μεταβολίτης είναι το γλυκολικό οξύ. Για πρώτη φορά, το 1996, αναπτύχθηκε μια μέθοδος ανάλυσης ανθρώπινων ούρων με GC-MS, σύμφωνα με την οποία αρχικά πραγματοποιείται κατακρήμνιση πρωτεϊνών με ακετονιτρίλιο και έπειτα το υπερκείμενο παραγωγοποιείται με ειδικό αντιδραστήριο. Το προϊόν της αντίδρασης αναλύεται με GC-MS και το γλυκολικό οξύ ποσοτικοποιείται. (Yao and Porter, 1996) Πιο πρόσφατα, το 2015, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε για κλινικούς τοξικολογικούς σκοπούς μια μέθοδος ανάλυσης αθινελογλυκόλης, της 1,2-προπυλενογλυκόλης και του γλυκολικού οξέος. Σε αντίθεση με την παλιότερη τεχνική, η νέα χρησιμοποιεί μια σχετικά λιγότερο χρησιμοποιούμενη κατηγορία παραγοντοποιητικών παραγόντων - χλωρομυρμηκικούς αλκυλεστέρες, επιτρέποντας την αποτελεσματική και ταχεία παραγωγοποίηση καρβοξυλικών οξέων μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα. Έτσι, τα δείγματα είναι έτοιμα προς ανάλυση εντός 10 λεπτών και η ανάλυση γίνεται με αεριοχρωματογραφία με ανίχνευση ιονισμού με φλόγα (GC-FID). Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει αναπτυχθεί τόσο για την ανάλυση ούρων όσο και για ανάλυση πλάσματος, είναι γρήγορη απλή και χαμηλού κόστους και γι' αυτό χρησιμοποιείται ευρέως στην εργαστηριακή διάγνωση. (Hložek *et al.*, 2014)

Αν και το γλυκολικό οξύ χρησιμοποιείται ευρέως στη κοσμητολογία, είναι λίγες οι αναλυτικές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί όσον αφορά τα καλλυντικά σκευάσματα. Το 1998, αναπτύχθηκε μια διαδικασία ποσοτικοποίησης του γλυκολικού οξέος σε κρέμες με υγρή χρωματογραφία υψηλής

απόδοσης αντίστροφης φάσης, χρησιμοποιώντας μια μέθοδο αντιστοίχισης ιόντων. Κατά την διαδικασία αυτή, τα δείγματα πρώτα διαλύονται σε μίγμα τετραϋδροφουράνιο-νερό 90:10, επείτα καθαρίζονται με ιοντοανταλλακτική SPE (Solid-PhaseExtraction) και τελικά αναλύονται απευθείας σε στήλη Ultrasphere ODS με κινητή φάση μεθανόλη- φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (2:98, v / v), που περιέχει ιωδιούχο τετραβουτυλαμμώνιο και ανίχνευση UV στα 210 nm. Ενώ η συγκεκριμένη μέθοδος αρχικά χαρακτηρίστηκε ως πολύ εκλεκτική, γρήγορη και απλή, αργότερα θεωρήθηκε ότι είναι αρκετά ασταθής, λόγω της έντονης καυστικότητας απο τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνταν και με μεγάλο κόστος. (Scalia et al., 1998) Σε μία παραλλαγή της προηγούμενης μεθοδολογίας, το γλυκολικό οξύ εκχυλίζεται από τα καλλυντικά σκευάσματα χρησιμοποιώντας τετραϋδροφουράνιο (THF), καθαρίζεται με ιοντοανταλλακτική SPE και μετράται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (HPLC) με ανίχνευση UV – VIS. (Couch and Howard, 2002) Τέλος, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο της αλλαντοΐνης, έχει αναπτυχθεί μέθοδος ποσοτικοποίησης του γλυκολικού οξέος ταυτόχρονα με την αλλαντοΐνη τόσο σε κρέμες όσο και στη βλέννα του σαλιγκαριού. (El Mubarak et al., 2013)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ & ΔΙΑΛΥΤΕΣ

Τα προς ανάλυση δείγματα βλέννας τα προμηθευτήκαμε από τον κύριο Γιάννη Καρέλλα από την εταιρεία Benefit Farm A.E, τα οποία συλλέγονται με εργαστηριακή τεχνική από σαλιγκάρια του είδους *Helix aspersa*. Από τις ποσότητες που παραλάβαμε ένα τμήμα λυοφιλοποιήθηκε και το υπόλοιπο διατηρήθηκε στην κατάψυξη αυτούσιο. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία είναι τα παρακάτω:

- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN) HPLC grade, μεθανόλη (CH_3OH) HPLC grade και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) ACS- for analysis-reag. της εταιρείας Carlo erba reagents
- Δευτεριωμένοι διαλύτες της εταιρείας Euriso-top, όπως νερό (D_2O), μεθανόλη (MeOD), διμεθυλοσουλφοξείδιο(DMSO)
- Πρότυπη τριμεθυλογλυκίνη της εταιρείας Alfa Aesar
- Πρότυπα συρινγγαλδεΰδης της Fluorochem (Cas No: 394-31-0), γλυκολικού οξέος της εταιρείας Sigma-Aldrich και αλλαντοίνης.
- Αντιδραστήριο σιλυλίωσης για την αέρια χρωματογραφία (GC)-MS, N,O-τριμεθυλοσιλυλοτριφθοροακεταμίδιο (BSTFA) μαζί με τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (TMCS, 10 ml/L) (BSTFA/TMCS 99:1) της εταιρείας Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (CAS 25561-30-2)

6.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Στην παράγραφο αυτή, θα γίνει μια συνοπτική περιγραφή των οργάνων και των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας πειραματικής διαδικασίας, για σκοπούς ποιοτικού ελέγχου, χρωματογραφικού διαχωρισμού και απόδοσης δομής των φυσικών προϊόντων που απομονώθηκαν.

6.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (*Thin Layer Chromatography, T.L.C*)

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό έλεγχο, τον καθαρισμό και την απομόνωση ουσιών. Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου με επίστρωση πυριτίου (silica gel 60 RP-18 F₂₅₄ - Merk). Οι κηλίδες παρατηρούνταν αρχικά στο υπεριώδες φως (254 και 356 nm) και όπου κρίθηκε απαραίτητο έγινε ψεκασμός υπό θέρμανση με μεθανολικό διάλυμα θειικής της εταιρείας Acros Organics.

6.2.2 Υγρή χρωματογραφία στήλης χαμηλής πίεσης

Οι διαδικασίες χρωματογραφικού καθαρισμού και απομόνωσης πραγματοποιήθηκαν με τη συγκεκριμένη τεχνική. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε POLYGOPREP 60-130 C₁₈ και ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μίγμα νερού/μεθανόλης.

6.2.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Συντονισμού NMR

Η αποτίμηση των δομών των συστατικών που απομονώθηκαν και η ανάπτυξη των καμπύλων αναφοράς πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού συντονισμού NMR Bruker DRX400 (400MHz) για τα φάσματα μίας διάστασης και NMR Bruker DRX200 (200MHz) για τα φάσματα δυο διαστάσεων. Για τους σκοπούς αυτούς, έγινε λήψη φασμάτων μιας διάστασης πρωτονίου ¹H- NMR, δύο διαστάσεων HSQC-DEPT (heteronuclear single quantum coherence) και HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

6.2.4 Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (GC-MS)

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι Hewlett – Packard 6890-5973, με στήλη HP-5 MS (DB-5) 30m * 0.25mm και πάχος μεμβράνης 0.25 μm συζευγμένο με φασματογράφο μάζας.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία έχει διάρκεια συνολικά 20 min, με ροή 2.0 ml/min και θερμοκρασία εκκίνησης 73 °C στους οποίους παραμένει για 6.5 min. Η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 280 °C με ρυθμό 25 °C/min και για τον πλήρη καθαρισμό της στήλης από τα σιλυλιωμένα παράγωγα η στήλη πρέπει να θερμανθεί στο 300 °C για 5 min.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΥΛΙΚΟΥ

7.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΛΥΟΦΙΛΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΒΛΕΝΝΑΣ

7.1.1 Δοκιμαστικές χρωματογραφίες λεπτής στιβάδας (TLC)

Μικρές ποσότητες της λυοφιλοποιημένης βλέννας δοκιμάστηκε να διαλυθούν σε μεθανόλη και νερό. Παρατηρήθηκε ότι το υλικό μας σε κανέναν από τους δυο διαλύτες δεν διαλυόταν πλήρως, πιθανώς λόγω της μετουσίωσης των πρωτεϊνών που περιέχονται στην βλέννα κατά την διάρκεια της λυοφιλοποίησης. Ωστόσο, το υπερκείμενο διαλυτό τμήμα ελέγχτηκε χρωματογραφία με TLC κανονικής και αντίστροφης φάσης, όπως φαίνεται παρακάτω.

- ✓ Μεθανολικό εκχύλισμα σε πλάκα κανονικής φάσης- σύστημα 90-10 / CH_2Cl_2 -MeOH (δεν παρατηρήθηκαν ζώνες)
- ✓ Υδατικό διάλυμα σε πλάκα αντίστροφης φάσης - σύστημα 50-50 / H_2O -MeOH
- ✓ Μεθανολικό εκχύλισμα σε πλάκα αντίστροφης φάσης - σύστημα 50-50 / H_2O -MeOH

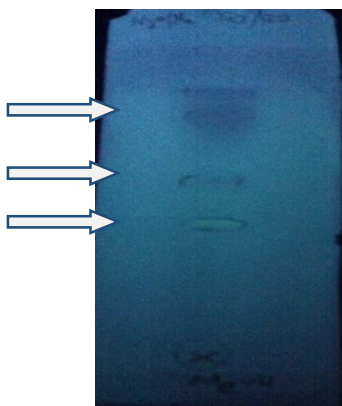


Figure 11: Χρωματογραφία TLC σε μεθανολικό εκχύλισμα

7.1.2 Φασματοσκοπικός έλεγχος με φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού NMR

Το μεθανολικό εκχύλισμα φάνηκε να είναι πιο πλούσιο από τα υπόλοιπα και έτσι αποφασίσαμε να προχωρήσουμε στον έλεγχο του με φασματοσκοπία NMR. Ζυγίστηκαν λοιπόν 1,5 gr λυοφιλοποιημένης βλέννας, διαλύθηκαν σε δευτεριωμένη μεθανόλη MeOD και πάρθηκε το παρακάτω φάσμα.

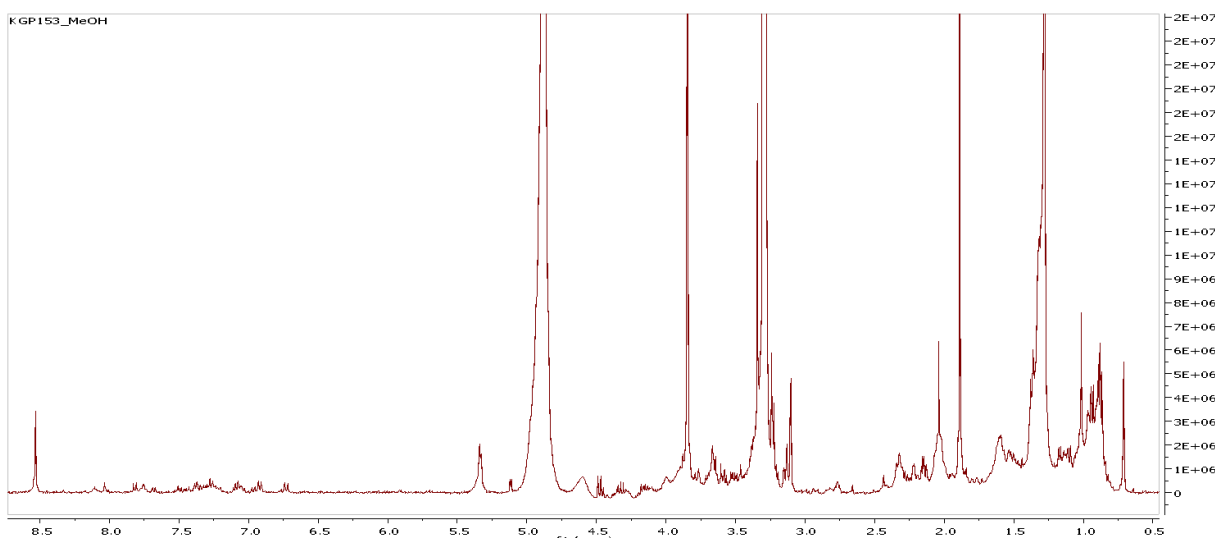


Figure 12: Φάσμα ¹H-NMR μεθανολικού εκχυλίσματος βλέννας σε MeOD

Παρατηρήσαμε αρκετές μεγάλες κορυφές σε δ από 0 – 5 ppm και κάποιες μικρότερες κορυφές στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων σε δ 6.5 – 8.5 ppm

7.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΥΓΡΗΣ ΒΛΕΝΝΑΣ ΣΑΛΙΓΚΑΡΙΩΝ

7.2.1 Δοκιμασία εξάτμισης αυτούσιας βλέννας και φασματοσκοπικός έλεγχος

Ζυγίστηκαν 30 gr υγρής βλέννας, εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού και στην συνέχεια προσθέσαμε 20 ml μεθανόλης τα οποία εξατμίστηκαν και πήραμε φάσμα σε δευτεριωμένη μεθανόλη (MeOD). Το γενικό προφίλ λοιπόν είναι αυτό που φαίνεται παρακάτω

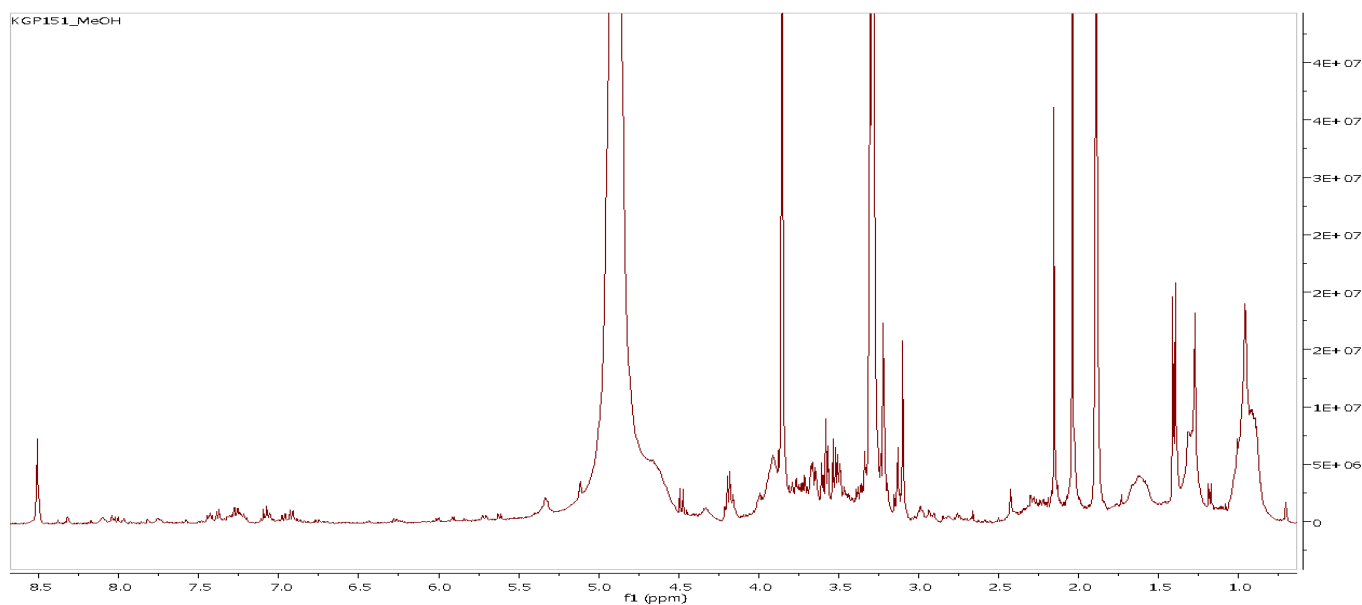
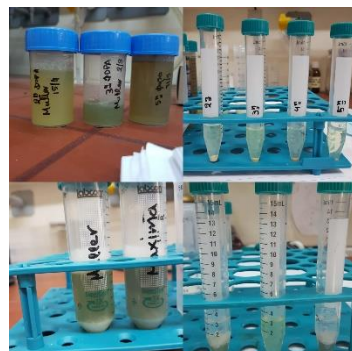


Figure 13: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ μεθανολικού εκχυλίσματος εξατμισμένης βλέννας σε MeOD

Η εικόνα του φάσματος είναι παρόμοια με αυτή της λυοφιλοποιημένης βλέννας.

7.3 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΥΛΙΚΟΥ

Με σκοπό να βρεθεί μια μέθοδος με την οποία θα μπορούμε να επεξεργαστούμε το υλικό μας χωρίς να το υποβάλλουμε σε έντονες συνθήκες θερμοκρασίας για μεγάλο χρόνο – όπως συμβαίνει κατά την διαδικασία της εξατμίσης- που μπορεί να αλλοιώσει τη σύσταση του υλικού μας, καταλήξαμε στην μέθοδο κατακρήμνισης πρωτεϊνών. Κατά την διαδικασία αυτή, ογκομετρήθηκαν 15 ml υγρής βλέννας στα οποία προστέθηκαν 30 ml ακετονιτριλίου σε falcon των 50 ml. Στην συνέχεια, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε και συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό, το οποίο τελικά εξατμίστηκε. Στη συνέχεια πάρθηκε φάσμα NMR για να γίνει σύγκριση της εξατμισμένης και της κατεργασμένης με ακετονιτρίλιο βλέννας.



A. Εξατμισμένη βλέννα

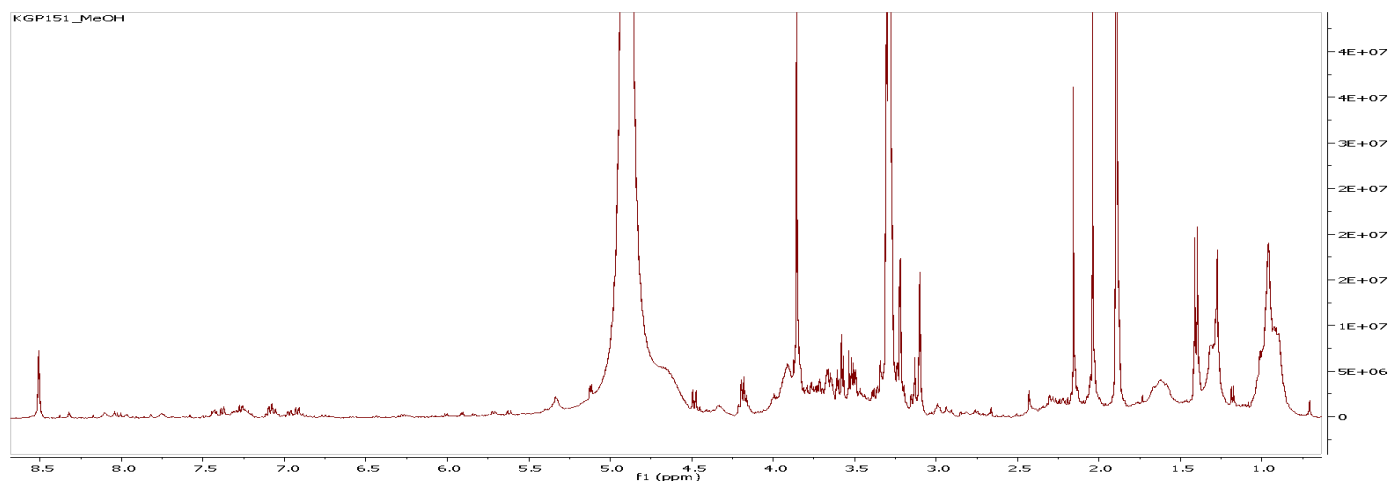


Figure 14: Φάσμα ^1H -NMR εξατμισμένης βλέννας

Β. Κατεργασμένη με ακετονιτρίλιο βλέννα

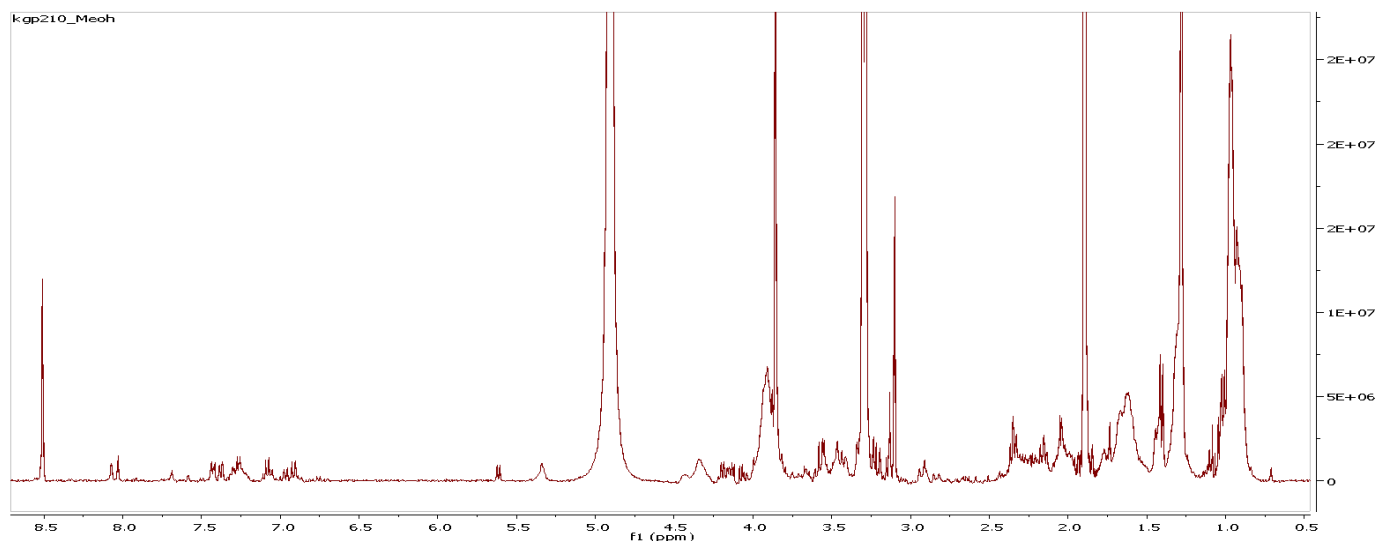


Figure 15: Φάσμα ^1H -NMR επεξεργασμένης με ακετονιτρίλιο βλέννας

Φάνηκε ότι στο επεξεργασμένο με ακετονιτρίλιο υλικό οι κορυφές του φάσματος είναι πιο καλά διακριτές, πιθανώς λόγω του ότι δεν έχουμε καθόλου υγρασία στο δείγμα, ενώ ποιοτικά δεν φαίνεται να υπάρχουν αλλαγές σε σύγκριση με το δείγμα που υποβάλλεται σε εξάτμιση. Έτσι, η μέθοδος αυτή θεωρήθηκε καταλληλότερη για την επεξεργασία του υλικού μας, καθώς είναι μία γρήγορη, απλή και χωρίς ακραίες συνθήκες μέθοδος που μας δίνει μια ικανοποιητική πρώτη εικόνα για το δείγμα μας.

7.3.1 Σύγκριση χημικού προφίλ *Helix aspersa muller* και *Helix aspersa maxima*

Αφού καταλήξαμε στην μέθοδο με την οποία θα κατεργαζόμαστε τα δείγματα πριν την ανάλυση τους, προχωρήσαμε στον φασματοσκοπικό έλεγχο δειγμάτων από δυο διαφορετικά είδη σαλιγκαριών, του *Helix aspersa muller* και *Helix aspersa maxima*. Σκοπός μας ήταν να παρατηρήσουμε τα χημικά προφίλ των δύο ειδών και να προσδιορίσουμε τις διαφορές τους.

Ζυγίστηκαν 30 γρ βλέννας του κάθε είδους και πραγματοποιήθηκε επεξεργασία με ακετονιτρίλιο, ώστε να γίνει κατακρίμνηση των πρωτεϊνών. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν, εξατμίστηκαν και πάρθηκαν φάσματα σε MeOD, τα οποία φαίνονται παρακάτω.

Helix aspersa muller

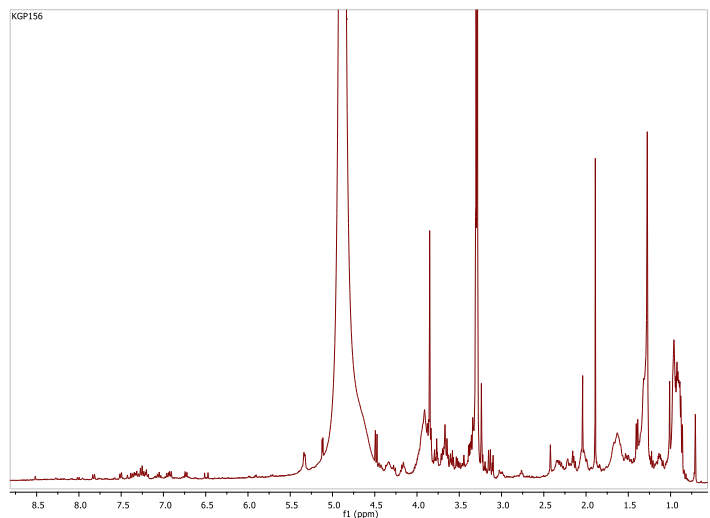


Figure 17: Φάσμα ¹H-NMR θλέννας *Helix aspersa muller*

Helix aspersa maxima

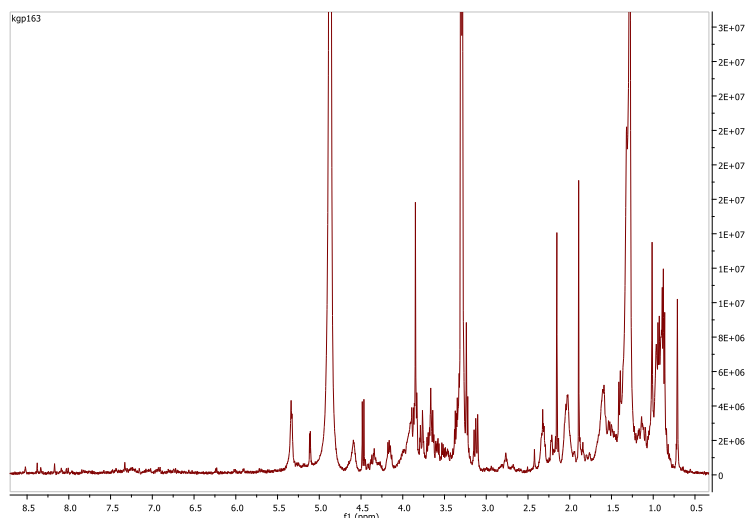


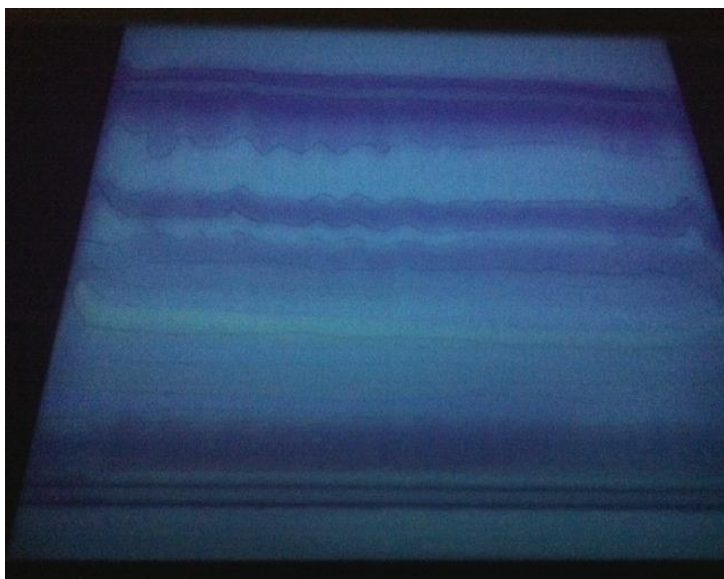
Figure 16: Φάσμα ¹H-NMR θλέννας *Helix aspersa maxima*

Από την εικόνα των φασμάτων φαίνεται ότι τα δύο είδη είναι αρκετά παρόμοια με την διαφορά ότι στο είδος *Helix aspersa muller* εμφανίζονται περισσότερες κορυφές στη αρωματική περιοχή του φάσματος από δ 6.5 – 8.5.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ

8.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ

Ζυγίστηκαν 28,4 mg μεθανολικού εκχυλίσματος βλέννας *Helix aspersa muller* και διαλύθηκαν σε 1 ml μεθανόλης. Το υλικό τοποθετήθηκε σε πλάκα αντίστροφης φάσης και αναπτύχθηκε σε σύστημα 50-50/ H₂O-MeOH.



Εμφανίστηκαν 8 ζώνες οι οποίες ξύστηκαν και εκχυλίστηκαν με 20 ml MeOH η κάθε μία. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό και εξάτμιση σε συσκευή Rotavapor R-114 Buchi. Τέλος, πάρθηκαν φάσματα NMR σε δευτεριωμένη μεθανόλη MeOD για όλες τις ζώνες και από την ζώνη 7 απομονώθηκε καθαρή η τριμεθυλογλυκίνη (TMG).

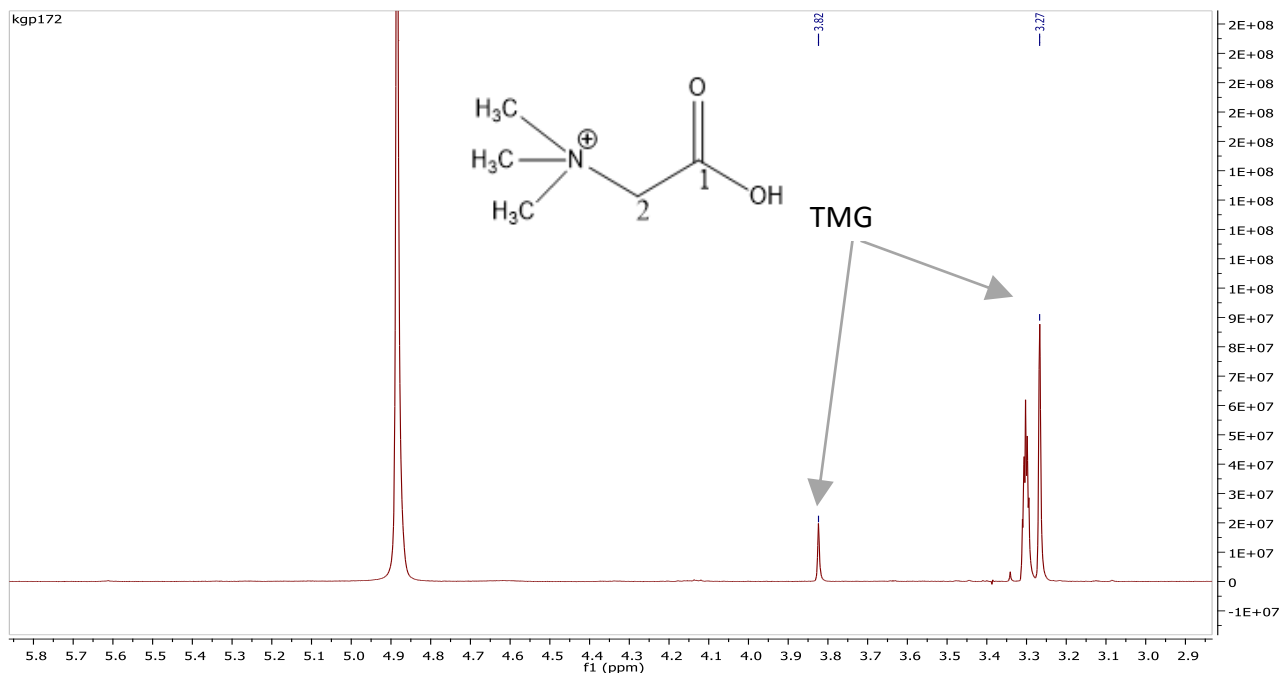


Figure 18: Φάσμα ^1H -NMR τριμεθυλογλυκίνης σε MeOD

Απόδοση Φάσματος

Το H-2 αντιστοιχεί στη μονή κορυφή σε δ 3.8 ενώ τα εννιά πρωτόνια των μεθυλίων το αζώτου είναι χημικά ισοδύναμα και δίνουν σήμα σε δ 3.27 με μία μονή κορυφή με ολοκλήρωση για 9H.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ	ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗ
H-2	3.82	s	2H
N-CH ₃	3.27	s	9H

8.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ R-18

Ογκομετρήθηκαν 15 ml βλέννας σαλιγκαριού *Helix aspersa*, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία με ακετονιτρίλιο όπως έχει αναφερθεί παραπάνω και προέκυψαν 64.4 mg ξηρού εκχυλίσματος. Στη συνέχεια το δείγμα υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό διαχωρισμό στήλης με στατική φάση γέλης πυριτίου R-18 και κινητή φάση νερό / μεθανόλη (H₂O/MeOH) από την οποία πήραμε 9 κλάσματα των 3 ml. Τα κλάσματα ελέγχθηκαν με TLC αντίστροφης φάσης σε σύστημα H₂O/MeOH 50/50 και τα κλάσματα 1, 2 και 3 που φάνηκαν πιο πλούσια ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία NMR σε δευτεριωμένο διαλύτη D₂O.

Table 5: Κλάσματα στήλης

Σύστημα διαλυτών	Κλάσματα	Ουσίες που απομονώθηκαν
H ₂ O 100%	1(kgp 225)	Λευκίνη
	2(kgp 226)	Ισολευκίνη
	3(kgp 228)	Ουρακίλη
H ₂ O - MeOH 50-50	4	
	5	
	6	
MeOH 100%	7	
	8	
	9	

Τα φάσμα συγκρίθηκαν με φάσματα της βιβλιογραφίας και ταυτοποιήθηκαν οι ουσίες: λευκίνη, ισολευκίνη και ουρακίλη

ι. Λευκίνη ή 2-αμινο-4-μεθυλοπεντανικό οξύ

Η λευκίνη είναι ένα α-αμινοξύ το οποίο ανήκει στα απαραίτητα αμινοξέα, δηλαδή στα αμινοξέα που δεν μπορεί να βιοσυνθέσει ο ανθρώπινος οργανισμός, αλλά τα λαμβάνει έτοιμα από τη διατροφή του. Ταξινομείται στα «υδρόφοβα» αμινοξέα, καθώς ένα μεγάλο της κομμάτι είναι ένα αλκύλιο και αποτελεί σημαντικό συστατικό υπομονάδων της φερριτίνης, της αστακίνης και άλλων αμυντικών και μεταφορικών πρωτεϊνών. Υπάρχει σε πολλά τρόφιμα όπως, στα φυστίκια, ρεβύθια, φασόλια, φακές, βρώμη κ.ά, ενώ στην παρούσα μελέτη απομονώθηκε και από τη βλέννα σαλιγκαριού. Η ουσία απομονώθηκε από το πρώτο κλάσμα της στήλης και η δομή της ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR. Παρακάτω φαίνεται το φάσμα της λευκίνης σε δευτεριωμένο νερό (D₂O).

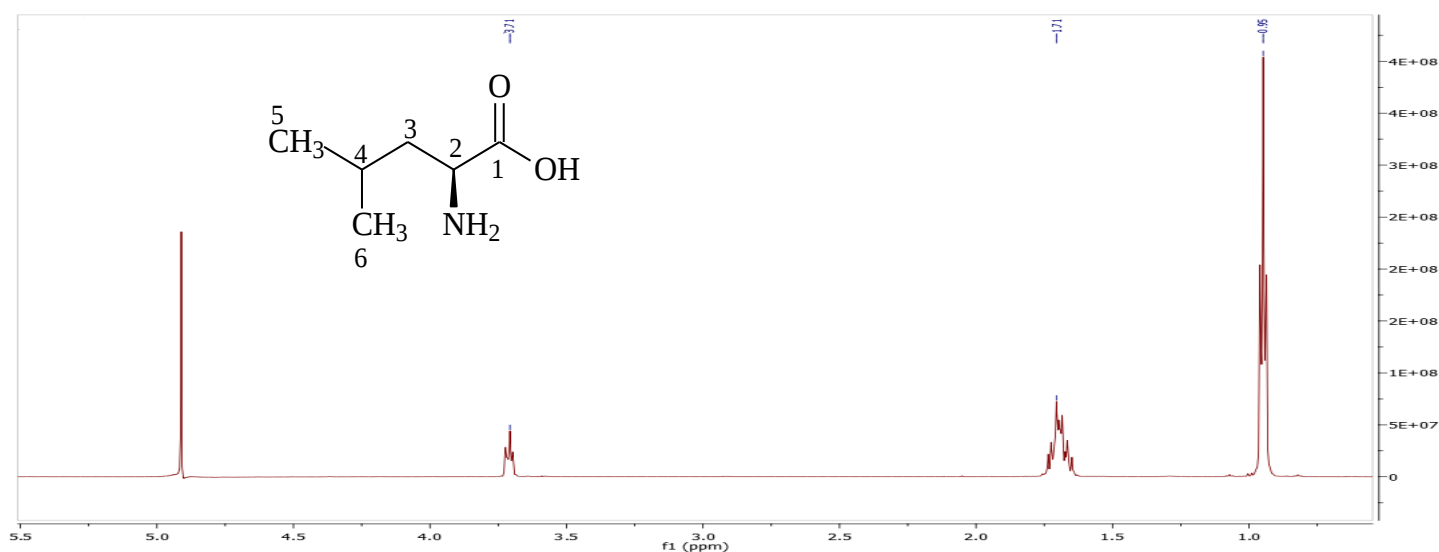


Figure 19: Φάσμα 1H-NMR λευκίνης σε D₂O

Σχολιασμός

Το πρωτόνιο της θέσης 2 εμφανίζεται στο παραπάνω φάσμα ως τριπλή κορυφή καθώς συζεύγνυται με τα γειτονικά πρωτόνια H-3. Η τριπλή αυτή κορυφή είναι αρκετά αποθωρακισμένη με συντονισμό δ 3.71, λόγω της παρουσίας του καρβονυλίου και του αζώτου διπλα από το συγκεκριμένο πρωτόνιο. Τα πρωτόνια H-3a και H-3b δεν είναι χημικά ισοδύναμα καθώς επηρεάζονται από την σχετική τους θέση με το άζωτο της αμινομάδας και έτσι δίνουν μια πολλαπλή κορυφή σε δ 1.71, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή σε ίδια μετατόπιση δ, η οποία αντιστοιχεί στο H-4. Το πρωτόνιο H-4 έχει σύζευξη με τα πρωτόνια των δυο γειτονικών μεθυλίων και με τα δυο πρωτόνια του άνθρακα της θέσης 3, γι'αυτό και εμφανίζεται ως μια πολλαπλή κορυφή. Επίσης, τα πρωτόνια των δύο μεθυλίων δίνουν δυο διπλές κορυφές σε δ 0.95, λόγω της σύζευξης τους με το πρωτόνιο της θέσης 4, οι οποίες επειδή αλληλοεπικαλύπτονται εμφανίζονται ως μια

τριπλή. Τέλος, τα πρωτόνια του υδροξυλίου και της αμινομάδας είναι ευκίνητα και ανταλλάσσονται με τα δευτέρια του νερού με αποτέλεσμα να μην δίνουν σήματα στο φάσμα.

Απόδοση Φάσματος

ΠΡΩΤΟΝΙΟ	ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗ	ΣΤΑΘΕΡΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ J (Hz)
H-2	3.72	t	1H	8.06
H-3a, H-3b, H-4	1.71	m	3H	-
H-5	0.95	d	3H	5.57
H-6	0.95	d	3H	5.57

ii. **Ισολευκίνη ή 2-αμινο-3-μεθυλοπεντανικό οξύ**

Η ισολευκίνη είναι ισομερές της λευκίνης με πολύ παρόμοιες ιδιότητες με αυτές της λευκίνης. Αποτελεί και αυτό ένα από τα απαραίτητα αμινοξέα για τον ανθρώπινο οργανισμό και περιέχεται σε πολλά τρόφιμα. Στην παρούσα μελέτη, η ισολευκίνη απομονώθηκε από τη βλέννα σαλιγκαριού από το δεύτερο κλάσμα της στήλης και η δομή της ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR. Παρακάτω φαίνεται το φάσμα της ουσίας σε D₂O.

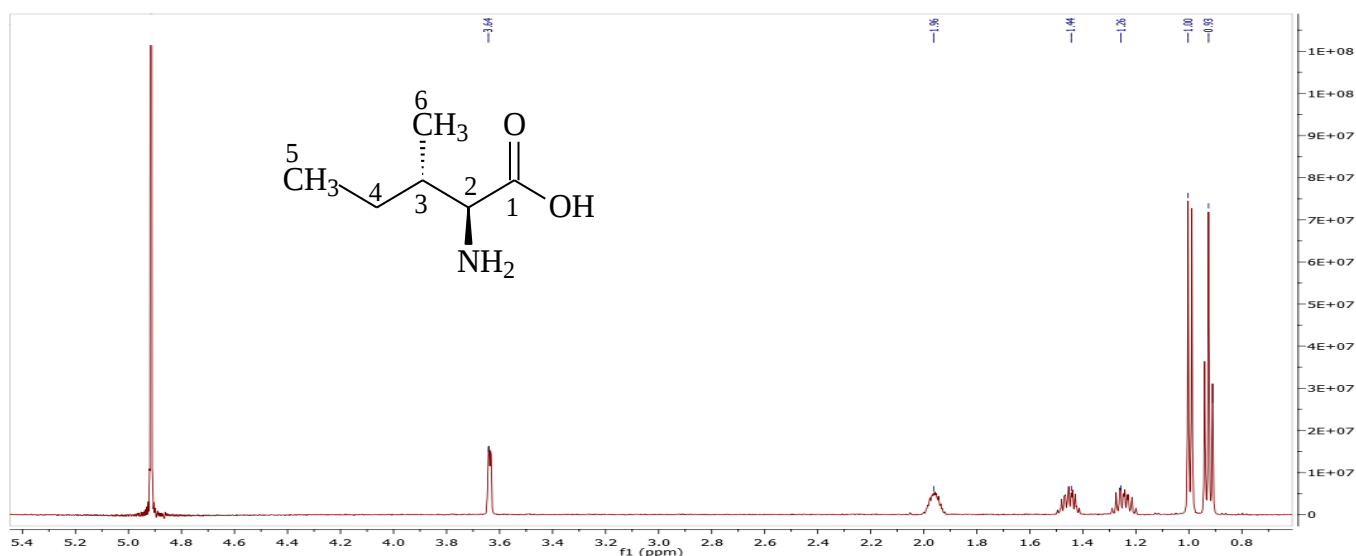


Figure 20: Φάσμα ¹H-NMR ισολευκίνης σε D₂O

Σχολιασμός

Η ισολευκίνη στο μόριο της διαθέτει μια αμινομάδα και ένα υδροξύλιο οξέος, τα πρωτόνια των οποίων είναι ευκίνητα και ανταλλάσσονται με τα δευτέρια του νερού με αποτέλεσμα να μην εμφανίζουν κορυφές. Το πρωτόνιο της θέσης 2 βρίσκεται σε άνθρακα ο οποίος συνδέεται και με άζωτο ενώ ο διπλανός του άνθρακας διαθέτει καρβονύλιο με αποτέλεσμα να δίνει κορυφή στο φάσμα με μετατόπιση 3.64 ppm. Επίσης, το H-2 συζεύγνυται με το γειτονικό H-3 εμφανίζοντας έτσι μια διπλή κορυφή με σχάση $J = 3.98$ Hz. Το πρωτόνιο της θέσης 3 εκτός από τη σύζευξη του με το H-2 συζεύγνυται και με τα πρωτόνια του γειτονικού μεθυλίου και με τα πρωτόνια H-4a, 4b, με αποτέλεσμα να δίνει μία πολλαπλή κορυφή σε δ 1.96. Τα πρωτόνια H-4a, 4b δεν είναι χημικά ισοδύναμα, λόγω στερεοχημείας, και έτσι δίνουν δύο διαφορετικές κορυφές στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$. Επίσης, και τα δυο αυτά πρωτόνια εμφανίζουν σύζευξη μεταξύ τους, με τα πρωτόνια του άνθρακα 5 και με το H-3, με αποτέλεσμα να δίνουν πολλαπλές κορυφές. Συγκεκριμένα, το ένα από τα δύο εμφανίζει μια πολλαπλή κορυφή σε δ 1.25 και το άλλο δίνει μια πολλαπλή κορυφή σε δ 1.45, χωρίς όμως να μπορούμε ταυτοποιήσουμε ποια κορυφή αντιστοιχεί σε ποιο πρωτόνιο. Τα πρωτόνια του άνθρακα 5 συζεύγνυνται με τα δύο γειτονικά πρωτόνια του άνθρακα 4 και δίνουν μια τριπλή κορυφή ($J = 7.82$ Hz) σε δ 0.93, ενώ τα πρωτόνια του μεθυλίου στη θέση 3 συζεύγνυνται μόνο με το πρωτόνιο H-3 και δίνουν μία διπλή κορυφή ($J = 7.14$ Hz) σε δ 1.

Απόδοση φάσματος

ΠΡΩΤΟΝΙΟ	ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗ	ΣΤΑΘΕΡΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ J (Hz)
H-2	3.64	d	1H	3.98
H-3	1.96	m	1H	-
H-4a	1.25	m	1H	-
H-4b	1.45	m	1H	-
H-5	0.93	t	3H	7.82
CH ₃ -3	1.00	d	3H	7.14

iii. Ουρακίλη

Η ουρακίλη είναι μια από τις τέσσερις νουκλεοτιδικές βάσεις του RNA. Ανήκει στις πυριμιδίνες, καθώς ο βασικός σκελετός είναι μια πυριμιδίνη με τη διαφορά ότι διαθέτει δύο καρβονυλικές ομάδες. Στο δίκλωνο RNA η ουρακίλη συνδέεται με την αδενίνη, μέσω δύο δεσμών υδρογόνου, ενώ στο DNA αντικαθίσταται από την θυμίνη. Στη παρούσα μελέτη η ουρακίλη εκλούστηκε με 100% H₂O στο τρίτο κλάσμα της παραπάνω στήλης και η δομή της ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR. Παρακάτω φαίνεται το φάσμα της σε D₂O.

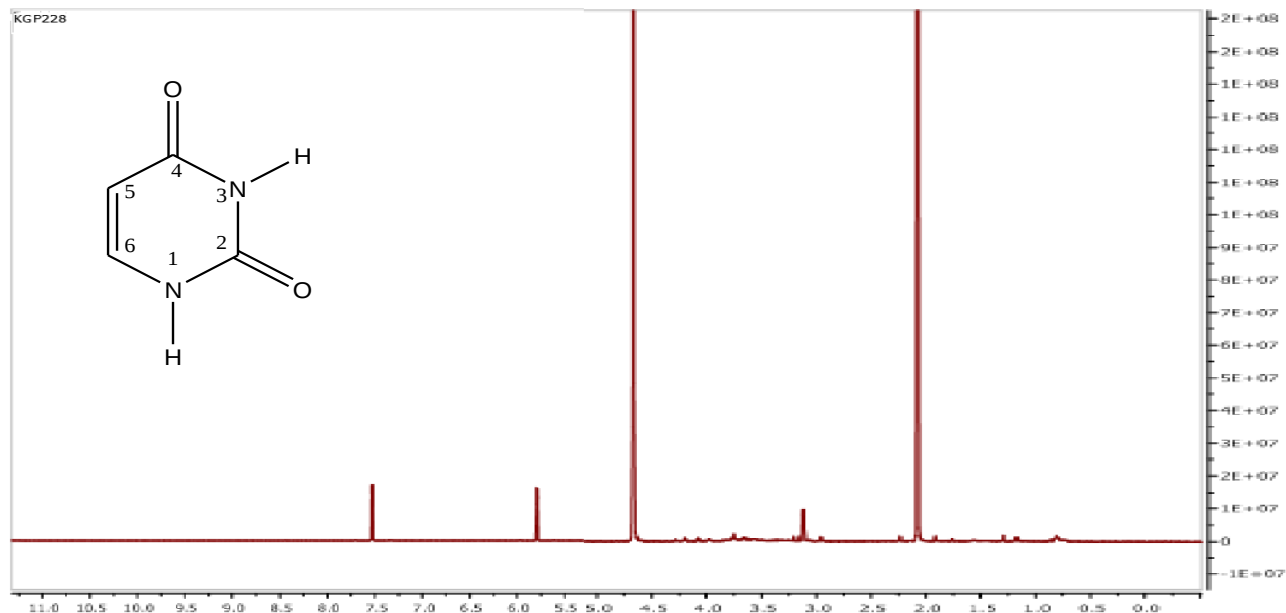


Figure 21: Φάσμα ¹H-NMR ουρακίλης σε D₂O

Σχολιασμός

Η ουρακίλη αποτελείται από έναν πυριμιδινικό σκελετό, όπου στις θέσεις 2 και 4 υπάρχουν δυο καρβονυλικές ομάδες. Τα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα με τα δύο άζωτα είναι ευκίνητα και ανταλλάσσονται με τα δευτέρια του νερού, με αποτέλεσμα να μην εμφανίζουν κορυφές στο φάσμα ¹H-NMR. Επομένως, τα μόνα πρωτόνια της ένωσης που δίνουν κορυφές είναι τα πρωτόνια του διπλού δεσμού H-5 και H-6. Συγκεκριμένα, και τα δύο πρωτόνια συνδέονται με άνθρακα διπλού δεσμού, όμως το H-5 έχει δίπλα του καρβονύλιο ενώ το H-6 έχει άζωτο, γιαυτό και εμφανίζουν διαφορετικές μετατοπίσεις δ. Έτσι, το H-5 δίνει κορυφή σε δ 5.79 λόγω της θωράκισής του από το καρβονύλιο, ενώ το H-6 εμφανίζεται πιο αποθωρακισμένο σε δ 7.53, λόγω του γειτονικού αζώτου. Τέλος, οι κορυφές και των δύο πρωτονίων είναι διπλές λόγω της σύζευξης που εμφανίζουν μεταξύ τους, με J= 7.69 Hz.

Απόδοση Φάσματος

ΠΡΩΤΟΝΙΟ	ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗ	ΣΤΑΘΕΡΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ J (Hz)
H-5	5.79	d	1H	7.69
H-6	7.53	d	1H	7.69

8.3 ΔΙΑΛΕΥΚΑΝΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΑΛΛΑΝΤΟΪΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR

Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή, στα περισσότερα καλλυντικά σκευάσματα που έχουν ως βάση τη βλέννα σαλιγκαριού, αναφέρεται η ύπαρξη αλλαντοΐνης. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε η αλλαντοΐνη είναι ένα μόριο που έχει περιγραφεί λανθασμένα με φασματοσκοπία NMR σε πολλά άρθρα. Προκειμένου λοιπόν να ελέγξουμε αν η βλέννα του *Helix aspersa* περιέχει αλλαντοΐνη έπρεπε πρώτα να εξακριβώσουμε ποια από τα φασματοσκοπικά δεδομένα της βιβλιογραφίας για την αλλαντοΐνη είναι σωστά. Έτσι, ζυγίστηκαν 20 mg πρότυπης αλλαντοΐνης, διαλύθηκαν σε DMSO- d_6 και λήφθηκαν φάσματα ^1H -NMR και ^{13}C -NMR.

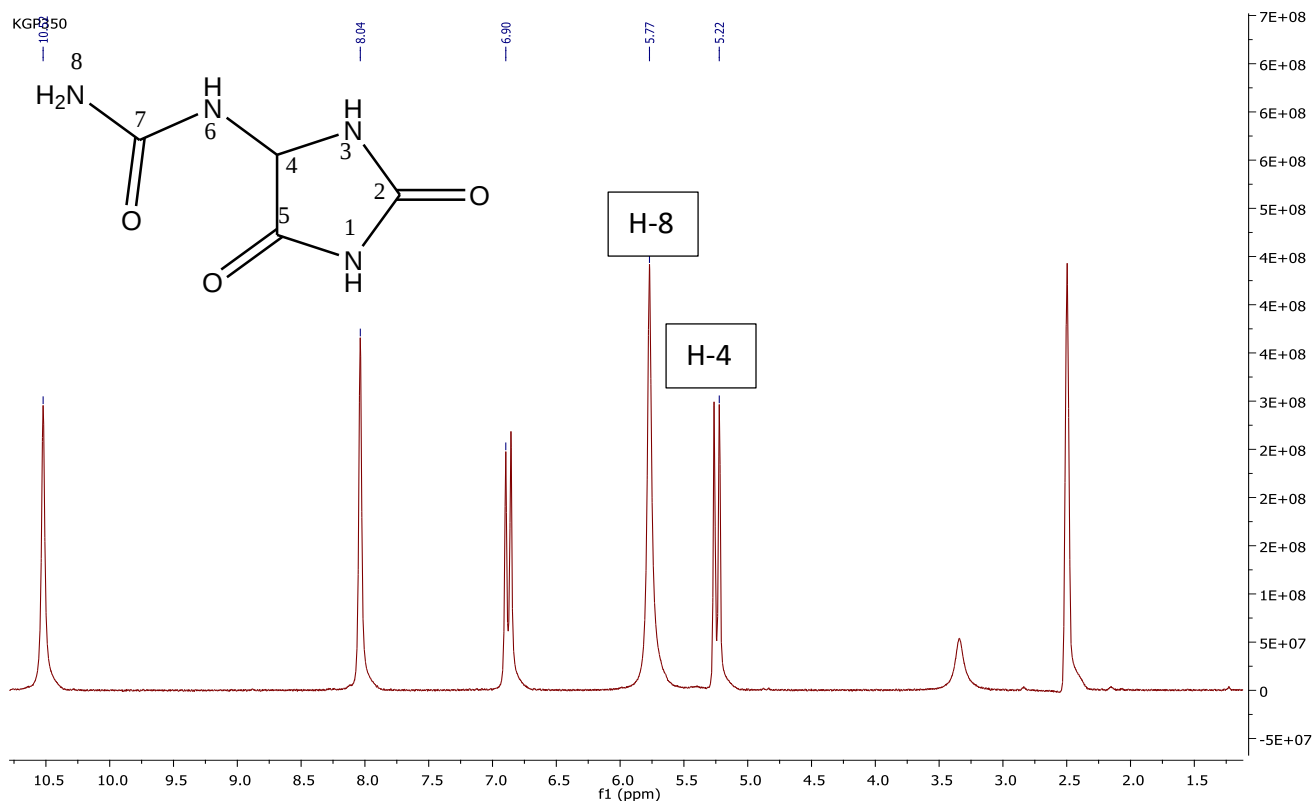


Figure 22: ^1H -NMR πρότυπης αλλαντοΐνης σε DMSO- d_6

Αρχικά βλέπουμε ότι στο φάσμα ^1H -NMR της αλλαντοΐνης σε DMSO, εμφανίζονται πέντε κορυφές. Δυο διπλές d ($J = 7.89 \text{ Hz}$) σε δ 5.23 και 6.90, και τρεις μονές κορυφές σε δ 5.77, 8.04 και 10.5. Από τις ολοκληρώσεις των κορυφών είδαμε ότι η κορυφή στα 5.77 ppm ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια σε σχέση με τις άλλες. Επομένως συμπεραίνουμε ότι η κορυφή αυτή αντιστοιχεί στα δυο πρωτόνια H-8 της αμινομάδας.

Από το φάσμα πρωτονίου της πρότυπης αλλαντοΐνης φαίνεται ότι η απόδοση NMR των Xu *et al.* είναι λανθασμένη, καθώς στο συγκεκριμένο άρθρο αναφέρεται ότι η αλλαντοΐνη εμφανίζει μία μονή κορυφή στα 3.35 ppm, η οποία στην πρότυπη ουσία δεν υπάρχει. (Xu *et al.*, 2011)

Έπειτα, προχωρήσαμε σε φάσμα δυο διαστάσεων HSQC, το οποίο δείχνει τη συσχέτιση των πρωτονίων με τους άνθρακες που ανήκουν. Όπως φαίνεται και παραπάνω, βλέπουμε ότι εμφανίζεται μια συσχέτιση μεταξύ του πρωτονίου σε δ 5.23 και ενός άνθρακα στα 62.1 ppm. Έτσι συμπεραίνουμε ότι το πρωτόνιο στα 5.23 ppm αντιστοιχεί στο μοναδικό πρωτόνιο που βρίσκεται πάνω σε άνθρακα που είναι το H-4.

Αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με δυο άρθρα της βιβλιογραφίας όπου αναφέρουν ότι το πρωτόνιο που βρίσκεται πάνω στον άνθρακα σε δ 62.1 εμφανίζει κορυφή στο φάσμα πρωτονίου σε δ 8.1. (Rashed *et al.*, 2004; Shubashini *et al.*, 2011)

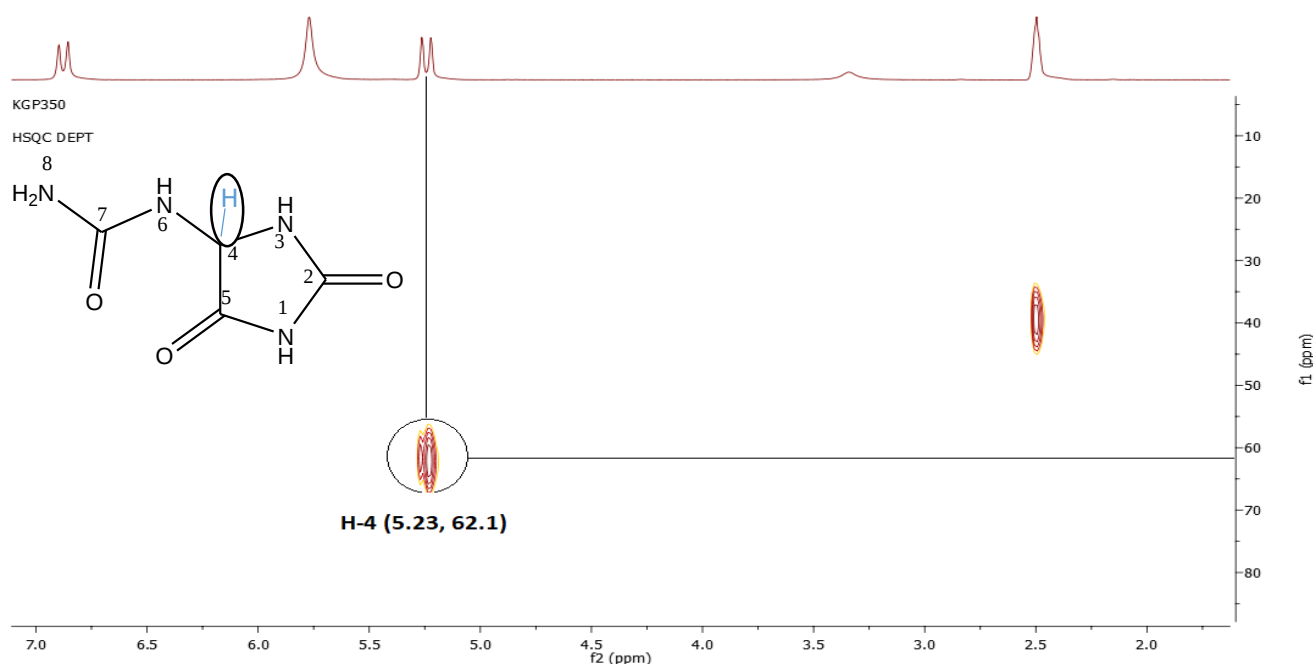


Figure 23: HSQC- DEPT αλλαντοΐνης πρότυπης σε DMSO- d_6 σε NMR 200 MHz

Στη συνέχεια, λήφθηκε φάσμα δυο διαστάσεων HMBC το οποίο δείχνει συσχέτιση άνθρακα με πρωτόνιο σε απόσταση τριων δεσμών. Γνωρίζουμε ότι σε ένα φάσμα ^{13}C -NMR οι καρβονυλικοί άνθρακες εμφανίζονται στην περιοχή 160-210 ppm. Σε αυτή την περιοχή παρατηρήθηκε ότι υπάρχουν τρεις τέτοιοι καρβονυλικοί άνθρακες με δ 157, 157.9 και 174. Παρατηρούμε ότι στο φάσμα HMBC υπάρχει ένας άνθρακας με δ 174 ο οποίος εμφανίζει συσχετίσεις με τέσσερα πρωτόνια. Στο μόριο της αλλαντοΐνης ο μοναδικός άνθρακας που μπορεί να εμφανίσει τέσσερις συσχετίσεις είναι ο άνθρακας C-5 οπότε αυτός εμφανίζεται στα 174 ppm. Ο C-5 εμφανίζει μια μικρή συσχέτιση J-2 με το πρωτόνιο στα 10.5 ppm και μία μεγαλύτερη J-3 με το πρωτόνιο στα 8.04. Επομένως, το H-1 είναι το πιο αποθωρακισμένο πρωτόνιο και αντιστοιχεί στην κορυφή με δ 10.50, αποθωράκιση που δικαιολογείται, καθώς βρίσκεται μεταξύ δύο καρβονυλίων. Επίσης, ο καρβονυλικός άνθρακας στα 157 ppm συσχετίζεται με τρία πρωτόνια εκ των οποίων το ένα είναι το πρωτόνιο H-1 σε δ 10.50, και ως εκ τούτου ο άνθρακας αυτός αντιστοιχεί στον C-2. Επιπλέον, ο C-2 συσχετίζεται και με το πρωτόνιο στα 8.04 ppm, γεγονός που αποδεικνύει ότι η κορυφή στα 8.04 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3 και κατά συνέπεια το πρωτόνιο στα 6.89 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6. Μάλιστα, στο φάσμα ^1H -NMR η κορυφή του H-6 εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με $J = 7.89$ Hz, καθώς συζεύγνεται με το πρωτόνιο H-4. Ο καρβονυλικός άνθρακας C-7, ο οποίος βρίσκεται εκτός δακτυλίου, εμφανίζεται σε δ 157.9 και συσχετίζεται με τα πρωτόνια H-6 και το H-4, χωρίς να εμφανίζει συσχέτιση με τα πρωτόνια H-8 της αμινομάδας.

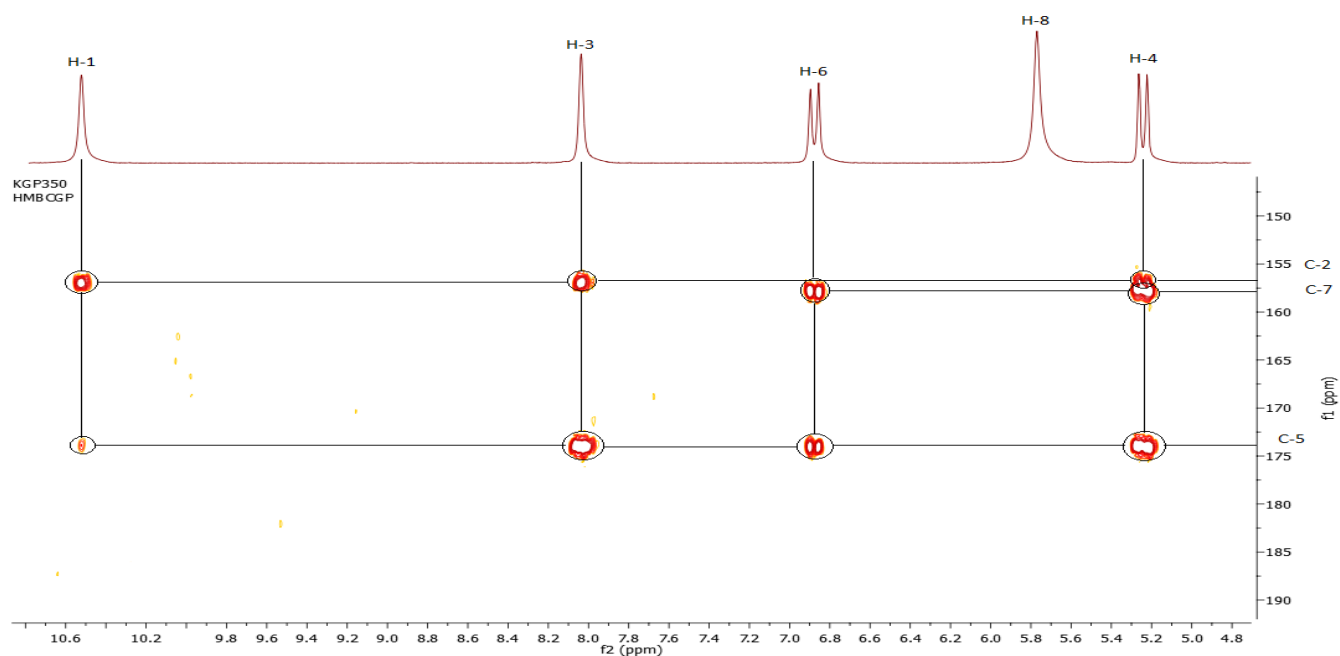
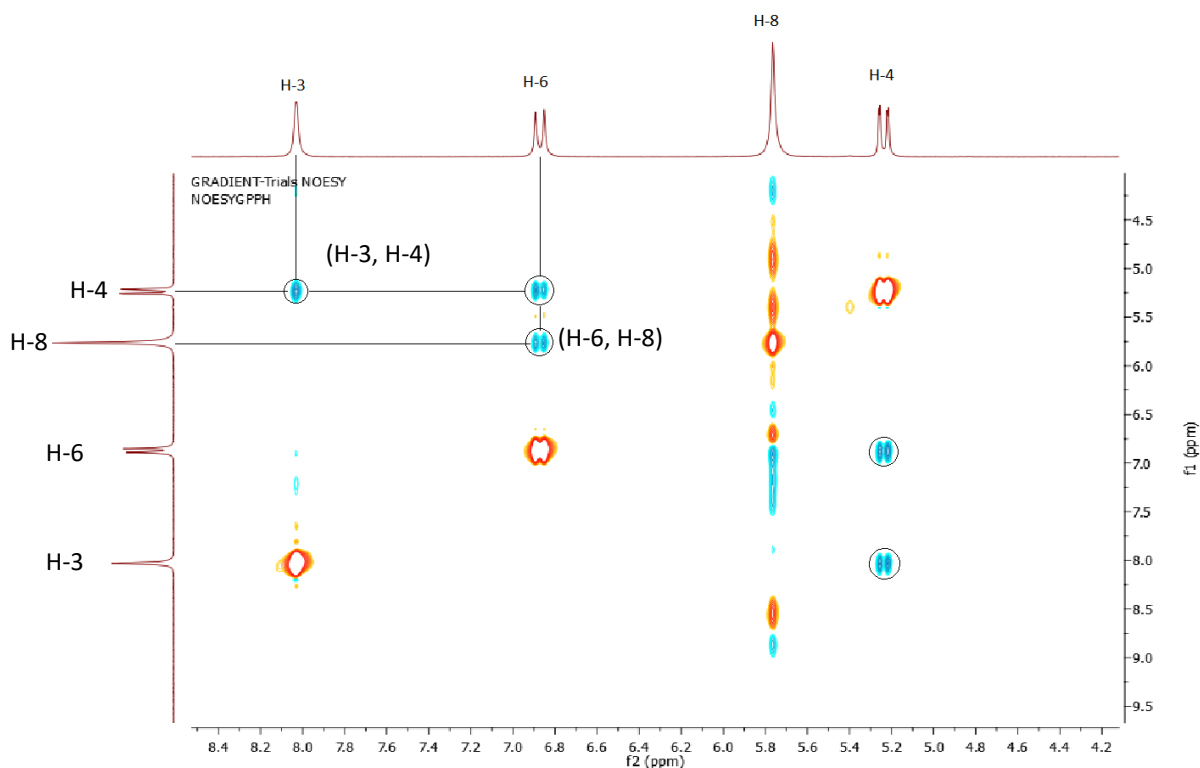


Figure 24: HMBC πρότυπης αλλαντοΐνης σε DMSO-d₆ σε NMR 200 MHz

Επίσης, με σκοπό να εξακριβώσουμε τις συσχετίσεις των πρωτονίων H-1, H-3 και H-6, προχωρήσαμε σε φάσμα δυο διαστάσεων NOESY στην πρότυπη αλλαντοΐνη. Από το παρακάτω φάσμα εξακριβώσαμε ότι η αποθωράκιση του πρωτονίου της θέσης 3 είναι σε δ 8.04, ενώ του H-1 σε δ 10.50. Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε ότι το πρωτόνιο σε δ 8.04 συσχετίζεται στο χώρο με το H-4, ενώ το πρωτόνιο στα 10.50 ppm δεν εμφανίζει καμία συσχέτιση στο φάσμα. Καταλήξαμε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι το H-3 αντιστοιχεί στην κορυφή στα 8.04 ppm ενώ το H-1 αντιστοιχεί στην κορυφή στα 10.50 ppm, όπως σωστά είχαμε συμπεράνει και από το φάσμα HMBC. Επίσης, από το φάσμα NOESY βλέπουμε ότι το πρωτόνιο σε δ 6.89 συσχετίζεται τόσο με τα πρωτόνια H-8 όσο και με το H-4, γεγονός που μας δείχνει ότι αντιστοιχεί στο πρωτόνιο που είναι πιο κοντά στην αμινομάδα, άρα το H-6, όπως είχαμε σωστά συμπεράνει και από το HMBC παραπάνω.

Στο σημείο αυτό, πρέπει να τονιστεί ότι στη βιβλιογραφία οι Yin *et al.* οι οποίοι απομόνωσαν την αλλαντοΐνη από το φυτό *Gynostemma pentaphyllum*, στην απόδοση δομής της ουσίας αναφέρουν ότι το πρωτόνιο H-3 εμφανίζεται σε δ 10.5 και το H-1 σε δ 8.04. (Coxon *et al.*, 1977; Yin *et al.*, 2004) Ο ισχυρισμός αυτός αποδεικνύεται λανθασμένος καθώς όπως προαναφέρθηκε στο HMBC της πρότυπης ουσίας, το H-1 εμφανίζει μια ασθενή συσχέτιση J-2 με τον άνθρακα C-5, άρα βρίσκεται δίπλα του. Επιπλέον, από το φάσμα NOESY φαίνεται ότι το πρωτόνιο σε δ 10.50 δεν συσχετίζεται με κανένα άλλο πρωτόνιο στο χώρο, ενώ το πρωτόνιο σε δ 8.04 συσχετίζεται με το H-4. Έτσι σε δ 10.50 αντιστοιχεί το H-1 και σε δ 8.04 το H-3.



Τέλος, όπως προκύπτει από το φάσμα HMBC, ο άνθρακας C-4 στα 62.1 ppm συσχετίζεται με τα γειτονικά πρωτόνια H-1, H-3 και H-6

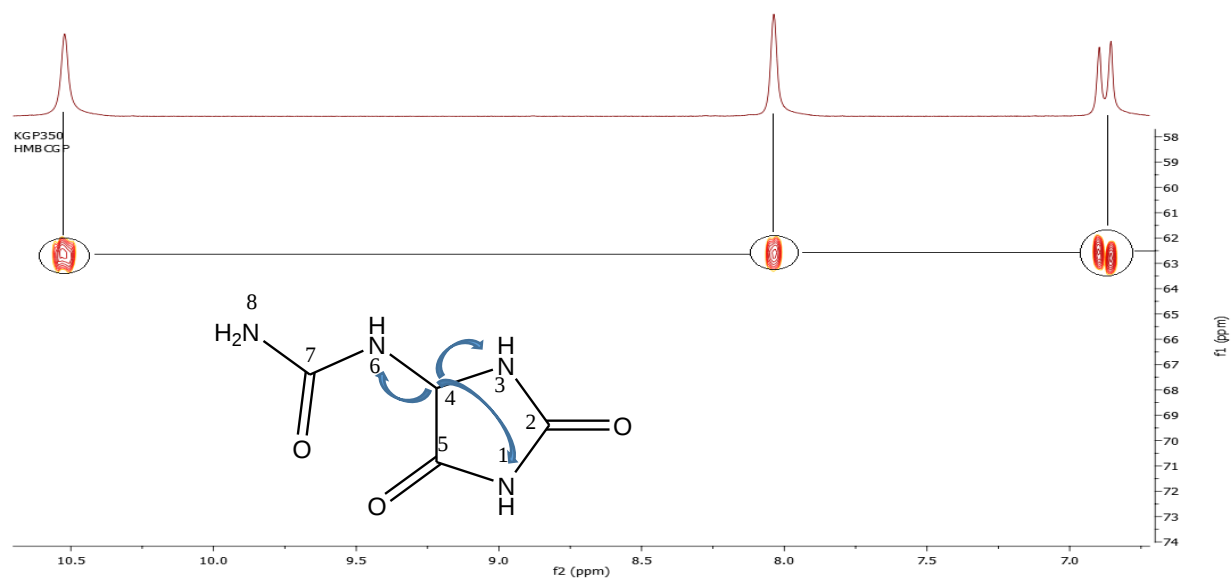


Figure 25: HMBC πρότυπης αλλαντοΐνης σε DMSO-d₆ σε NMR 200 MHz

Ακόμη, λήφθηκε επίσης φάσμα ¹³C-NMR σε DMSO προκειμένου να εξακριβώσουμε τις μετατοπίσεις όλων των ανθράκων του μορίου.

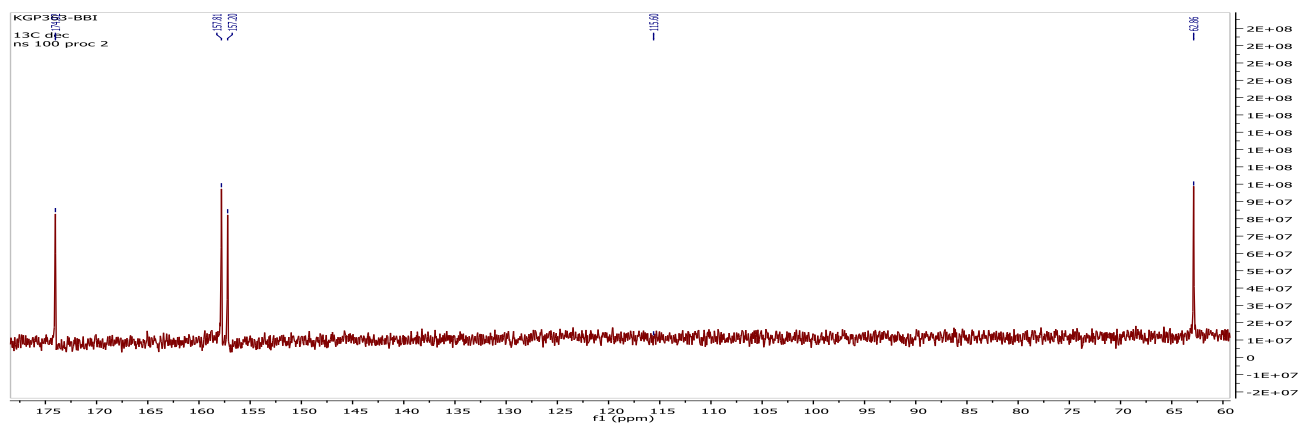
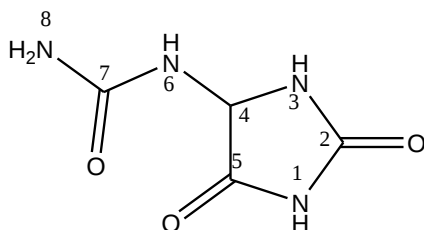


Figure 26: Φάσμα ¹³C-NMR πρότυπης αλλαντοΐνης σε DMSO-d₆

Καταλήξαμε λοιπόν, ότι η σωστή απόδοση του μορίου της **αλλαντοΐνης** είναι η εξής όπως σωστα έχει περιγραφεί ξανά στο παρελθόν μόνο από τους Sang *et al.* 1997 και όχι από όλες τις άλλες βιβλιογραφικές αναφορές.



Απόδοση Φάσματος

ΠΡΩΤΟΝΙΟ	ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗ	ΣΤΑΘΕΡΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ J (Hz)
H-4	5.23	d	1H	7.89
H-8	5.77	s	2H	-
H-6	6.89	d	1H	7.89
H-3	8.04	s	1H	-
H-1	10.50	s	1H	-

ΑΝΘΡΑΚΑΣ	ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (ppm)
C-4	62.86
C-2	157
C-7	157.9
C-5	174.09

8.4 ΈΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΑΛΛΑΝΤΟΪΝΗΣ – ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, πολλές εταιρίες που έχουν καλλυντικά προϊόντα με βλέννα σαλιγκαριού, ισχυρίζονται ότι η βλέννα περιέχει αλλαντοΐνη. Ωστόσο αυτός ο ισχυρισμός δεν έχει κάποια επιστημονική βάση καθώς κανείς ως τώρα δεν έχει απομονώσει αλλαντοΐνη από τη βλέννα σαλιγκαριού. Η μοναδική περίπτωση που αναφέρεται κάτι τέτοιο είναι από τους El Mubarak *et al.* όπου γίνεται μέτρηση της αλλαντοΐνης με HPLC χωρίς να αναφέρεται πως γίνεται η ταυτοποίηση της ουσίας. Έτσι, αφού διευκρινίστηκε ποια είναι η ορθή απόδοση δόμης του φάσματος της αλλαντοΐνης με NMR, αποφασίσαμε να ελέγξουμε αν υπάρχουν οι αντίστοιχες κορυφές στη βλέννα σαλιγκαριού *Helix aspersa*. Για το σκοπό αυτό, ογκομετρήθηκε 1 ml βλέννας *Helix aspersa muller* εκχυλίστηκε με διπλάσια ποσότητα ακετονιτρίλιου, το υπερκείμενο εξατμίστηκε και λάβαμε φάσμα σε DMSO.

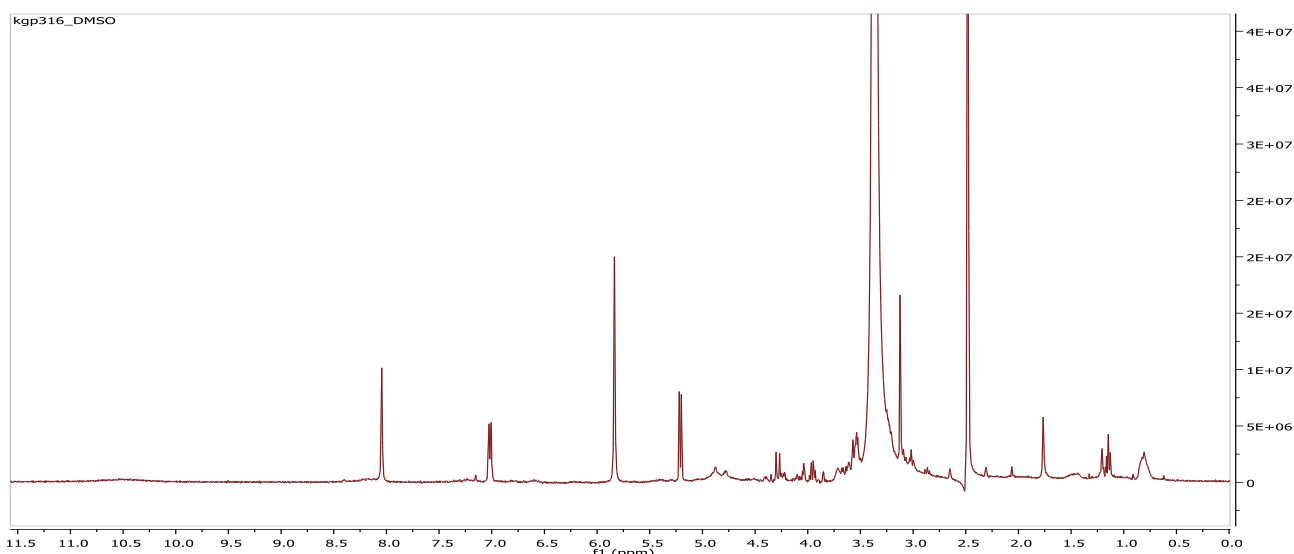


Figure 27: Φάσμα ^1H -NMR της βλέννας σε DMSO-d_6

Στο παραπάνω φάσμα φαίνεται να υπάρχουν οι τέσσερις από τις πέντε κορυφές της αλλαντοΐνης, καθώς η οξεία κορυφή στα 10.50 ppm μετατρέπεται σε ευρεία (br s), ενώ οι κορυφές που στην αλλαντοΐνη εμφανίζονται στα 6.89 και στα 5.77 ppm, στη βλέννα εμφανίζονται στα 7.03 και στα 5.84 ppm αντίστοιχα. Οι διαφορές φαίνονται στο παρακάτω φάσμα όπου με κόκκινο είναι το φάσμα της βλέννας σε DMSO-d_6 και με μπλε το φάσμα της πρότυπης ουσίας.

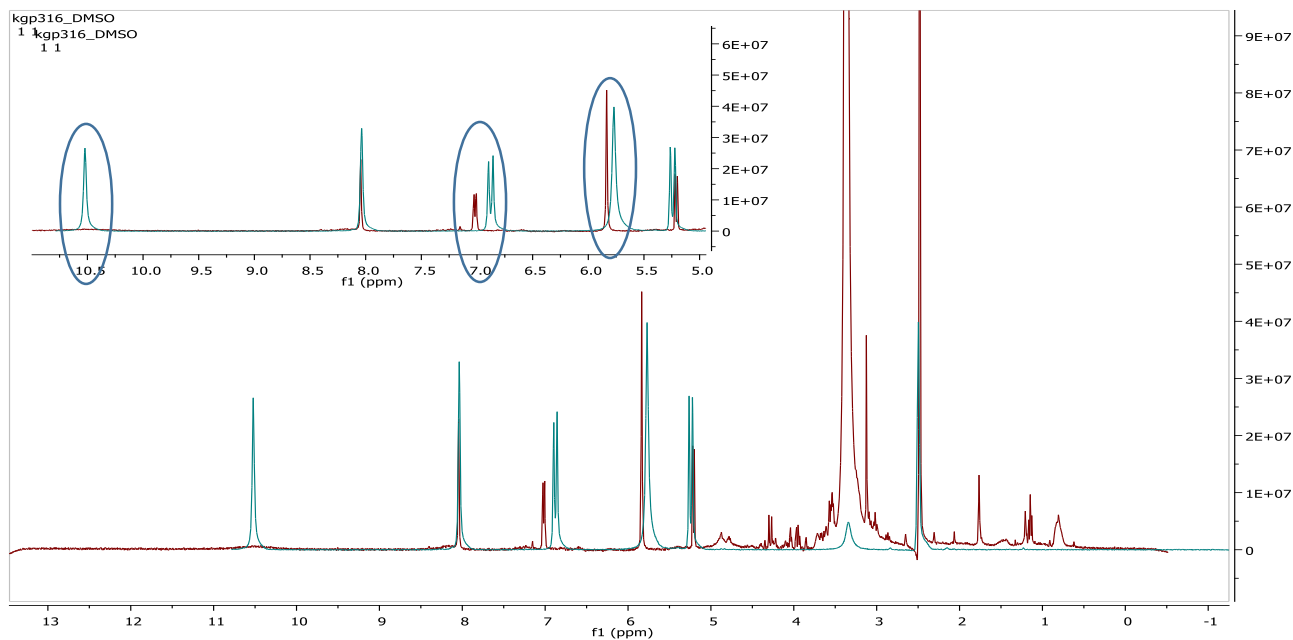
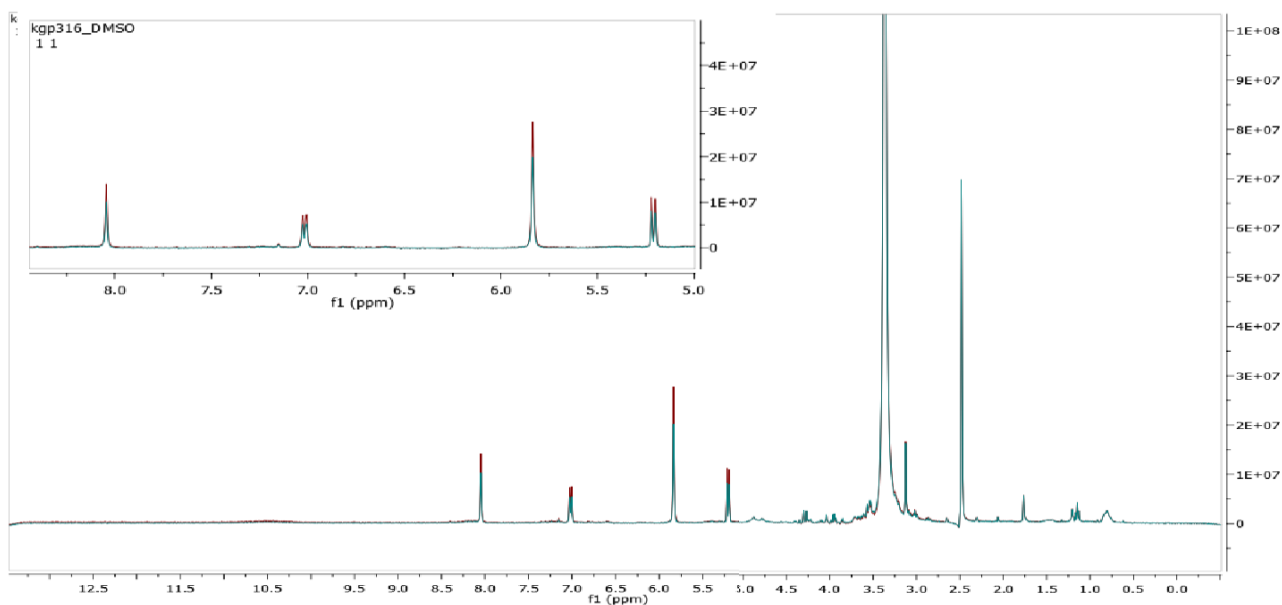


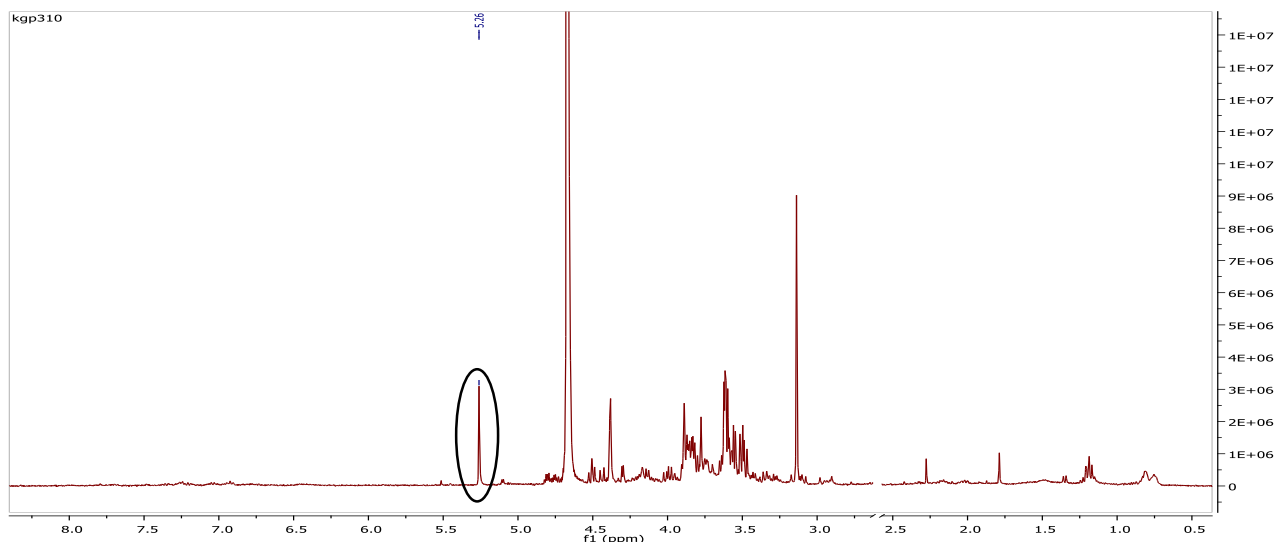
Figure 28: Σύγκριση φάσματος βλέννας και πρότυπης αλλαντοΐνης σε DMSO-d₆

Με σκοπό λοιπόν να εξακριβώσουμε αν αυτό το συστατικό της βλέννας είναι αλλαντοΐνη ή αν αποτελεί κάποιο παράγωγό της, προσθέσαμε μικρή ποσότητα πρότυπης αλλαντοΐνης στο παραπάνω δείγμα και λάβαμε ξάνα φάσμα σε DMSO-d₆.



Παρατηρήσαμε ότι προσθέτοντας πρότυπη αλλαντοΐνη στη βλέννα η κορυφή στα 10.50 ppm μετατρέπεται σε ευρεία, ενώ και οι υπόλοιπες κορυφές μετατοπίζονται ελαφρώς συγκριτικά με την πρότυπη ουσία και αυξάνονται σε ύψος. Επομένως, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πιθανώς η αλλαντοΐνη προστιθέμενη στη βλέννα ιονίζεται.

Πραγματοποιήσαμε την ίδια διαδικασία στο ίδιο δείγμα αλλά αυτή τη φορά το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ πάρθηκε σε δευτεριωμένο νερό και διαπιστώσαμε ότι στον διαλύτη αυτό η ουσία εμφανίζει μια μονή κορυφή στα 5.26 ppm. Αυτό συμβαίνει, διότι τα πρωτόνια των αζώτων είναι ευκίνητα και ανταλλάσσονται με τα δευτέρια του νερού, που επίσης είναι ευκίνητα, με αποτέλεσμα να μην δίνουν σήματα στο φάσμα.



8.4.1 Διαδικασία απομόνωσης της ιονισμένης μορφής της αλλαντοΐνης

Αυτές οι διαφορές που αναφέρθηκαν παραπάνω, κατέστησαν αναγκαία την απομόνωση της ουσίας από τη βλέννα του σαλιγκαριού, ώστε να γίνει δυνατή η ταυτοποίηση της δόμης της και να εξακριβωθεί αν πρόκειται για την αλλαντοΐνη ή κάποια διαφορετική μορφή της.

Επιλέχθηκε η βλέννα στην οποία έγιναν οι παραπάνω δοκιμές η οποία φάνηκε να περιέχει μεγάλη ποσότητα της συγκεκριμένης ουσίας. Ογκομετρήθηκαν 10 ml βλέννας τα οποία αναμίχθηκαν με 1 gr ρητίνης (XAD 7). Το μίγμα αφέθηκε όλη την νύχτα υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα το μίγμα διηθήθηκε και το υπόλειμμα βλέννας φυλάχθηκε (διήθημα 1). Έπειτα, η ρητίνη ξεπλύθηκε με νερό. Η μισή ποσότητα ρητίνης εκχυλίστηκε με DMSO-d_6 και πάρθηκε φάσμα $^1\text{H-NMR}$. Παρατηρήσαμε ότι η ουσία μας δεν είχε δεσμευτεί από τη ρητίνη, άρα έπρεπε να ελεγχθεί αν έχει παραμείνει στο υπόλειμα της βλέννας (διήθημα 1).

Προχωρήσαμε λοιπόν σε επεξεργασία του διηθηματος 1 με διπλάσιο όγκο ακετονιτριλίου. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε και παραλάβαμε το υπερκείμενο, το οποίο εξατμίστηκε. Στο ξηρό υπόλειμμα προστέθηκε μικρή ποσότητα μεθανόλης και παρατηρήθηκε ότι δεν διαλύεται όλη η ποσότητα του δείγματος. Το μίγμα αφέθηκε σε ηρεμία, ώστε να καθιζάνει το ίζημα, και στη συνέχεια το υπερκείμενο εξατμίστηκε και πάρθηκε φάσμα σε DMSO-d_6 .

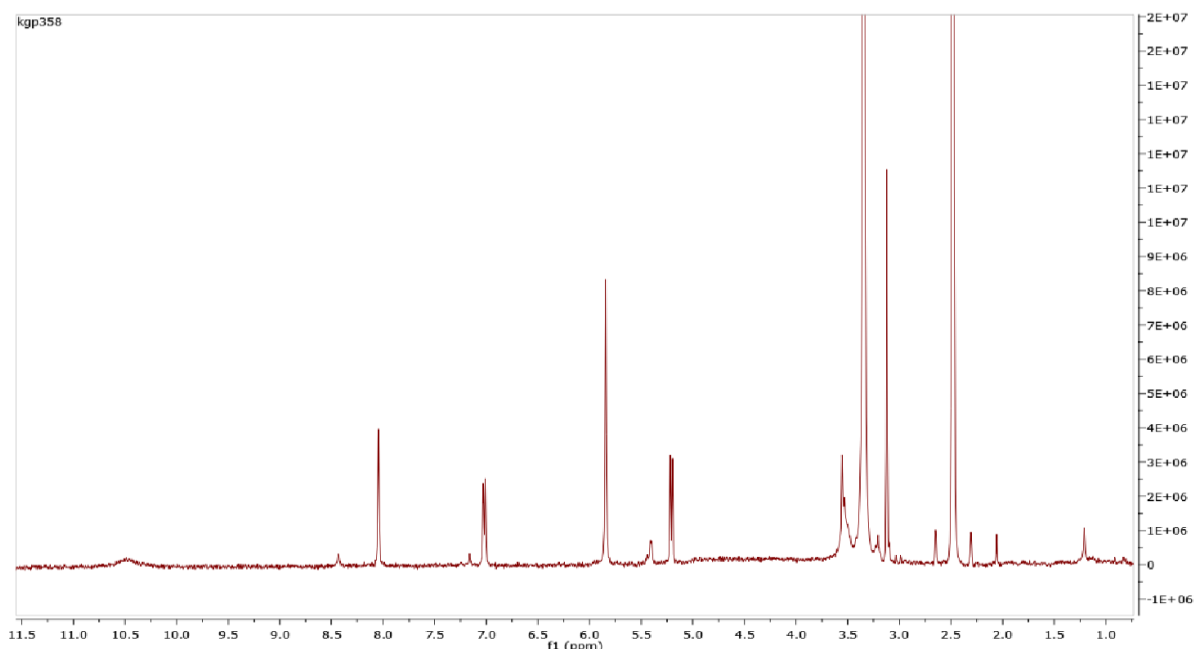
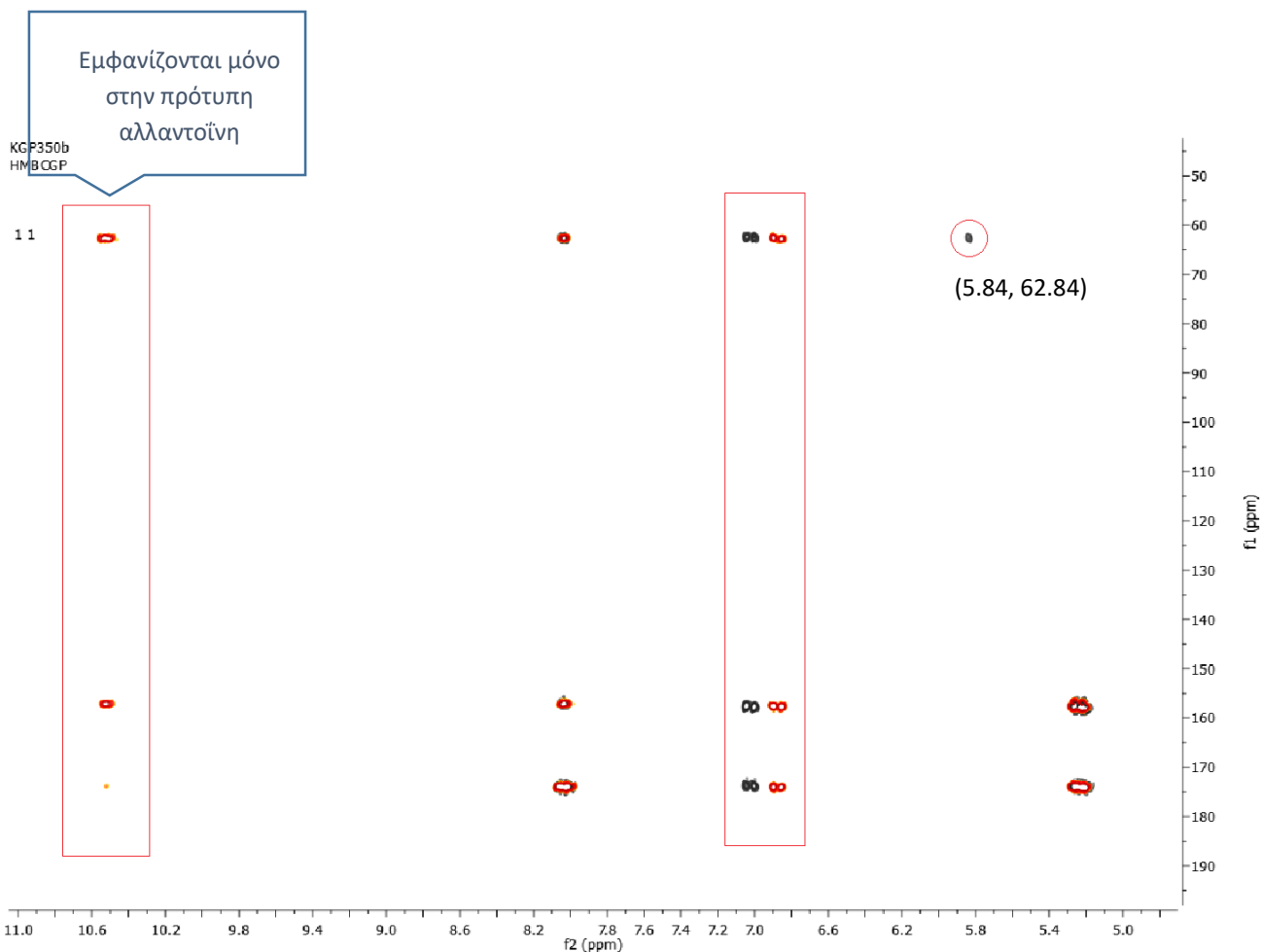


Figure 29: Φάσμα ^1H -NMR απομονωμένης ουσίας σε $\text{DMSO}-d_6$

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε άλλα 10 ml βλέννας ώστε να παραλάβουμε μεγαλύτερη ποσότητα της ουσίας και να ελεγχθεί με φάσματα δυο διαστάσεων.

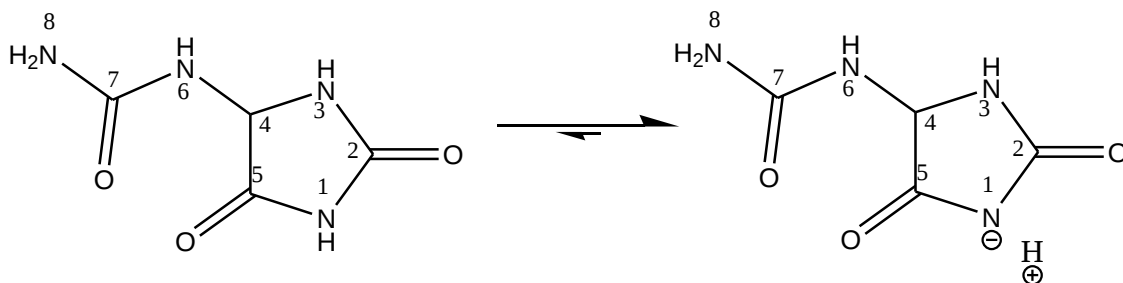
Προκειμένου λοιπόν να ταυτοποιηθεί η ακριβής δομή της ουσίας μέσα στη βλέννα προχωρήσαμε σε φάσμα δυο διαστάσεων HMBC και φάσματα μιας διάστασης ^1H -NMR και ^{13}C -NMR. Οι διαφορές που υπάρχουν μεταξύ των φασμάτων ^1H -NMR των δυο μορφών – πρότυπης αλλαντοΐνης και της ιονισμένης μορφής που υπάρχει στη βλέννα – αναφέρθηκαν και παραπάνω. Βλέπουμε ότι στην βλέννα η κορυφή στα 10.50 ppm εμφανίζεται ευρεία, σε αντίθεση με την πρότυπη αλλαντοΐνη που είναι οξεία, ενώ οι κορυφές που στην αλλαντοΐνη εμφανίζονται στα 6.89 και στα 5.77 ppm, στην ουσία της βλέννας εμφανίζονται στα 7.02 και στα 5.84 ppm αντίστοιχα. Η κορυφή στα 5.84 ppm ολοκληρώνει για δυο πρωτόνια όπως η αντίστοιχη της πρότυπης αλλαντοΐνης, άρα συμπεραίνουμε ότι πιθανώς αντιστοιχεί σε δυο πρωτόνια αμινομάδας.

Από το φάσμα HMBC της ουσίας που απομονώθηκε από τη βλέννα, παρατηρήσαμε ότι το πρωτόνιο σε δ 10.50 δεν εμφανίζει καμία συσχέτιση με κανέναν άνθρακα του μορίου. Η σημαντικότερη όμως διαφορά μεταξύ του φάσματος HMBC της ιονισμένης και της πρότυπης αλλαντοΐνης είναι ότι εμφανίζεται μια επιπλέον συσχέτιση. Η συσχέτιση αυτή είναι μεταξύ του πρωτονίου σε δ 5.84 και του άνθρακα στα 62.84 ppm, όπως φαίνεται παρακάτω όπου με σκούρο μπλε φαίνονται οι συσχετίσεις για την ιονισμένη ουσία και με κόκκινο οι συσχετίσεις της πρότυπης αλλαντοΐνης.



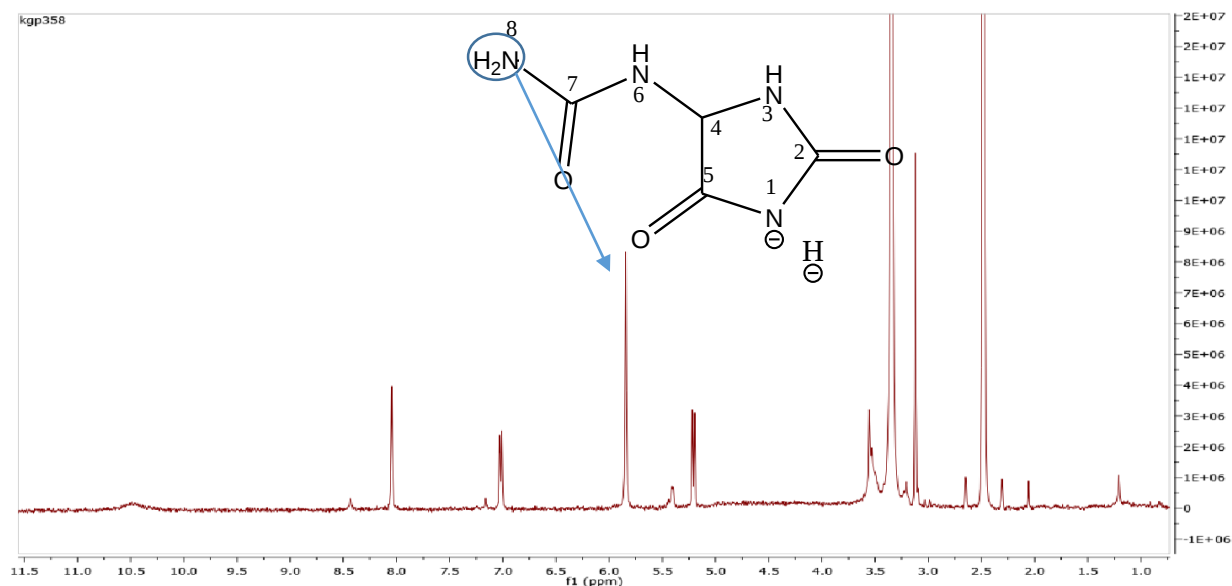
Η συσχέτιση αυτή εμφανίζεται μεταξύ των πρωτονίων στα 5.84 ppm και του άνθρακα στα 62.76 ppm μόνο στην μορφή της αλλαντοΐνης που υπάρχει στη βλέννα και όχι στην πρότυπη ουσία. Στο μόριο της αλλαντοΐνης οι κορυφές αυτές αντιστοιχούν στα πρωτόνια H-8 της αμινομάδας και του C-4, τα οποία έχουν απόσταση τεσσάρων δεσμών και δεν θα έπρεπε να συσχετίζονται. Το στοιχείο αυτό κατέστησε αναγκαία την περεταίρω μελέτη της ουσίας που υπάρχει στη βλέννα του σαλιγκαριού, για να εξακριβωθεί η ακριβής δομή της.

Υποθέσαμε λοιπόν ότι η μεταβολή του pH να προκαλεί αυτές τις μικρές διαφοροποιήσεις στη μορφή της αλλαντοΐνης που υπάρχει στη βλέννα. Μετρήσαμε λοιπόν το pH της βλέννας και είδαμε ότι είναι ελαφρώς αλκαλικό (pH=8). Θεωρήσαμε λοιπόν ότι υπάρχει η παρακάτω ισορροπία στη βλέννα

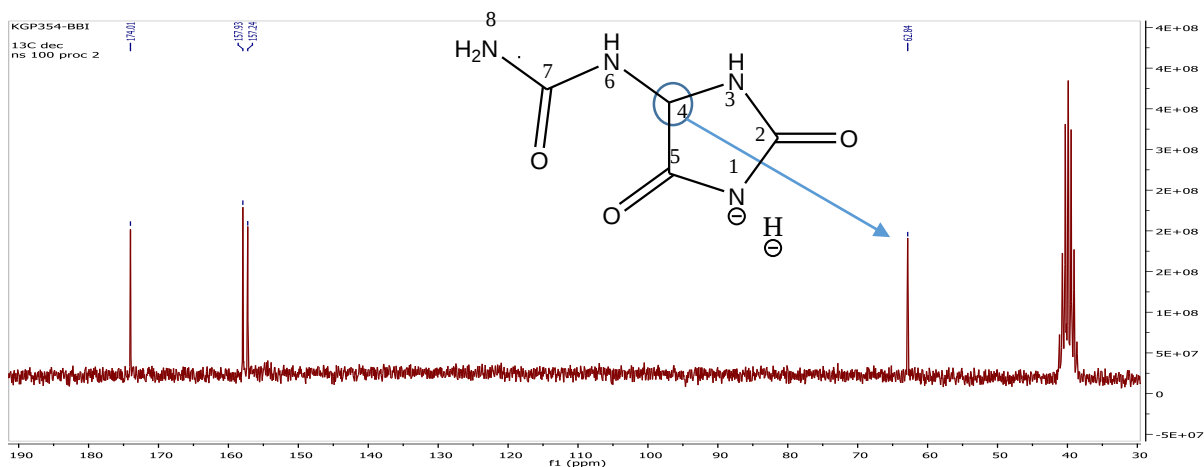


8.4.2 Ταυτοποίηση δομής της ιονισμένης μορφής της αλλαντοΐνης

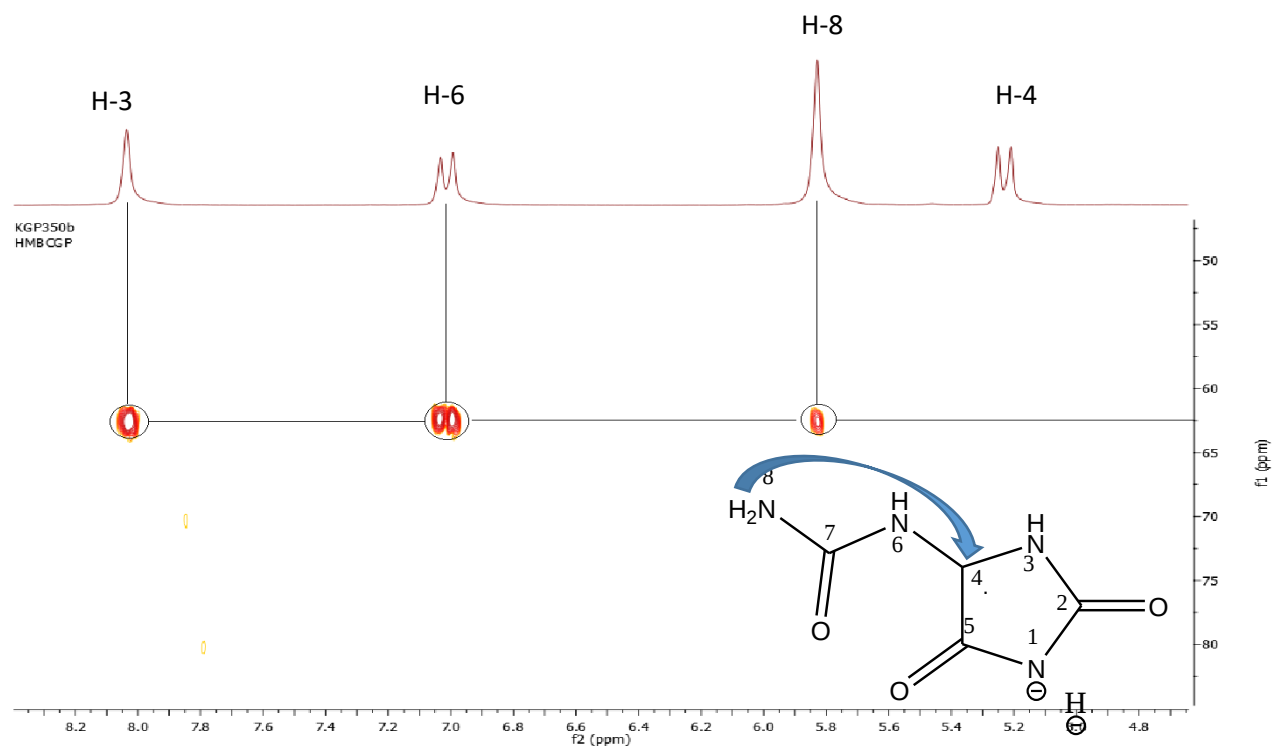
Η ταυτοποίηση της δομής της ιονισμένης αλλαντοΐνης έγινε με τη βοήθεια φασμάτων μιας διάστασης ^1H -NMR, ^{13}C -NMR και δυο διαστάσεων HMBC. Από το φάσμα ^1H -NMR που φαίνεται παρακάτω διαπιστώθηκε η ύπαρξη πέντε πρωτονίων τα οποία δίνουν πέντε κορυφές στο φάσμα. Δυο διπλές d ($J=8.31\text{Hz}$) σε δ 5.25 και 7.03, και δυο μονές σε δ 5.84 και 8.04. Επίσης υπάρχει μια μικρή ευρεία μονή κορυφή στα 10.5 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο που ιονίζεται, άρα κατα αντιστοιχία με την μη ιονισμένη μορφή, στο H-1. Η κορυφή στα 5.84 ppm ολοκληρώνει για 2H, επομένως συμπεραίνουμε ότι αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-8 της αμινομάδας, όπως συμβαίνει και στην μη ιονισμένη αλλαντοΐνη.



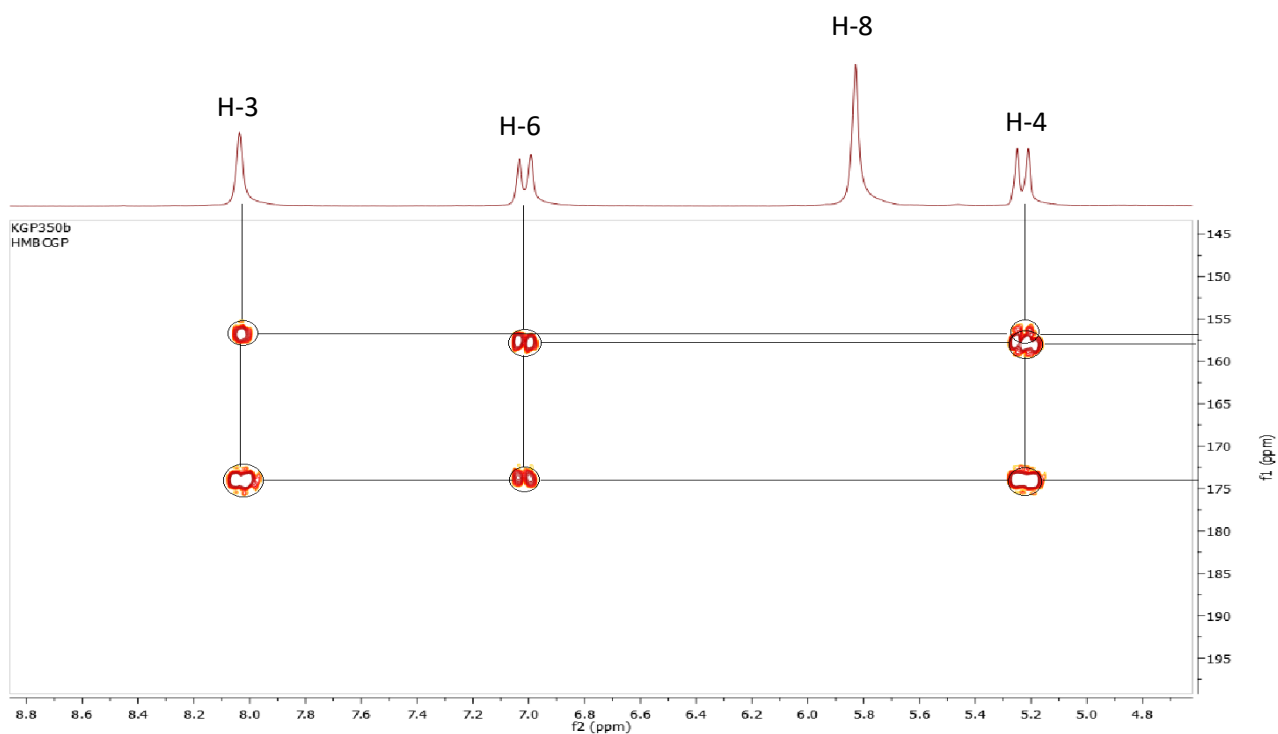
Επίσης, στο φάσμα ^{13}C -NMR φαίνεται ότι στο μόριο υπάρχουν συνολικά τέσσερις άνθρακες. Οι τρεις εμφανίζονται στην καρβονυλική περιοχή του φάσματος με δ 174, 157.95 και 157.24, ενώ υπάρχει και ένας ακόμη άνθρακας στα 62.84 ppm, οποίος αντιστοιχεί στον μοναδικό πρωτονιωμένο άνθρακα της ένωσης, τον C-4. Μάλιστα συγκριτικά με την μη ιονισμένη αλλαντοΐνη οι δύο μορφές εμφάνισαν μικρή διαφορά στον άνθρακα με δ 157.95.



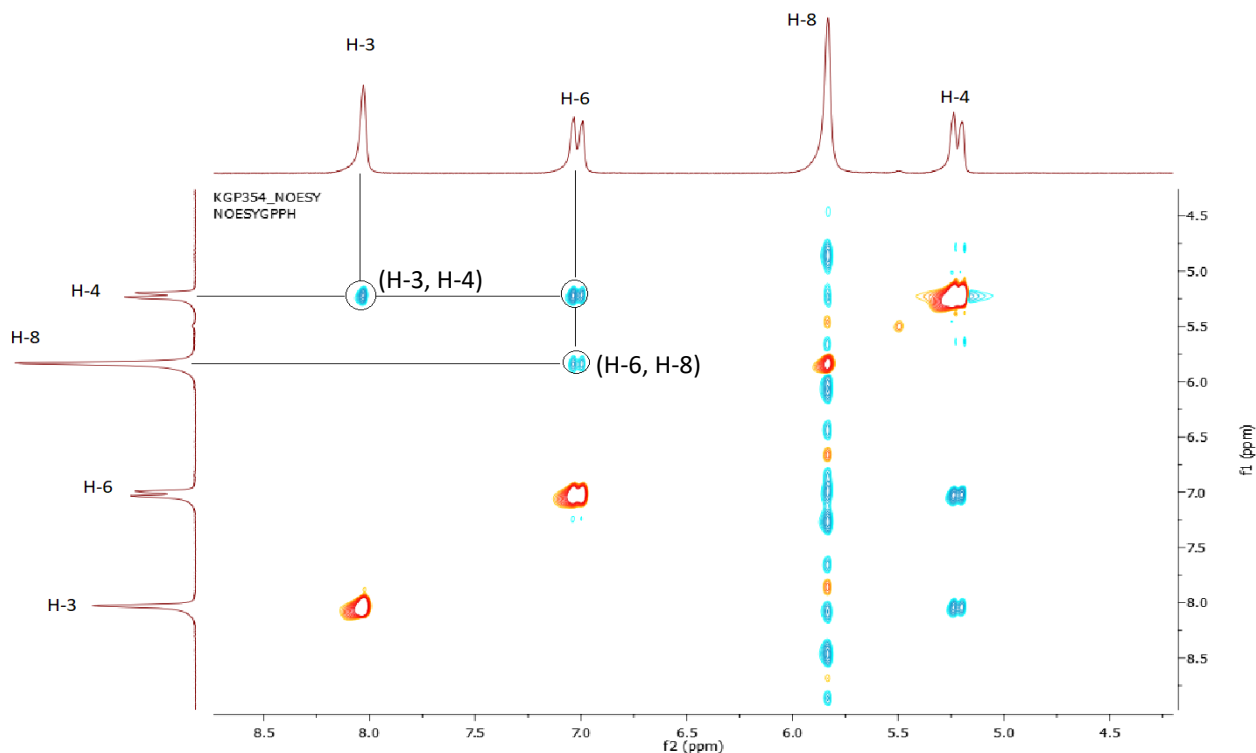
Ακόμα, από το φάσμα HMBC παρατηρήσαμε ότι το πρωτόνιο με δ 10.50 που εμφανίζεται ως ευρεία κορυφή, δεν εμφανίζει καμία συσχέτιση με κανέναν άνθρακα, ενώ στο $^1\text{H-NMR}$ μιας διάστασης φαίνεται ως ευρεία μονή κορυφή. Επίσης, κατά αναλογία με την μη ιονισμένη αλλαντοΐνη, το πρωτόνιο στα 5.24 ppm αντιστοιχεί στο H-4 καθώς είναι το λιγότερο αποθωρακισμένο και βρίσκεται πάνω στον άνθρακα στα 62.84 ppm. Η κορυφή είναι μια διπλή κορυφή (d) με $J=8.31$ Hz, καθώς συζεύγνυται με το πρωτόνιο του γειτονικού αζώτου στα 7.03 ppm. Λόγω της στεreoχημικής διαμόρφωσης του μορίου το H-2 συζεύγνυται μόνο με το ένα γειτονικό πρωτόνιο (είτε το H-6 είτε το H-3) και όχι και με τα δύο, όπως συμβαίνει και στην μη ιονισμένη αλλαντοΐνη. Επιπλέον, σχετικά με τον C-4 στα 62.84 ppm, όπως φαίνεται παρακάτω στο HMBC, εμφανίζει συσχέτιση με τα πρωτόνια H-8, η οποία δεν εμφανίζεται στην μη ιονισμένη μορφή της αλλαντοΐνης. Η μικρή αλλαγή του pH μέσα στη βλέννα ευνοεί την εμφάνιση της σύζευξης αυτής παρ'ότι πρόκειται για σύζευξη J-4.



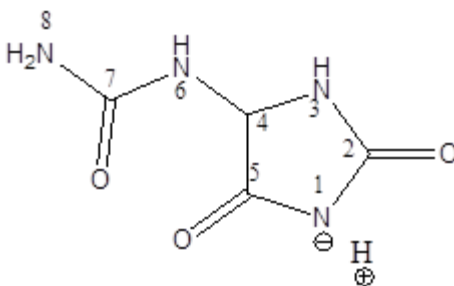
Ακόμα, βλέπουμε ότι ο άνθρακας στα 174.03 ppm συσχετίζεται με τρία πρωτόνια, ενώ οι άλλοι δύο καρβονυλικοί άνθρακες συσχετίζονται μόνο με δυο πρωτόνια ο καθένας. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο άνθρακας στα 174.03 ppm είναι ο C-5 (όπως και στην μη ιονισμένη μορφή) ενώ τα άλλα δύο καρβονύλια (C-2 και C-7) επειδή είναι ουρεϊδικά εμφανίζονται πιο θωρακισμένα (δ 157.24 και 157.95). Ο C-5 επίσης εμφανίζει συσχετίσεις με τα πρωτόνια H-4, H-6 και H-3, όπως και στην μη ιονισμένη μορφή, με τη διαφορά ότι στην πρότυπη ουσία εμφάνιζε τέσσερις συσχετίσεις ενώ εδώ τρεις. Οι άλλοι δύο καρβονυλικοί άνθρακες του μορίου συσχετίζονται και οι δύο με το πρωτόνιο H-4 (απόσταση τριων δεσμών), αλλά ο ένας από τους δύο (στα 157.24 ppm) συσχετίζεται με το πρωτόνιο στα 8.04 ppm, ενώ ο άλλος (στα 157.94 ppm) συσχετίζεται με το πρωτόνιο στα 7.03 ppm.



Προκειμένου να εξακριβώσουμε με σιγουριά ποιο πρωτόνιο είναι αυτό που ιονίζεται και προκαλεί αυτές τις διαφοροποιήσεις στα φάσματα, προχωρήσαμε σε φάσμα NOESY. Παρατηρήσαμε ότι το πρωτόνιο σε δ 7.03 συσχετίζεται τόσο με τα πρωτόνια H-8 όσο και με το H-4, γεγονός που μας δείχνει ότι αντιστοιχεί στο πρωτόνιο που είναι πιο κοντά στην αμινομάδα, άρα το H-6. Επίσης, το πρωτόνιο σε δ 8.04 αντιστοιχεί στο H-3, καθώς στο φάσμα NOESY δίνει συσχέτιση στο χώρο με το H-4, άρα βρίσκεται δίπλα του. Επομένως συμπεράναμε ότι ο ιονισμός γίνεται στο πρωτόνιο H-1 (δ 10.5) και όχι στο H-3.



Καταλήγουμε λοιπόν ότι η ιονισμένη μορφή της αλλαντοΐνης εμφανίζει αρκετά παρόμοια φασματοσκοπικά δεδομένα με την μη ιονισμένη μορφή, με κάποιες ωστόσο χαρακτηριστικές διαφορές, τόσο στο φάσμα ^1H -NMR όσο και στο φάσμα δυο διαστάσεων HMBC. Η συγκεκριμένη ιονισμένη μορφή της αλλαντοΐνης έχει ξαναπεριγραφεί εν μέρει με φασματοσκοπία NMR μόνο με ^{13}C -NMR. (Kahn et al., 1997), αλλά δεν έχει απομονωθεί ξανά από τη βλέννα του σαλιγκαριού, ούτε έχει ξαναπεριγραφεί σε φυσική μορφή από κάποια άλλη φυσική πρώτη ύλη. Πρέπει να σημειωθεί ότι ένα μόριο με παρόμοια φασματοσκοπικά δεδομένα έχει ξαναπεριγραφεί από τους Shubashini et al., οι οποίοι το απομόνωσαν από το φυτό *Pisonia grandis*, αλλά η δομή έχει αποδοθεί σε ένα άγνωστο ισομερές αλλαντοΐνης. (Shubashini et al., 2011)



Απόδοση δομής

ΠΡΩΤΟΝΙΟ	ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΟΛΟΚΛΗΡΩΣΗ	ΣΤΑΘΕΡΑ ΣΥΖΕΥΞΗΣ J (Hz)
H-4	5.24	d	1H	8.31
H-8	5.84	s	2H	-
H-6	7.03	d	1H	8.31
H-3	8.04	s	1H	-
H-1	10.50	br s	1H	-

ΑΝΘΡΑΚΑΣ	ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (ppm)
C-4	62.86
C-2	157.24
C-7	157.94
C-5	174.09

8.5 ΈΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΓΛΥΚΟΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΕ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ 4000 MG/L ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR

Βασιζόμενοι στο άρθρο EL. Mubarak *et al.* πραγματοποιήθηκε έλεγχος ύπαρξης γλυκολικού οξέος σε περιεκτικότητα 4000 mg/L, και αν αυτή η ποσότητα είναι ορατή στο φάσμα NMR ^1H . Ογκομετρήθηκαν, λοιπόν, 10 ml βλέννας σαλιγκαριού στα οποία προστέθηκαν 40 mg προτύπου γλυκολικού οξέος και το μίγμα εξατμίστηκε. Παράλληλα, ογκομετρήθηκαν και εξατμίστηκαν 10 ml βλέννας χωρίς να προστεθεί σε αυτά γλυκολικό οξύ. Στην συνέχεια πάρθηκαν φάσματα και για τα δύο δείγματα σε δευτεριωμένο νερό D_2O τα οποία φαίνονται παρακάτω.

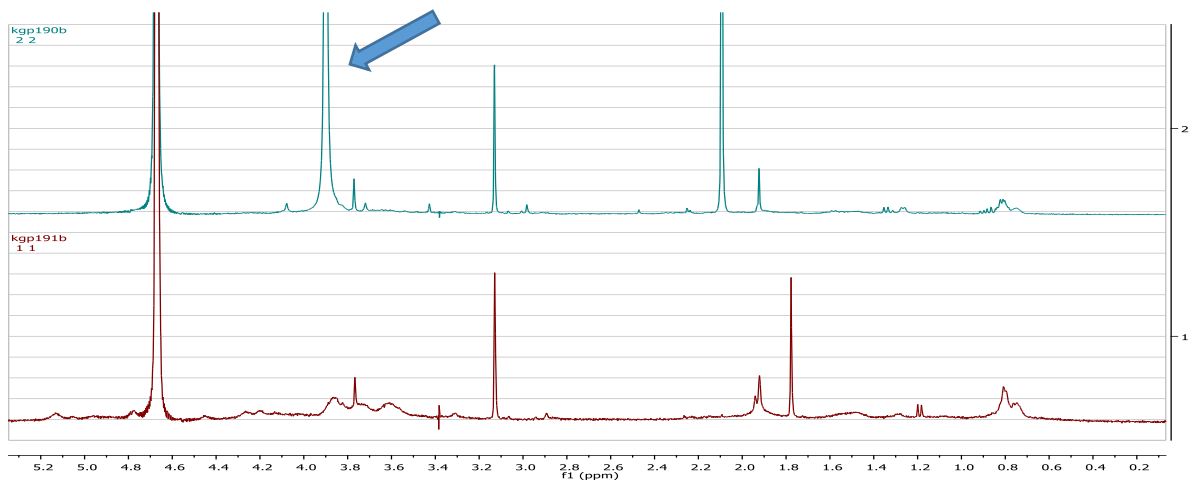


Figure 30: Σύγκριση φασμάτων χωρίς και με προσθήκη γνωστής ποσότητας γλυκολικού οξέος σε ίση ποσότητα βλέννας

Στο φάσμα ^1H -NMR του δείγματος από πάνω φαίνεται το δείγμα στο οποίο έχει προστεθεί πρότυπο γλυκολικό οξύ, ενώ από κάτω είναι το φάσμα του αρχικού δείγματος χωρίς προσθήκη γλυκολικού. Στο φάσμα που προστέθηκε πρότυπο γλυκολικό οξύ φαίνεται ξεκάθαρα μία κορυφή στα 3.85 ppm, η οποία στο δείγμα που δεν έγινε προσθήκη δεν υπάρχει. Έτσι, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι δεν μπορεί να υπάρχει γλυκολικό οξύ σε περιεκτικότητα 4000 mg/L στην βλέννα, όπως αναφέρουν οι El Mubarak *et al.*, εφόσον η προστιθέμενη ποσότητα γλυκολικού παρέμεινε αναλλοίωτη κατά την κατεργασία του δείγματος.

8.6 ΈΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΓΛΥΚΟΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Βασιζόμενοι στο άρθρο H.Harry Yao *et al.* 1996 αποφασίσαμε να προχωρήσουμε σε έλεγχο ύπαρξης του γλυκολικού οξέος στη βλέννα σαλιγκαριού μέσω GC-MS με τη βοήθεια σιλυλίωσης με το αντιδραστήριο N,O-τριμεθυλοσιλυλοτριφθοροακεταμίδιο (BSTFA) μαζί με τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (TMCS, 10 ml/L). Η μέθοδος αναπτύχθηκε σε αέριο χρωματογράφο Hewlett – Packard 6890-5973, με στήλη HP-5 MS (DB-5) 30 m * 0.25 mm και πάχος μεμβράνης 0.25 μm συνδεδεμένο με φασματογράφο μάζας. Η μέθοδος που ακολουθήσαμε διαρκεί συνολικά 20 min, με ροή 2.0 ml/min, θερμοκρασία εκκίνησης 73 °C στους οποίους παραμένει για 6.5 min και ανεβαίνει στους 280 °C με ρυθμό 25 °C/min. Για τον πλήρη καθαρισμό της στήλης από τα σιλυλιωμένα παράγωγα η στήλη πρέπει να θερμανθεί στο 300 °C για 5 min. (Yao and Porter, 1996)

Αρχικά λοιπόν, κάναμε ένεση στο GC-MS 0,5 mg πρότυπου γλυκολικού οξέος (GA) σιλυλιωμένου διαλύοντάς τα σε 80 μl διαλύματος BSTFA/ TMCS 99:1 και είδαμε ότι ο χρόνος ανάσχεσης του είναι $t_r = 8.80$ sec.

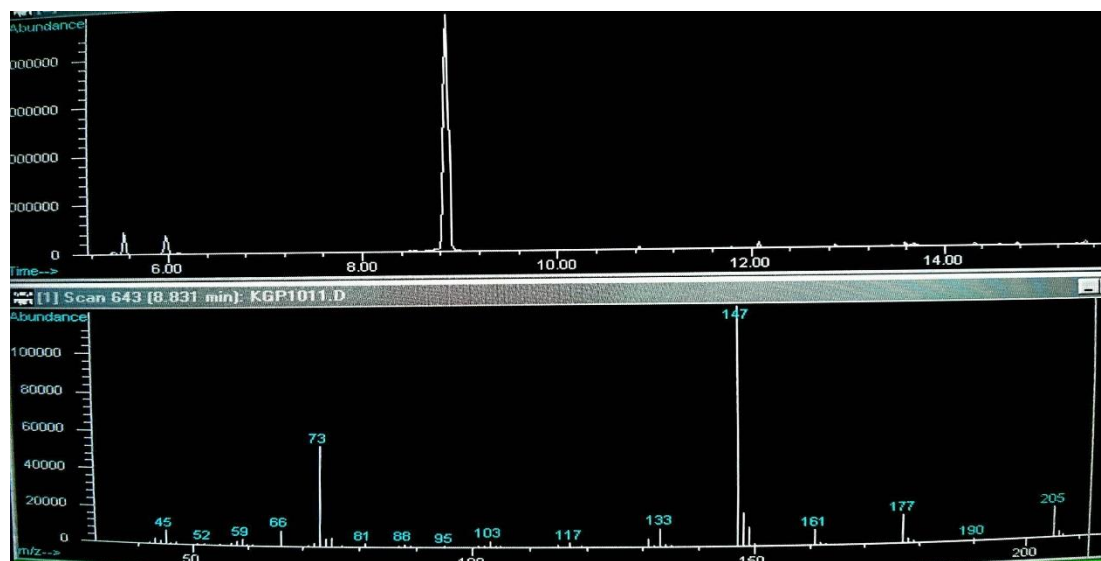


Figure 31: Χρωματογράφημα και φάσμα μάζας γλυκολικού οξέος

Στη συνέχεια, προχωρήσαμε με 10 mg μεθανολικού εκχυλίσματος βλέννας με σιλυλίωση με την ίδια μέθοδο όπως παραπάνω. Παρατηρήσαμε τελικά ότι υπάρχει και στο εκχύλισμα βλέννας μια πολύ μικρή κορυφή στο χρωματογράφημα σε χρόνο έκλουσης 8.808 min, που αντιστοιχεί στο γλυκολικό οξύ, όπως φαίνεται στα παρακάτω χρωματογραφήματα.

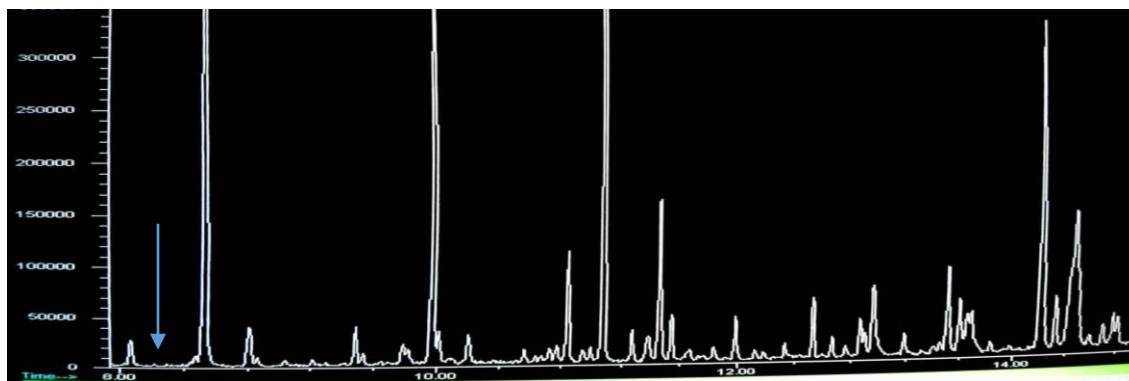


Figure 32: Χρωματογράφημα μεθανολικού εκχυλίσματος βλέννας στο GC

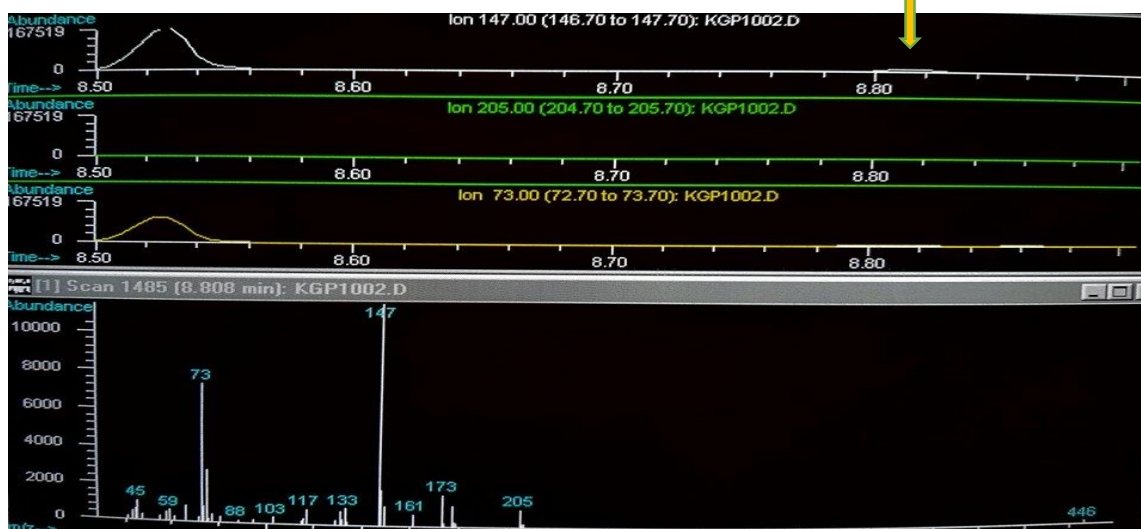


Figure 33: Κορυφή γλυκολικού οξέος στο μεθανολικό εκχύλισμα-Φάσμα μάζας γλυκολικού οξέος

Όπως έχουμε αναφερθεί και στην εισαγωγή, οι El Mubarak *et al.* ανέπτυξαν μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού του γλυκολικού οξέος στη βλέννα σαλιγκαριού με HPLC. Συμφωνα με μετρήσεις που έχουν πραγματοποιηθεί με τη μέθοδο αυτή σε φυσική βλέννα σαλιγκαριού *Helix aspersa*, φαίνεται ότι το γλυκολικό οξύ υπάρχει στη βλέννα σε περιεκτικότητα 3750 mg/L. Ωστόσο από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η κορυφή που εμφανίζεται στο μεθανολικό εκχύλισμα της βλέννας σαλιγκαριού είναι μέχρι και 100 φορές μικρότερη από την κορυφή του πρότυπου γλυκολικού οξέος, το οποίο περιείχε 0,5 mg ουσίας. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τη ποσότητα γλυκολικού οξέος που έχει μετρηθεί με την HPLC, γι'αυτό είναι αναγκαία η ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού με το GC. Επίσης, με σκοπό να ελέγξουμε αν κάποιο άλλο προϊόν περιέχει γλυκολικό οξύ στις ποσότητες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία, προμήθευτήκαμε από το εμπόριο έναν ορό βλέννας σαλιγκαριού (της εταιρείας Ag pharm) και ακολουθήσαμε την ίδια μέθοδο ανάλυσης όπως παραπάνω. Στο χρωματογράφημα που προέκυψε αλλά και στο φάσμα NMR δεν υπήρχε καθόλου η κορυφή γλυκολικού οξέος, γεγονός που αποδεικνύει ότι το γλυκολικό οξύ δεν υπάρχει στη βλέννα σαλιγκαριού ή περιέχεται σε ίχνη.

8.7 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Όπως φαίνεται παρακάτω στο χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος υπάρχουν αρκετές ουσίες που εκλούνται με την συγκεκριμένη μέθοδο και δίνουν κορυφές σε εύρος χρόνου από 8 min έως 14 min. Με σκοπό να ταυτοποιήσουμε ποιές από αυτές τις ουσίες προέρχονται από το υλικό μας και ποιές είναι προσμίξεις ή ουσίες του αντιδραστηρίου, συγκρίναμε το χρωματογράφημα του πρότυπου γλυκολικού οξέος με το χρωματογράφημα του μεθανολικού εκχυλίσματος βλέννας σαλιγκαριού *Helix aspersa*. Ετσι, ταυτοποιήσαμε αρκετές κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στις ενώσεις που φαίνονται στον πίνακα παρακάτω. Μάλιστα, σε χρόνο 11.271 min εκλούστηκε η L- ισολευκίνη, την οποία είχαμε απομονώσει και από την στήλη, ενώ μια κορυφή στα 8.523 min αντιστοιχεί στο γαλακτικό οξύ, του οποίου την ύπαρξη έχουμε ταυτοποιήσει και με την φασματοσκοπία NMR, όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

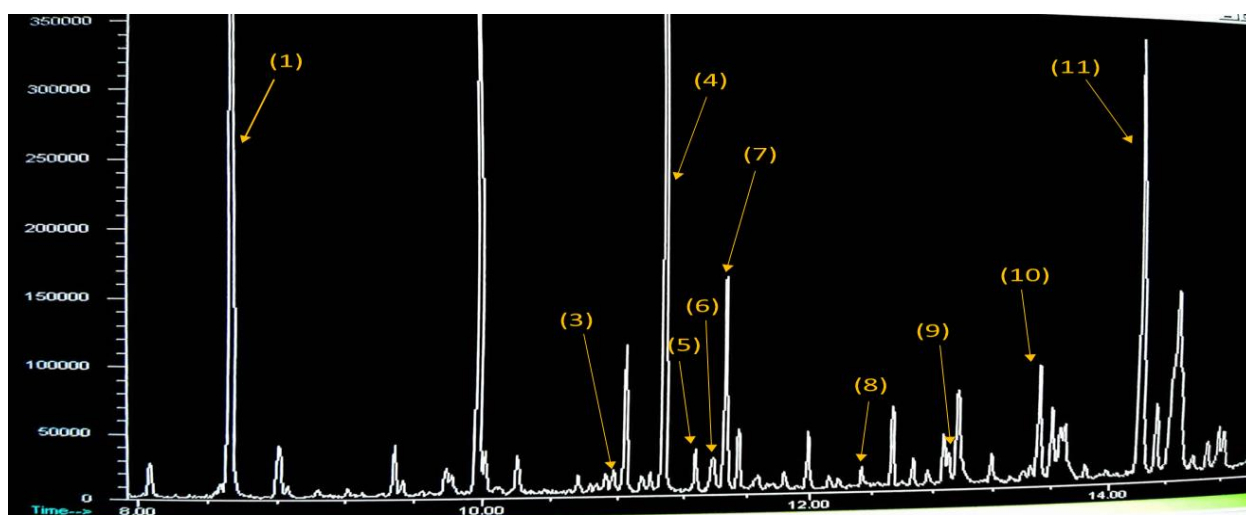
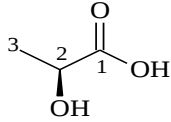
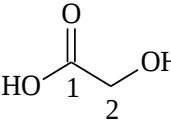
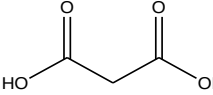
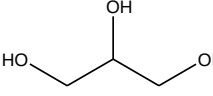
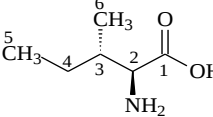
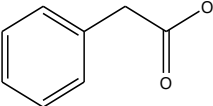
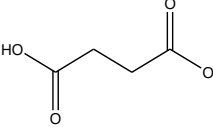
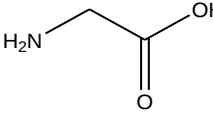
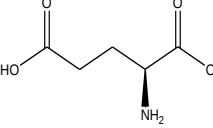
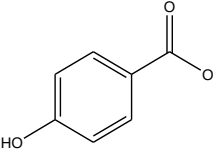
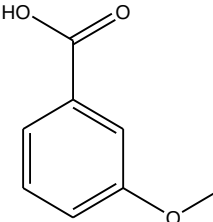


Table 6: Πίνακας ουσιών ανιχνεύσιμων με το GC-MS

No	Χρόνος έκλουσης t_r (min)	Όνομα χημικής ένωσης	Δομές
1	8.523	Lactic acid	
2	8.808	Glycolic acid	
3	10.782	Malonic acid	
4	11.084	Glycerin	
5	11.271	L- isoleucine	
6	11.381	Phenylacetic acid	
7	11.457	Succinic acid	
8	12.330	Glycine	
9	12.907	L-glutamic acid	
10	13.500	4-Hydroxybenzoic acid	
11	14.211	m-anisic acid	

(1) Γαλακτικό οξύ (Lactic acid): Το γαλακτικό οξύ ανήκει στα α-υδροξυοξέα καθώς διαθέτει μια υδροξυλομάδα ενωμένη με άτομο άνθρακα που βρίσκεται δίπλα στην καρβοξυλομάδα του. Το όνομα του κατά IUPAC είναι 2-υδροξυπροπανικό οξύ, είναι αναμείξιμο με νερό και αιθανόλη και είναι μια αρκετά υγροσκοπική ουσία. Στη βιομηχανία το γαλακτικό οξύ είναι αποτέλεσμα ζύμωσης ειδικών βακτηρίων τα οποία μετατρέπουν τη γλυκόζη και τη σουκρόζη σε γαλακτικό οξύ, ενώ στον άνθρωπο αλλά και στα ζώα παράγεται στους μυς όταν εργάζονται. Τέλος, ως α-υδροξυοξύ διαθέτει πολλές ευεργετικές ιδιότητες για το δέρμα, όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή. (Green et al., 2009)

(3) Μηλονικό οξύ (Malonic acid): Το μηλονικό οξύ είναι ένα δικαρβοξυλικό οξύ και έχει μορφή λευκών κρυστάλλων. Η μοριακή του μάζα είναι 104.06 g/mol και είναι καλά διαλυτό στο νερό. (Pubchem, n.d.)

(4) Γλυκερίνη: Η γλυκερίνη είναι μια ευρέως γνωστή οργανική ένωση με χημικό όνομα προπανοτριόλη, καθώς αποτελείται από τρεις άνθρακες οι οποίοι συνδέονται με μια υδροξυλομάδα ο καθένας. Σε θερμοκρασία δωματίου είναι ημίρρευστη, αναμιγνύεται καλά με νερό και αιθυλική αλκόολη, ενώ διαλύεται σε ακετόνη. Τέλος, η γλυκερίνη έχει μεγάλο εύρος χρήσεων καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης, ως μέσω διαβροχής, ως πλαστικοποιητής και ως πρώτη ύλη σε πολλά φάρμακα και καλλυντικά. ("Viscosity of Glycerol and Its Aqueous Solutions - Industrial & Engineering Chemistry (ACS Publications)," n.d.)

(5) Φαινυλαιθανικό οξύ (Phenylacetic acid): Το φαινυλαιθανικό οξύ ή φαινυλοξικό οξύ ή α-τουλοϊκό οξύ είναι ένα αρωματικό καρβοξυλικό οξύ και έχει μορφή άχρωμου κρυσταλλικού στερεού. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι αποτελεί ένα τύπο φυτικής ορμόνης (αυξίνη) και ότι υπάρχει κυρίως στους καρπούς των φυτών. (Wightman and Lighty, 1982)

(6) Σουκινικό οξύ (Succinic acid): Το σουκινικό οξύ ή ηλεκτρικό οξύ είναι ένα φυσικό οργανικό δικαρβοξυλικό οξύ με τέσσερα άτομα άνθρακα. Ανακαλύφθηκε το 1546 από τον Georgius Agricola, γερμανικό χημικό που τον καθαρίζει από κεχριμπάρι με ξηρή απόσταξη. Έχει βρεθεί σε πολλά φυτικά είδη, όπως φρούτα και λαχανικά και στο ήλεκτρο (κεχριμπάρι) από όπου πήρε και το όνομα του, αλλά ανευρίσκεται και σε ζωικούς ιστούς και στο αίμα. Τέλος, έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και θεωρείται φυσικό αντιβιοτικό. (Mills and O'Neill, 2014; Tretter et al., 2016)

(7) Γλυκίνη: Η γλυκίνη είναι το απλούστερο και το μοναδικό μη χειρόμορφο αμινοξύ. Σε κανονικές συνθήκες περιβάλλοντος είναι άχρωμο κρυσταλλικό στερεό, ενώ αποτελεί το 35% της δομής του κολλαγόνου. Στη φύση ελεύθερη εντοπίζεται στους κατώτερους ζωικούς οργανισμούς ως συστατικό της χολής ή των ούρων, ενώ εκτός από τη φυσιολογική του λειτουργία στον οργανισμό ως

βιοσυνθετικό ενδιάμεσο και νευροδιαβιβαστή, στις ΗΠΑ χρησιμοποιείται και ως γλυκαντική ουσία. (Pubchem, n.d.) Τέλος, παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό σημαντικές για τον οργανισμό ενώσεων συμπεριλαμβανομένων πουρίνων, κρεατίνης, γλουταθειόνη κ.α. (Gersovitz et al., 1980)

(8) L- Γλουταμινικό οξύ: Το γλουταμινικό οξύ ή το 2-αμινοπεντανοϊκό οξύ είναι ένα από τα 22 μη απαραίτητα αμινοξέα. Αποτελεί στον οργανισμό έναν από τους κυριώτερους νευροδιαβιβαστές και παίζει σημαντικό ρόλο στη μνήμη και στη μάθηση. Υπάρχει μέσα σε πολλές τροφές αν και το μαγείρεμα το καταστρέφει, αλλά οι ξηροί καρποί, το σπανάκι και ο μαϊντανός είναι καλές πηγές. Χρησιμοποιείται ευρέως στη τεχνολογία τροφίμων ως ενισχυτικό γεύσης, ενώ τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής για τη βελτίωση της εγκεφαλικής λειτουργίας και του ανοσοποιητικού. (Meldrum, 2000)

(9) 4-Υδροξυβενζοϊκό οξύ: Ονομάζεται και p- υδροξυβενζοϊκό οξύ και αποτελεί φαινολικό παράγωγο βενζοϊκού οξέος. Είναι λευκό κρυσταλλικό στερεό λίγο διαλυτό στο νερό και πιο καλα διαλυτό σε πολικού οργανικούς διαλύτες όπως ακετόνη. Έχει βρεθεί σε φυτά του γένους *Vitex* και στο *Hypericum perforatum* και στο έλαιο Αζαί, που προέρχεται από τον καρπό του φυτού *Euterpe oleracea*, ενώ υπάρχει και στο *Spongiochloris spongiosa*, μια πράσινη άλγη του γλυκού νερού. Οι εστέρες του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος είναι τα γνωστά parabens, τα οποία χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά και σε κάποια οφθαλμικά διαλύματα. (Onofrejoná et al., 2010)

(10) 3-μεθοξυβενζοϊκό οξύ: Είναι γνωστό και ως m-anisic acid και είναι ένα από τα τρία ισομερή του ανισικού οξέος. Έχει απομονωθεί από το φυτό *Pimpinella anisum* και χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό γεύσης σε τρόφιμα αλλά και ως συντηρητικό σε πολλά καλλυντικά σκευάσματα. (Silva et al., 2015)

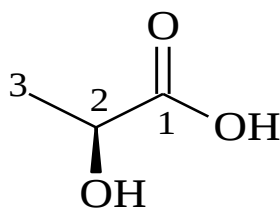
Συγκεφαλαιώνοντας, η ανάλυση με αέρια χρωματογραφία μας έδωσε αρκετές πληροφορίες για ουσίες που περιέχονται στο μεθανολικό εκχύλισμα βλέννας σαλιγκαριού *Helix aspersa*, οι οποίες με τη φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού NMR δεν φαίνονται, κυρίως λόγω της μικρότερης ευαισθησίας του οργάνου. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η τριμεθυλογλυκίνη δεν είναι ανιχνεύσιμη ούτε με το GC ούτε με HPLC, με βάση τη μέθοδο ανάλυσης των El Mubarak et al., παρ'ότι είναι το κυρίαρχο συστατικό της βλέννας, αλλά είναι ανιχνεύσιμη μόνο με τη φασματοσκοπία NMR, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

8.8 ΈΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΟΞΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Σε όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά από την αρχή της πειραματικής διαδικασίας, ήταν εμφανής μία διπλή κορυφή στα 1.2 ppm και μια μεγάλη μονή κορυφή σε δ 1.8. Η κορυφές αυτές, άλλες φορές ήταν μεγαλύτερες και άλλες μικρότερες, ανάλογα με το δείγμα. Μελετώντας τη βιβλιογραφία, η διπλή κορυφή στα 1.2 ppm μαζί με μία τετραπλή στα 4.4 ppm αντιστοιχούν στο γαλακτικό οξύ (Ramanjooloo *et al.*, 2009), ενώ η μονή κορυφή στα 1.8 ppm αντιστοιχεί στο μεθύλιο του οξικού οξέος. (Fulmer *et al.*, 2010)

Επειδή η απομόνωση και ταυτοποίηση τόσο μικρών μορίων από τόσο πολύπλοκα μίγματα είναι αρκετά δύσκολη και πολλές φορές αδύνατη, αποφασίσαμε να κάνουμε ταυτοποίηση της κάθε ουσίας προσθέτοντας πρότυπη ουσία στο δείγμα και ελέγχοντας αν αυξάνεται κάποια κορυφή. Επιλέχθηκε λοιπόν ένα δείγμα βλέννας από το είδος *Helix aspersa muller*, στο οποίο μετά από φασματοσκοπικό έλεγχο φάνηκε ότι περιέχει όλες τις κορυφές που μας ενδιαφέρουν, ώστε να είναι εύκολη η παρατήρηση της μεταβολής του ύψους τους. Αρχικά, πήραμε 1μL πρότυπου γαλακτικού οξέος και αραιώθηκε σε 40μL δευτεριωμένο νερό. Από αυτό το διάλυμα πήραμε 1μL και προστέθηκε απευθείας στο αρχικό σωληνάκι του NMR και πάρθηκε φάσμα. Στη συνέχεια, προστεθηκε αντίστοιχη ποσότητα πρότυπου οξικού οξέος και ξαναπάρθηκε φάσμα NMR. Τα φάσματα πριν και μετά την προσθήκη ουσίας φαίνεται παρακάτω. Με κόκκινο χρώμα είναι το φάσμα του δείγματος πριν την προσθήκη γαλακτικού οξέος και με μπλέ είναι το φάσμα μετά την προσθήκη.

7.3.1.1 Γαλακτικό οξύ



Στο δείγμα στο οποίο προστέθηκε το γαλακτικό οξύ παρατηρούμε ότι ενώ όλα τα υπόλοιπα συστατικά παραμένουν σταθερά, η διπλή κορυφή στα 1.2 ppm και η τετραπλή στα 4.00 ppm αυξάνονται. Επίσης, εμφανίζεται μια πολλαπλή κουφή σε δ 1.32 που συμφωνά με το άρθρο των Ramanjooloo *et al.* 2009, αντιστοιχεί σε ολιγομερή που υπάρχουν στο πρότυπο γαλακτικό οξύ. Αυτό αποτελεί απόδειξη ύπαρξης του γαλακτικού οξέος στη βλέννα και αντιστοιχεί στην διπλή κορυφή στα 1.2 ppm. Συγκεκριμένα, αυτή η διπλη κορυφή αντιστοιχεί στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια του C-3, τα οποία δεν εμφανίζουν σύζευξη μεταξύ τους αλλά συζεύγνυνται με το πρωτόνιο του C-2 και δίνουν σήμα με διπλή κορυφή με $J = 7.26$ Hz. Τέλος, το πρωτόνιο του C-2 συζεύγνυται με τα τρία διπλανά πρωτόνια του C-3 και έτσι εμφανίζει τετραπλή κορυφή.

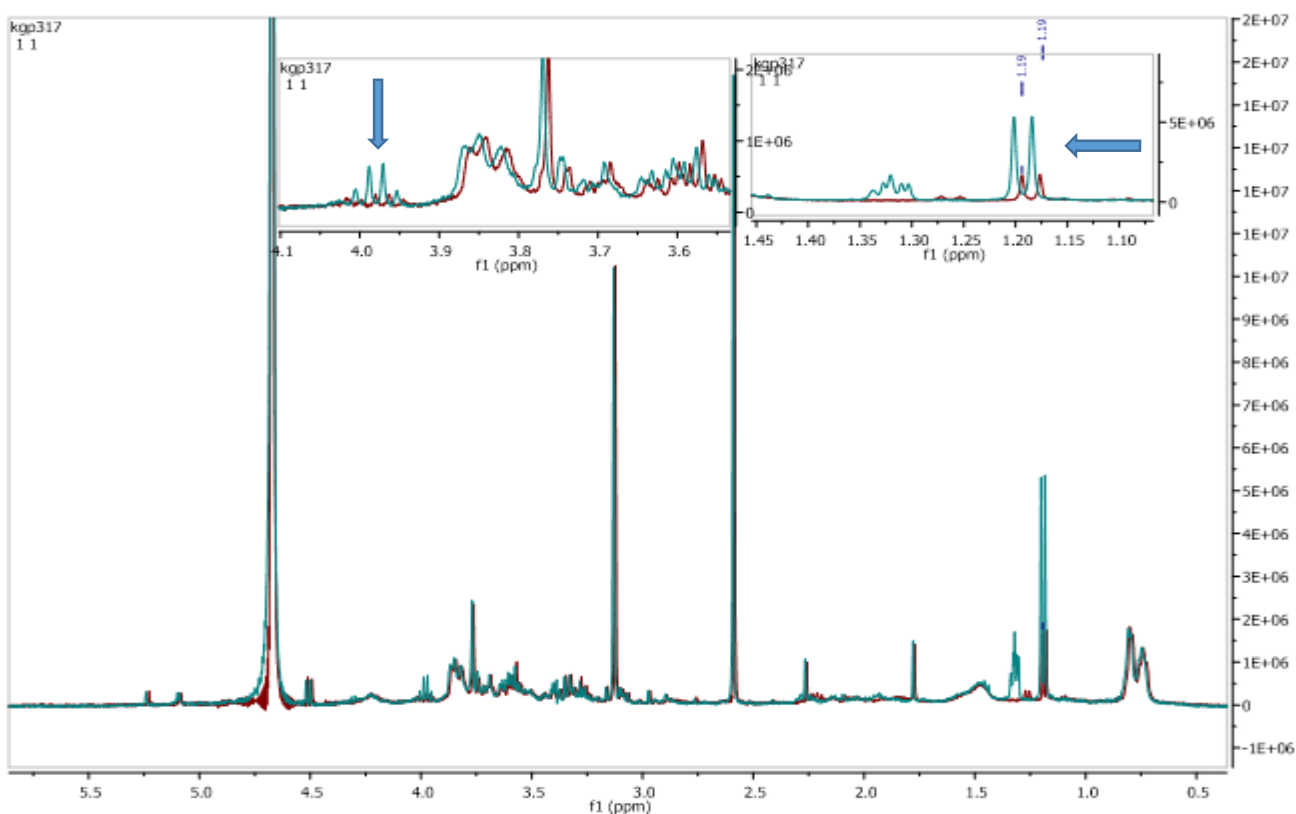


Figure 34: Φάσματα ^1H -NMR πριν και μετά τη προσθήκη γαλακτικού οξέος

7.3.1.2 Οξικό οξύ

Μετά την προσθήκη πρότυπου γαλακτικού οξέος πραγματοποιήθηκε και προσθήκη οξικού οξέος. Τα φάσματα πριν και μετά την προσθήκη φαίνονται παρακάτω, στα οποία είναι ξεκάθαρη η αύξηση της μονής κορυφής στα 1.8 ppm, η οποία αντιστοιχεί στα τρία πρωτόνια του μεθυλίου του οξικού οξέος. Αύτη η αύξηση του ύψους της κορυφής αποτελεί απόδειξη της ύπαρξης οξικού οξέος στη βλέννα του σαλιγκαριού.

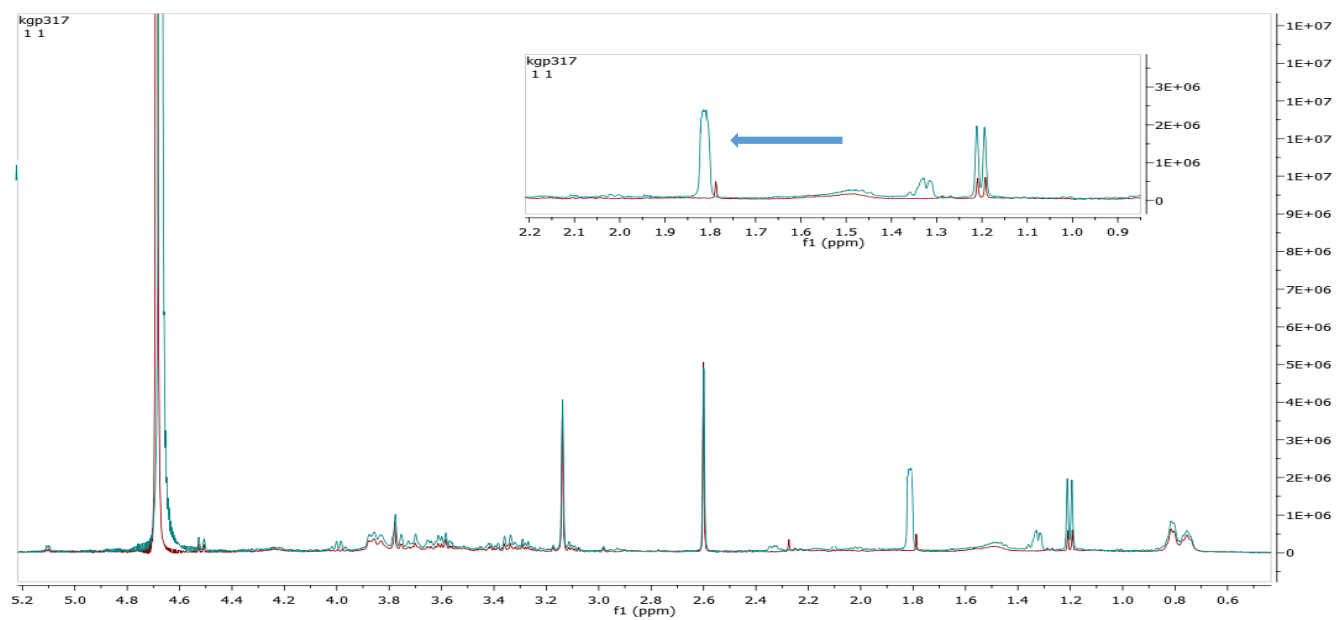


Figure 35: Φάσμα ^1H -NMR πριν και μετά τη προσθήκη οξικού οξέος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

9.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ

Η μέθοδος εσωτερικού προτύπου είναι μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται ευρέως στην ποσοτικοποίηση ουσιών με τεχνικές όπως HPLC, GC, NMR κ.ά. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται όταν υπάρχουν μεταβολές στην ευαισθησία από μέτρηση σε μέτρηση, όπως συμβαίνει στην εκχύλιση του αναλύτη. Πολύ σημαντικό στάδιο της μεθόδου αυτής είναι η επιλογή του καταλληλότερου εσωτερικού προτύπου. Το εσωτερικό πρότυπο για να χρησιμοποιηθεί σωστά σε μία μέθοδο ποσοτικοποίησης θα πρέπει να διαθέτει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Να μην αντιδρά με την ουσία που θέλουμε να μετρήσουμε, αναλύτης
- Να είναι διαλύτο στο μέσο που χρησιμοποιούμε
- Να αποκρίνεται στην μέθοδο με τον ίδιο τρόπο όπως ο αναλύτης
- Να μετράται ανεξάρτητα από τον αναλύτη χωρίς να επηρεάζει το σήμα του

Η γενική μεθοδολογία που χρησιμοποιείται στην μέθοδο αυτή βασίζεται στην παρασκευή προτύπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης, στα οποία προστίθεται ΊΔΙΑ συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου, όμοια με αυτή που θα προστεθεί και στο άγνωστο δείγμα. Τέλος, η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου επιλέγεται έτσι, ώστε το σήμα του να είναι παρόμοιου μεγέθους με τα αναμενόμενα άγνωστα.

9.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΡΙΜΕΘΥΛΟΓΛΥΚΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΙΟΝΙΣΜΕΝΗΣ ΑΛΛΑΝΤΟΪΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ NMR

9.2.1 Φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (NMR)

Η Φασματοσκοπία είναι μία τεχνική ανάλυσης της δομής των μορίων, η οποία συνήθως βασίζεται σε διαφορές του τρόπου με τον οποίο αυτά απορροφούν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Ένας από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους τύπους φασματοσκοπίας είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Αρχή Μεθόδου

Ο Πυρηνικός μαγνητικός Συντονισμός (NMR) είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου, διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο και κατά την αποδιέγερση τους δίνουν σήμα. Κάποιοι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο NMR και άλλοι όχι. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανakλώνται στην ιδιότητα του σπιν, δηλαδή της περιστροφής των σωματιδίων γύρω από τον άξονα τους. Οι πιο συχνά μελετούμενοι πυρήνες με το NMR είναι του ^1H , ^{13}C και του ^{14}N . Τα φάσματα πρωτονίου και άνθρακα είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα για την εύρεση δομής μικρών και μεγάλων μορίων. Επίσης, από το φάσμα πρωτονίου, μέσω των χημικών μετατοπίσεων, είναι δυνατόν να πάρουμε πληροφορίες για τις ποσοτικές σχέσεις των πρωτονίων μέσα στο ίδιο ή σε διαφορετικά μόρια. Αυτό επιτυγχάνεται με την ολοκλήρωση των κορυφών στις μετατοπίσεις που μας ενδιαφέρουν. Η αναλογία ολοκλήρωσης των κορυφών ενός μορίου, αντιστοιχεί στην αναλογία των πρωτονίων που αντιστοιχούν στις κορυφές αυτές. Όμως, όταν αναφερόμαστε σε ολοκλήρωση κορυφών δύο διαφορετικών μορίων, τότε η αναλογία των κορυφών σχετίζεται με τις συγκεντρώσεις των δύο μορίων σε ένα διάλυμα.

9.2.2 Ανάπτυξη καμπύλης αναφοράς τριμεθυλογλυκίνης

Το γεγονός ότι η τριμεθυλογλυκίνη είναι η ουσία που υπήρχει σε όλα τα δείγματα που αναλύσαμε, κατέστησε αναγκαίο τον ποσοτικό προσδιορισμό της με φασματοσκοπία NMR. Προχωρήσαμε λοιπόν σε ανάπτυξη καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο εσωτερικού προτύπου που αναλύθηκε παραπάνω. Η ουσία που μελετάται είναι πολύ καλά διαλύτη τόσο σε μεθανόλη όσο και σε νερό, ωστόσο στη μεθανόλη η κορυφή των τριών μεθυλίων (δ 3.1) βρίσκεται πολύ κοντά στην κορυφή της μεθανόλης, με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολη η ακριβής ολοκλήρωσή της. Έτσι, αποφασίστηκε να αναπτύξουμε την μέθοδο ποσοτικοποίησης σε δευτεριωμένο νερό (D_2O).

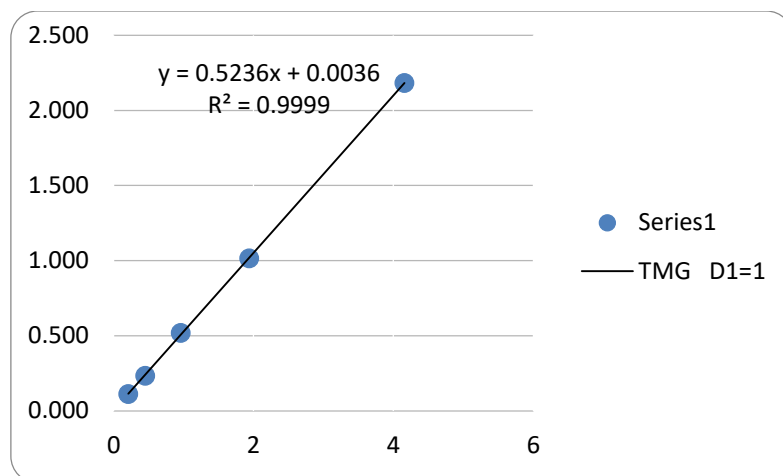
Εσωτερικό Πρότυπο

Η επιλογή εσωτερικού προτύπου για την ανάπτυξη της καμπύλης ήταν αρκετά δύσκολη, καθώς έπρεπε να βρεθεί ουσία διαλυτή σε νερό, μικρού μοριακού βάρους και παρόμοιας δομής με την τριμεθυλογλυκίνη. Αρχικά, δοκιμάστηκε το 4-dimethylaminopyridine, γνωστό ως DMAP, ωστόσο παρατηρήθηκε ότι η ουσία αυτή έχει κάποια επίδραση στα μεθύλια της τριμεθυλογλυκίνης και έτσι θεωρήθηκε ακατάλληλη. Έτσι, καταλήξαμε ότι το μη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) είναι καταλληλότερο ως εσωτερικό πρότυπο. Μετά από δοκιμές καταλήξαμε ότι το DMSO πρέπει να είναι αραιωμένο σε δευτεριωμένο νερό (D₂O) με περιεκτικότητα 0,2% w/w. Ζυγίστηκαν λοιπόν 13,4 mg DMSO και αραιώθηκαν σε 602,4 mg δευτεριωμένου νερού. Από αυτή την ποσότητα πήραμε 60.3 mg και αραιώθηκαν σε 605,1 mg D₂O.

Αρχή Μεθόδου

Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν 400, 200, 100, 50 και 20 μg τριμεθυλογλυκίνης σε νερό. Στα διαλύματα αυτά πραγματοποιήθηκε η διαδικασία εκχύλισης με ακετονιτρίλιο, που ακολουθούμε στη βλέννα και στο τελευταίο στάδιο μετά την εξάτμιση προστέθηκε κάθε φορά συγκεκριμένη ποσότητα του εσωτερικού προτύπου μη δευτεριωμένου DMSO, που παρασκευάστηκε παραπάνω, σε εύρος 50-70 mg. Έπειτα τα διαλύματα μετρήθηκαν σε NMR 400 MHz με D1=1 sec και D1=5 sec και με την σύγκριση των κορυφών TMG (δ 3.1) και DMSO (δ 2.6) προέκυψε η καμπύλη. Η εξίσωση που προέκυψε είναι της μορφής $y = ax + b$ όπου $y = \text{TMG/DMSO}$ και $x = \text{Ολοκλήρωση}$

TMG (μg)	TMG (mmol)	Ποσοτητα Εσωτερικού Προτύπου DMSO+D ₂ O (mg)	DMSO (mg)	DMSO (mmol)	Ολοκλη- ρώσεις (D1=1)	Ολοκλη- ρώσεις (D1=5)	TMG/DMSO
400	0.0034	62.0	0.122	0.0016	4.16	2.98	2.182
200	0.0017	66.7	0.132	0.0017	1.94	1.42	1.014
100	0.0009	65.3	0.129	0.0016	0.96	0.73	0.518
50	0.0004	72.4	0.143	0.0018	0.45	0.33	0.234
20	0.0002	60.2	0.119	0.0015	0.21	0.15	0.112



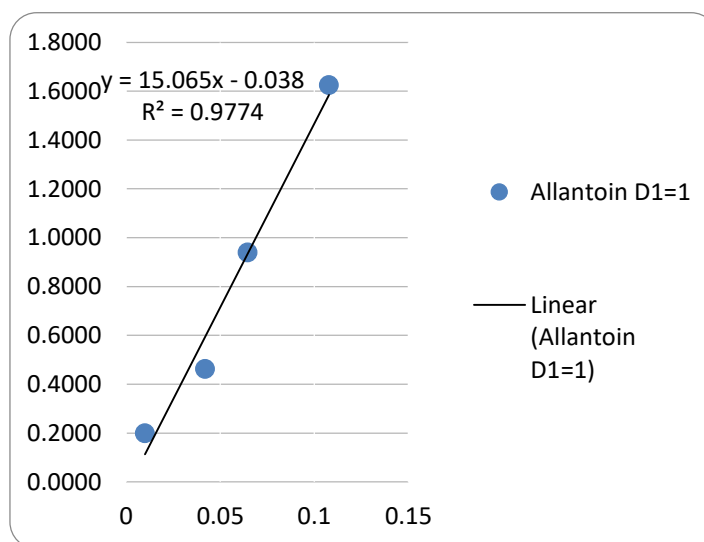
9.2.3 Ανάπτυξη καμπύλης αναφοράς της ιονισμένης μορφής της αλλαντοΐνης

Όπως αναφέραμε και παραπάνω, η αλλαντοΐνη προστιθέμενη στη βλέννα μετατρέπεται στην ιονισμένη της μορφή. Θεωρήσαμε λοιπόν ότι η μορφή αυτή της αλλαντοΐνης θα έχει παρόμοιες βιολογικές ιδιότητες με αυτές της μη ιονισμένης και έτσι η ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικοποίησης του ήταν αναγκαία. Η συγκεκριμένη ουσία είναι διαλυτή στο νερό, όπως και η τριμεθυλογλυκίνη, έτσι αποφασίσαμε να προχωρήσουμε σε ανάπτυξη καμπύλης αναφοράς με την μέθοδο εσωτερικού προτύπου σε νερό, μετρώντας τη κορυφή που εμφανίζει στο φάσμα NMR στα 5.26 ppm. Επιλέχθηκε ως εσωτερικό πρότυπο μη δευτεριωμένο DMSO αραιωμένο σε δευτεριωμένο νερό στην ίδια περιεκτικότητα όπως και στη τριμεθυλογλυκίνη, ώστε να μπορεί να γίνει σε ένα δείγμα ταυτόχρονη μέτρηση και των δυο ουσιών.

Αρχή Μεθόδου

Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν 400, 200, 100 και 50 μg πρότυπης αλλαντοΐνης σε νερό. Αρχικά ακολουθήθηκε η διαδικασία επεξεργασίας με ακετονιτρίλιο, όπως πραγματοποιείται και στα άγνωστα δείγματα, και στο τελευταίο στάδιο προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα εσωτερικού προτύπου, σε εύρος 50-60 mg. Τέλος, τα διαλύματα μετρήθηκαν σε NMR 400 MHz με $D1=1$ sec και $D1=5$ sec και με την σύγκριση των κορυφών αλλαντοΐνης (δ 5.2) και DMSO (δ 2.6) προέκυψε η καμπύλη. Η εξίσωση που προέκυψε είναι της μορφής $y = ax + b$ όπου y = αλλαντοΐνη/DMSO και x = Ολοκλήρωση

Αλλαντοΐνη (μg)	Αλλαντοΐνη (mmol)	Ποσότητα εσωτερικού προτύπου DMSO+D ₂ O (mg)	DMSO (mg)	DMSO (mmol)	Ολοκληρώσεις d1=1	Ολοκληρώσεις d1=5	Αλλαντοΐνη/ DMSO
400	0.0025	60.4	0.122	0.0016	0.1077	0.13	1.6250
200	0.0013	52.2	0.105	0.0013	0.0646	0.08	0.9401
100	0.0006	53	0.107	0.0014	0.042	0.05	0.4630
50	0.0003	61.6	0.124	0.0016	0.01	0.02	0.1992



9.2.4 Μέτρηση τριμεθυλογλυκίνης και της ιονισμένης μορφής της αλλαντοΐνης σε διάφορα είδη βλέννας

Στο σημείο αυτό αξίζει αναφερθούν δυο λόγια για τον τρόπο παραλαβής της βλέννας από τα σαλιγκάρια. Τα σαλιγκάρια εκτρέφονται αποκλειστικά γι' αυτό τον σκοπό σε ειδικούς χώρους με συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Η διαδικασία παραλαβής της βλέννας είναι αναίμακτη και τα σαλιγκάρια δεν πεθαίνουν. Αρχικά, διεγείρονται τεχνητά ώστε να αρχίσουν να παράγουν μεγάλες ποσότητες βλέννας και στην συνέχεια με ειδική αντλία η βλέννα συλλέγεται. Έπειτα, η βλέννα ομογενοποιείται ώστε να είναι εύκολα επεξεργάσιμη, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις

χρησιμοποιείται και νερό για να διευκολυνθεί η ομογενοποίηση. Τέλος, προστίθεται αντιβιοτικό και συντηρητικό για την αποφυγή ανάπτυξης μικροβίων και την καλύτερη δυνατή διατήρηση του προϊόντος. Προκειμένου να γίνει βελτιστοποίηση τόσο του τρόπου παραλαβής της βλέννας αλλά και της μετ' έπειτα επεξεργασίας, μελετήθηκε η μεταβολή της συγκέντρωσης της τριμεθυλογλυκίνης και της ιονισμένης αλλαντοΐνης σε διάφορα δείγματα, με σκοπό να καθοριστούν οι παράγοντες που τις επηρεάζουν. Έτσι, αφού αναπτύχθηκαν οι καμπύλες αναφοράς για την ποσοτικοποίηση της τριμεθυλογλυκίνης και της ιονισμένης αλλαντοΐνης, οι ουσίες μετρήθηκαν σε διάφορα είδη βλέννας, επεξεργασμένα ή μή. Επίσης, με σκοπό να γίνει σύγκριση των διαφόρων δειγμάτων αγοράσαμε από το εμπόριο έναν όρο βλέννας σαλιγκαριού της Ag pharm και πραγματοποιήθηκαν και σε αυτόν μετρήσεις. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

No	Κωδικός	ΔΕΙΓΜΑ	TMG (mg/L)	Ιονισμένη μορφή αλλαντοΐνης (mg/L)
1	KGP 278	<i>Helix aspersa muller</i> 07/2016	55.6	0
2	KGP 279	<i>Helix aspersa maxima</i> 07/2016	38.3	0
3	KGP 269	Μίγμα <i>muller-maxima</i> 07/2016	92.8	0
4	KGP 270	Επεξεργασμένη βλέννα (<i>muller-maxima</i>) πριν μορφοποιηθεί σε κρέμα	53.3	162.6
5	KGP 271	Βλέννα <i>muller-maxima</i> με αντιβιοτικό	32.5	281.8
6	KGP 272	Βλέννα <i>muller-maxima</i> μετά από διήθηση	36.7	301.4
7	KGP 276	Βλέννα <i>muller-maxima</i> μετά από ανάδευση	61.4	555.5
8	KGP 308	Ορός Ag pharm	6438.6	2575.2
9	KGP 299	Βλέννα <i>muller-maxima</i> από 29/03/2017 και μετά από φυγοκέντρηση	53.7	0
10	KGP 300	Βλέννα <i>muller-maxima</i> από 24/09/2014 με συντηρητικό και αντιβιότικο	65.4	500.2
11	KGP 305	Βλέννα <i>muller-maxima</i> ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΜΕΝΟ	68	0
12	KGP 306	Βλέννα <i>muller-maxima</i> ΜΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΜΕΝΟ	30.9	0
13	KGP 307	Βλέννα <i>muller-maxima</i> παραλαβή 9/04/2017- ΜΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΜΕΝΟ με αντιβιοτικό και συντητηρικό	53.3	155.1
14	KGP 310	<i>Helix aspersa muller</i> - 1η ομογενοποίηση (χωρίς νερό) 4/05/2017	109.6	1514
15	KGP 311	<i>Helix aspersa muller</i> - 2η ομογενοποίηση (χωρίς νερό) 4/05/2017	114.1	529.4

16	KGP 312	<i>Helix aspersa muller</i> - 3η ομογενοποίηση (χωρίς νερό) 4/05/2017	112.6	919.6
17	KGP 317	<i>Helix aspersa muller</i> 19/06/2017	98.3	77
18	KGP 318	<i>Helix aspersa maxima</i> 19/06/2017	70.7	328.0
19	KGP330	<i>Helix aspersa muller</i> - 2 ^η παραλαβή 12/09/2017	145.1	0
20	KGP331	<i>Helix aspersa maxima</i> -2 ^η παραλαβή 12/09/2017	117.3	0
21	KGP339	<i>Helix aspersa maxima</i> - 3 ^η παραλαβή 06/10/2017	52.3	0

Συμπεράσματα για την συγκέντρωση τριμεθυλογλυκίνης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνεται ότι η τριμεθυλογλυκίνη κυμαίνεται στα δείγματα μας από 30.9 mg/L – 145.1 mg/L. Οι διακυμάνσεις οφείλονται τόσο στο είδος του σαλιγκαριού προέλευσης όσο και στην περεταίρω επεξεργασία της βλέννας. Συγκεκριμένα, όσο αφορά τα δύο διαφορετικά υποείδη, έχουμε μια ένδειξη ότι η βλέννα από το *Helix aspersa muller* περιέχει λίγο μεγαλύτερες ποσότητες τριμεθυλογλυκίνης συγκριτικά με τη βλέννα του *Helix aspersa maxima*, χωρίς ωστόσο η διαφορά να είναι πολύ μεγάλη. Στα δείγματα του *Helix aspersa muller* η τριμεθυλογλυκίνη κυμαίνεται από 55.6-145.1 mg/L, ενώ στη βλέννα του *Helix aspersa maxima* από 38.3-117.3 mg/L. Επίσης, φάνηκε ότι το ανεπεξέργαστο μίγμα τους εμφανίζει ακόμη μεγαλύτερη περιεκτικότητα τριμεθυλογλυκίνης, της τάξεως των 92.8 mg/L. Παρ'όλα αυτά, φαίνεται ότι οι μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις προκύπτουν από την μετ'έπειτα επεξεργασία της βλέννας και όχι τόσο από το είδος του σαλιγκαριού. Τα πρώτα δείγματα βλέννας που αναλύθηκαν είχαν ομογενοποιηθεί με την βοήθεια νερού για τον λόγο αυτό οι συγκεντρώσεις τριμεθυλογλυκίνης είναι πολύ μικρότερες σε σχέση με τελευταία δείγματα, στα οποία η ομογενοποίηση έγινε με ειδικό αναδευτήρα χωρίς προσθήκη νερού. Συγκεκριμένα, στα αρχικά δείγματα βλέπουμε ότι η ουσία μας βρίσκεται σε συγκέντρωση της τάξης των ~50 mg/L, ενώ στα τελευταία δείγματα η συγκέντρωση της τριμεθυλογλυκίνης σχεδόν διπλασιάστηκε. Επίσης, συγκρίνοντας τα δείγματα KGP 305 και KGP 306 παρατηρήσαμε ότι η φυγοκεντρημένη βλέννα δίνει μεγαλύτερα ποσοστά τριμεθυλογλυκίνης σε σύγκριση με τη μη φυγοκεντρημένη που αποτελεί σημαντικό στοιχείο προκειμένου να παραχθεί με τον καλύτερο δυνατό τρόπο η καλύτερη δυνατή βλέννα. Ακόμη μια διαδικασία η οποία ελέγχθηκε για το κατά πόσο βελτώνει το προϊόν ήταν η ομογενοποίηση του υλικού πολλές φορές αφού ενδιάμεσα αφήνεται σε ηρεμία. Όπως φαίνεται από τα δείγματα KGP 310-312, η τεχνική αυτή δεν

επηρέασε κατά πολύ τη συγκέντρωση τριμεθυλογλυκίνης στη βλέννα, καθώς οι τιμές δεν εμφάνισαν μεγάλες διαφορές. Τέλος, στον ορό Ag pharm που αναλύθηκε η τριμεθυλογλυκίνη εμφάνισε συγκέντρωση 6438.6 mg/L, απόκλιση αρκετά μεγάλη σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα γεγονός που δείχνει ότι το προϊόν αυτό πιθανώς προέρχεται από συμπυκνωμένη βλέννα και δεν είναι φυσικός ορός σαλιγκαριού.

Συμπεράσματα για την συγκέντρωση της ιονισμένης μορφής της αλλαντοΐνης

Σε αντίθεση με τη τριμεθυλογλυκίνη η ιονισμένη μορφή της αλλαντοΐνης παρουσίασε μεγάλες διακυμάνσεις στη συγκέντρωσή της στη βλέννα σαλιγκαριού και μάλιστα σε ορισμένα δείγματα δεν υπήρχε καθόλου. Ωστόσο, στα δείγματα όπου υπάρχει φαίνεται να είναι σε αρκετά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε σχέση με την τριμεθυλογλυκίνη, ενώ οι υψηλότερες τιμές για την ιονισμένη μορφή της αλλαντοΐνης εμφανίστηκαν στη βλέννα του *Helix aspersa muller*. Το εύρος τιμών της συγκεντρώσεως της ιονισμένης μορφής της αλλαντοΐνης στα δείγματα μας είναι από 0 – 1514 mg/L . Στα δείγματα βλέννας του *Helix aspersa muller* η περιεκτικότητα σε ιονισμένη αλλαντοΐνη κυμαίνεται από 0-1514 mg/L , ενώ στη βλέννα του *Helix aspersa maxima* κυμαίνεται από 0-328.0 mg/L . Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε ότι στα πρώτα δείγματα, τα οποία ομογενοποιούνταν με νερό, δεν υπάρχει καθόλου ιονισμένη αλλαντοΐνη, ενώ στα δείγματα που δεν έχει γίνει προσθήκη νερού υπάρχει και μάλιστα σε υψηλές συγκεντρώσεις κάποιες φορές. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι σε επεξεργασμένα δείγματα στα οποία έχει προστεθεί αντιβιοτικό ή συντηρητικό υπάρχει ιονισμένη αλλαντοΐνη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην περίοδο παραλαβής της βλέννας από τα σαλιγκάρια, το οποίο θα μελετηθεί παρακάτω. Τέλος, όπως και η τριμεθυλογλυκίνη έτσι και η ιονισμένη αλλαντοΐνη στον ορό σαλιγκαριού της Ag pharm εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη τιμή σε σχέση με τις φυσικές βλέννες σαλιγκαριών, γεγονός που αποδεικνύει ότι πιθανότατα δεν αποτελεί φυσικό προϊόν.

9.2.5 Μελέτη διακύμανσης τριμεθυλογλυκίνης και της ιονισμένης αλλαντοΐνης

Οι μεγάλες διακυμάνσεις στη συγκέντρωση της ιονισμένης αλλαντοΐνης στα διάφορα δείγματα που μελετήθηκαν, μας οδήγησαν να μελετήσουμε το πως επηρεάζεται η παραγωγή της ουσίας στα είδη *Helix aspersa muller* και *maxima*, ανάλογα με τη συχνότητα παραλαβής βλέννας από τα ίδια σαλιγκάρια. Έτσι, πραγματοποιήθηκε παραλαβή βλέννας στο εργαστήριο με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, από τα ίδια σαλιγκάρια των δυο ειδών στις 19/06/2017, 12/09/2017 και για το *Helix aspersa maxima* πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία και στις 6/10/2017, καθώς το *maxima* παράγει μεγαλύτερες ποσότητες βλέννας απ'ότι το *muller*. Τα δείγματα μετρήθηκαν ως προς την συγκέντρωση τόσο της ιονισμένης αλλαντοΐνης όσο και της τριμεθυλογλυκίνης και τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Table 7: Μελέτη διακύμανσης

Κωδικός	ΔΕΙΓΜΑ	TMG (mg/L)	Ιονισμένη αλλαντοΐνης mg/L
KGP317	<i>Helix aspersa muller</i> 1 ^η παραλαβή 19/06/2017	98.3	77
KGP330	<i>Helix aspersa muller</i> - 2 ^η παραλαβή 12/09/2017	145.1	0
KGP318	<i>Helix aspersa maxima</i> 1 ^η παραλαβή 19/06/2017	70.7	328.0
KGP331	<i>Helix aspersa maxima</i> -2 ^η παραλαβή 12/09/2017	117.3	0
KGP339	<i>Helix aspersa maxima</i> - 3 ^η παραλαβή 06/10/2017	52.3	0

Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν ότι η συγκέντρωση της ιονισμένης αλλαντοΐνης επηρεάζεται περισσότερο από την συχνότητα παραλαβής της βλέννας σε σχέση με την τριμεθυλογλυκίνη. Πιο συγκεκριμένα, και στα δυο είδη η συγκέντρωση της τριμεθυλογλυκίνης φαίνεται να αυξάνεται τη δεύτερη φορά που γίνεται παραλαβή βλέννας από τα ίδια σαλιγκάρια, ενώ πέφτει στο μισό όταν γίνεται για τρίτη φορά παραλαβή της βλέννας με διαφορά ενός μήνα από το *Helix aspersa maxima*. Όσο αφορά την συγκέντρωση της ιονισμένης αλλαντοΐνης αρχικά φαίνεται ότι κατά την 2^η παραλαβή βλέννας με διαφορά τριών μηνών, τόσο από σαλιγκάρια *Helix aspersa muller* όσο και από *Helix aspersa maxima* έχουμε 100% μείωση της συγκέντρωσης της ιονισμένης αλλαντοΐνης. Τέλος, όταν έγινε παραλαβή βλέννας ενά μηνά μετά τη 2^η παραλαβή από τα ίδια σαλιγκάρια, για το υποείδος *maxima*, πάλι δεν παράχθηκε καθόλου ιονισμένη αλλαντοΐνη και η συγκέντρωση της τριμεθυλογλυκίνης έπεσε κατά πολύ. Αυτό αποδεικνύει ότι τα σαλιγκάρια παράγουν ιονισμένη αλλαντοΐνη μόνο την πρώτη φορά που λαμβάνεται βλέννα από αυτά και ως ζωντανός οργανισμός, χρειάζονται κάποιο διάστημα (μεγαλύτερο από τέσσερις μήνες) προκειμένου επανέλθουν και να παράγουν βλέννα πλούσια σε ιονισμένη αλλαντοΐνη και τριμεθυλογλυκίνη.

9.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΓΛΥΚΟΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

9.3.1 Αέρια χρωματογραφία (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο ανάλυσης όσον αφορά τις πτητικές ουσίες. Η γενική διάταξη ενός αέριου χρωματογράφου φαίνεται παρακάτω:

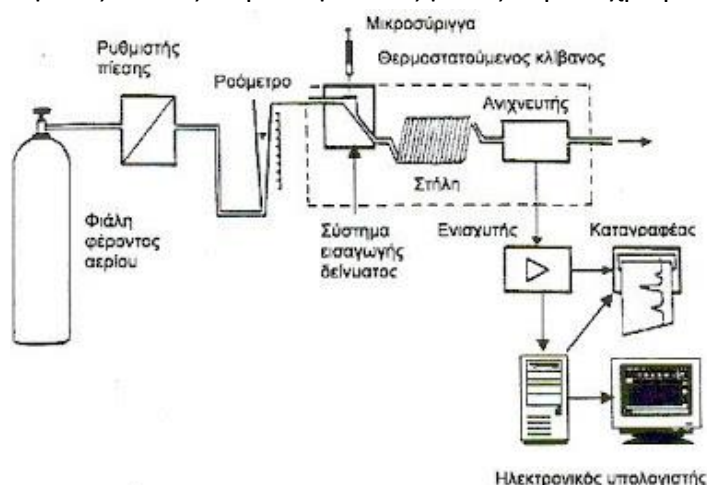
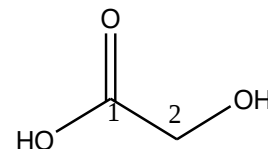


Figure 36: <http://chimikoergastirio.blogspot.gr/2009/11/s.html>

Το φέρον αέριο αποτελεί την κινητή φάση και μπορεί να είναι N_2 , He, Ar ή H_2 ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι είτε υγρή είτε στερεή. Το φέρον αέριο οδηγείται στη στήλη και γίνεται εισαγωγή του δείγματος με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου. Έπειτα τα κλάσματα οδηγούνται στον ανιχνευτή, ο οποίος πολύ συχνά είναι φασματογράφος μάζας και στη συνέχεια τα αποτελέσματα καταγράφονται σε ένα καταγραφικό σύστημα. (Κουμπάρης και Χατζηγιάννου, 2003)

9.3.2 Ανάπτυξη καμπύλης αναφοράς

Η ύπαρξη αυτής της μικρής ποσότητας γλυκολικού οξέος στη βλέννα που εξετάστηκε παραπάνω κατέστησε αναγκαία την ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικοποίησης του στην βλέννα του σαλιγκαριού. Έτσι, βασιζόμενοι στο άρθρο H. Harry Yao *et al.* αποφασίσαμε να προχωρήσουμε στην ανάπτυξη μίας καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου με αέρια χρωματογραφία GC-MS.



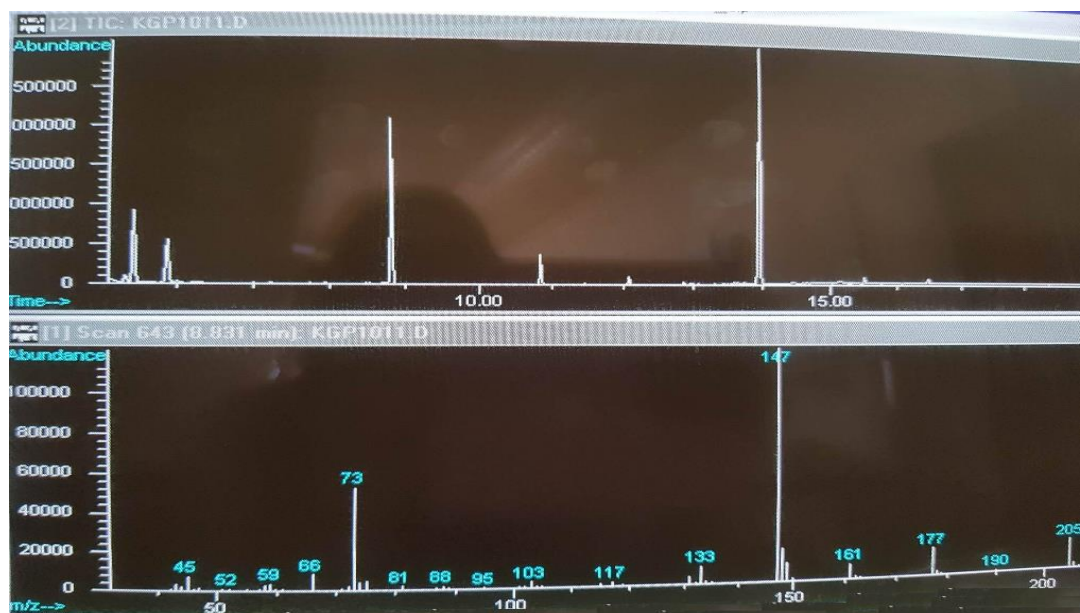
Υλικά και Όργανα

Το όργανο αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της μεθόδου είναι Hewlett – Packard 6890-5973, με στήλη HP-5 MS (DB-5) 30m * 0.25mm και πάχος μεμβράνης 0.25 μm συνδεδεμένο με φασματογράφο μάζας. Για την αντίδραση σιλυλίωσης χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο BSTFA/ TMCS, ενώ τα προτυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και το εσωτερικό πρότυπο ήταν υψηλής καθαρότητας (99%). Συγκεκριμένα, ως εσωτερικό πρότυπο επιλέχθηκε η συρινγκαλδεύδη, επειδή:

- είναι μια ουσία η οποία μπορεί να σιλυλιωθεί
- δεν αντιδρά ούτε επηρεάζει την συγκέντρωση του αναλύτη μας (γλυκολικό οξύ)
- έχει χρόνο έκλουσης 13.95 min στον οποίο δεν βγαίνει κάποια άλλη κορυφή

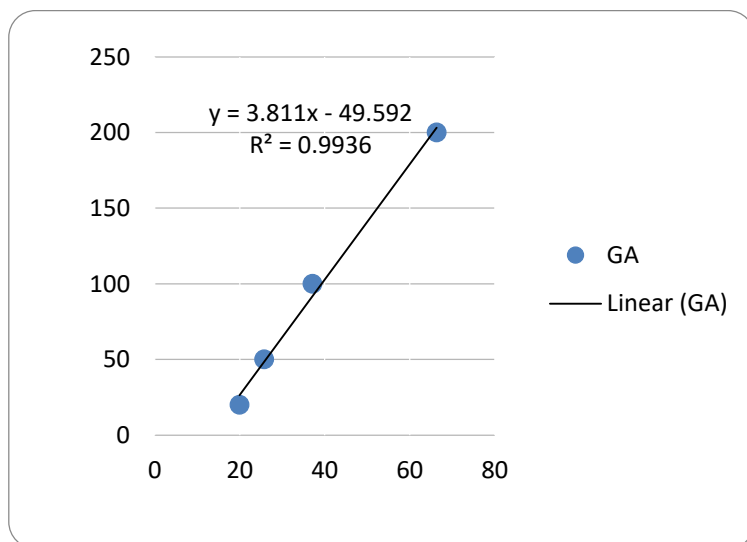
Αρχή Μεθόδου

Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 200, 100, 50, 20 μg γλυκολικού οξέος στα οποία προστέθηκαν κάθε φορά 250 μL διαλύματος συρινγκαλδεύδης συγκέντρωσης 0,2 mg/ml σε ακετονιτρίλιο. Αφού εξατμίστηκε πλήρως το ακετονιτρίλιο προστέθηκαν 80μL αντιδραστηρίου σιλυλίωσης BSTFA/ TMCS και απευθείας έγινε ένεση 1 μL από το τελικό διάλυμα στο GC. Η μέθοδος που ακολουθήσαμε διαρκεί συνολικά 20 min, με ροή 2.0 ml/min, θερμοκρασία εκκίνησης 73 °C στους οποίους παραμένει για 6.5 min και ανεβαίνει στους 280 °C με ρυθμό 25 °C / min. Για τον πλήρη καθαρισμό της στήλης από τα σιλυλιωμένα παράγωγα η στήλη πρέπει να θερμανθεί στο 300 °C για 5 min. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δύο φορές και ο ποσοτικός προσδιορισμός του γλυκολικού οξέος εκφράστηκε με επί τοις εκατό ποσοστό ως προς το εσωτερικό πρότυπο.



GA(μg)	GA(mmol)	PERCENTAGE(A) %	PERCENTAGE(B) %	AVERAGE
200	0.0026	66.6	66.06	66.33
100	0.0013	33.77	40.48	37.125
50	0.0007	25.49	26	25.745
20	0.0003	17.7	22.18	19.94

Η εξίσωση που προέκυψε είναι της μορφής $y = ax + b$ όπου y = Glycolic acid (μg) και x = percentage %



Αφού αναπτύχθηκε μέθοδος ποσοτικοποίησης για το γλυκολικό οξύ ήταν αναγκαίο να γίνει μέτρηση της ποσότητάς του στα πραγματικά δείγματα. Έτσι, εξατμίστηκε 1 ml βλέννας και υποβλήθηκε σε διαδικασία σιλυλίωσης, με την διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω. Έπειτα πραγματοποιήθηκε ένεση στο GC με την ίδια μέθοδο που αναπτύχθηκε και η καμπύλη αναφοράς. Η κορυφή του γλυκολικού οξέος στο χρωματογράφημα που προέκυψε ήταν κάτω από το όριο ολοκλήρωσης και επομένως συμπεραίνουμε ότι η συγκέντρωση γλυκολικού οξέος στη βλέννα είναι χαμηλότερη από τη μικρότερη μετρήσιμη τιμή της καμπύλης αναφοράς, δηλαδή < 20 mg/L. Τέλος, είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μέλέτη των El Mubarak *et al.* οι οποίοι αναφέρουν ότι μέτρησαν το γλυκολικό οξύ με HPLC στη βλέννα σαλιγκαριού *Helix aspersa* σε περιεκτικότητα 3750 mg/L, δηλαδή σχεδόν 200 φορές μεγαλύτερη από την περιεκτικότητα που προκύπτει από το GC.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΣΧΟΛΙΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, προέκυψαν πολύ σημαντικά αποτελέσματα σχετικά με τα χημικά χαρακτηριστικά της βλέννας σαλιγκαριού *Helix aspersa*. Πιο συγκεκριμένα, κατά την πειραματική διαδικασία:

- Έγινε απομόνωση της τριμεθυλογλυκίνης για πρώτη φορά στη βλέννα του *Helix aspersa* και ταυτοποίηση με φασματοσκοπία NMR της τριμεθυλογλυκίνης, δυο αμινοξέων, της λευκίνης και της ισολευκίνης και ενός νουκλεοτιδίου, της ουρακίλης.
- Έγινε διαλεύκανση της απόδοσης της δομής της αλλαντοΐνης με φασματοσκοπία NMR καθώς υπήρχαν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές που την περιέγραφαν λανθασμένα
- Απομονώθηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά πλήρως με φασματοσκοπία NMR η ιονισμένη μορφή της αλλαντοΐνης.
- Ανιχνεύθηκε γλυκολικό οξύ, σε ίχνη, με σιλυλίωση σε αέριο χρωματογράφο-φασματοσκοπία μάζας (GC-MS)
- Ανιχνεύθηκαν συνολικά 11 ουσίες με σιλυλίωση σε GC-MS, συμπεριλαμβανομένων του γαλακτικού οξέος και της ισολευκίνης που η ύπαρξη τους είχε ταυτοποιηθεί και με φασματοσκοπία NMR.
- Ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη γαλακτικού και οξικού οξέος με φασματοσκοπία NMR

Όσον αφορά τις μεθόδους ποσοτικοποίησης:

- Αναπτύχθηκαν καμπύλες αναφοράς για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό στη βλέννα της τριμεθυλογλυκίνης και της ιονισμένης αλλαντοΐνης με φασματοσκοπία NMR, με την μέθοδο του εσωτερικού προτύπου
- Αναπτύχθηκε μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού για το γλυκολικό οξύ σε βλέννα σαλιγκαριού με GC-MS
- Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της τριμεθυλογλυκίνης και της ιονισμένης αλλαντοΐνης σε 21 διαφορετικά δείγματα βλέννας
- Έγινε μια μελέτη διακύμανσης των δυο ουσιών ανάλογα με τη συχνότητα παραλαβής βλέννας από τα ίδια σαλιγκάρια

Από τα παραπάνω αποτελέσματα λοιπόν προέκυψαν συμπεράσματα σχετικά με την χημική σύσταση της βλέννας αλλά και με το πώς μπορούμε να παραλάβουμε βλέννα πλούσια σε ιονισμένη αλλαντοΐνη και τριμεθυλογλυκίνη. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι η ουσία που υπάρχει σε όλα τα είδη βλέννας που αναλύθηκαν ήταν η τριμεθυλογλυκίνη, η οποία απομονώθηκε πρώτη φορά από τη βλέννα του σαλιγκαριού, ενώ από την ποσοτικοποίηση της ουσίας με φασματοσκοπία NMR προέκυψε ότι το εύρος συγκεντρώσεων που υπάρχει στη βλέννα κυμαίνεται από 30.9 – 145.1 mg/L. Επίσης, προκειμένου να ελέγξουμε αν υπάρχει αλλαντοΐνη στη βλέννα σαλιγκαριού, έγινε πλήρης περιγραφή της πρότυπης αλλαντοΐνης με φασματοσκοπία NMR, καθώς υπήρχαν πολλά άρθρα στην βιβλιογραφία που την περιέγραφαν λανθασμένα. Καταλήξαμε λοιπόν ότι στην βλέννα η ιονισμένη μορφή της αλλαντοΐνης. Έτσι, έγινε για πρώτη φορά απομόνωση και περιγραφή με NMR της μορφής αυτής από τη βλέννα. Παρ'όλα αυτά, έχει αναπτυχθεί από τους El Mubarak *et al.* μέθοδος ποσοτικοποίησης της αλλαντοΐνης στη βλέννα με HPLC, χωρίς ωστόσο να αναφέρεται πώς έχει γίνει η ταυτοποίηση ότι η μετρήσιμη κορυφή αντιστοιχεί στην αλλαντοΐνη. Αντίστοιχα λοιπόν, όπως και για την τριμεθυλογλυκίνη αναπτύχθηκε μέθοδος ποσοτικοποίησης της ιονισμένης αλλαντοΐνης με φασματοσκοπία NMR και προέκυψε ότι το εύρος συγκεντρώσεων που υπάρχει στη βλέννα είναι από 0-1514 mg/L .

Ακόμη, δεν υπάρχει στην βιβλιογραφία κάποια επίσημη πηγή που να αναφέρει την απομόνωση του γλυκολικού οξέος από τη βλέννα σαλιγκαριού, ωστόσο έχει γίνει ποσοτικοποίηση της ουσίας στη βλέννα σαλιγκαριού με HPLC, όπως και στην αλλαντοΐνη. Το γεγονός ότι το γλυκολικό οξύ δεν ήταν ανιχνεύσιμο με τη φασματοσκοπία NMR μας έκανε να θεωρήσουμε ότι η ουσία υπάρχει στη βλέννα αλλά σε πάρα πολύ μικρές ποσότητες. Η σκέψη αυτή μας οδήγησε να αναπτύξουμε μέθοδο ποσοτικοποίησης του με το GC-MS, καθώς διαθέτει μεγαλύτερη ευαισθησία σαν όργανο και καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το γλυκολικό οξύ υπάρχει στη βλέννα σε συγκέντρωση μικρότερη των 20 mg/L. Το αποτέλεσμα αυτό, έρχεται σε πλήρη αντίθεση με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μέτρηση του γλυκολικού οξέος με HPLC, σύμφωνα με τα οποία η ουσία περιέχεται στην βλέννα σε συγκέντρωση περίπου 3753 mg/L, σχεδόν 200 φορές μεγαλύτερη από αυτή που προκύπτει από το GC-MS. Μια πιθανή εξήγηση γι'αυτή την διαφορά είναι ότι λόγω του ότι η τριμεθυλογλυκίνη και το γλυκολικό οξύ έχουν παρόμοια χημική δομή, μπορεί να κατακρατώνται από την στήλη της HPLC με τον ίδιο τρόπο και να εκλούονται σχεδόν ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα να δίνουν μια κοινή κορυφή, ωστόσο αυτό απαιτεί περεταίρω μελέτη.

Αφού αναπτύχθηκαν μέθοδοι ποσοτικοποίησης για την τριμεθυλογλυκίνη και την ιονισμένη μορφή της αλλαντοΐνης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε 21 διαφορετικά δείγματα βλέννας και προέκυψαν πολύ ενδιαφέροντα συμπεράσματα σχετικά με τη σύσταση της βλέννας του *Helix aspersa*. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι το υποείδος *Helix aspersa muller* έδωσε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τόσο σε τριμεθυλογλυκίνη όσο και σε ιονισμένη αλλαντοΐνη σε σύγκριση με το *Helix aspersa maxima*. Στα δείγματα του *Helix aspersa muller* η τριμεθυλογλυκίνη κυμαίνεται από 55.6-145.1 mg/L και για την ιονισμένη αλλαντοΐνη από 0-1514 mg/L . Αντίθετα, στα δείγματα του *Helix aspersa maxima* η τριμεθυλογλυκίνη κυμαίνεται από 38.3-117.3 mg/L και για την ιονισμένη

αλλαντοΐνη από 0-328.0 mg/L . Ακόμη, από τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρατηρήθηκε ότι κατεργασία της βλέννας με νερό για την ομογενοποίησή της, μειώνει τις συγκεντρώσεις και των δυο ουσιών, ενώ προέκυψε ότι στην φυγοκεντρημένη βλέννα η συγκεντρώσεις της τριμέθυλογλυκίνης αυξάνονται. Είναι επίσης αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι μετρήσεις που έγιναν σε σκεύασμα του εμπορίου, το οποίο χαρακτηρίζεται ως ορός σαλιγκαριού, έδωσαν αρκετά υψηλότερα νούμερα από αυτά που περιέχει η φυσική βλέννα που πήραμε στο εργαστήριο, γεγονός που αποδεικνύει ότι πιθανώς δεν αποτελεί προϊόν παρασκευασμένο με φυσική διαδικασία.

Τέλος, πολύ ενδιαφέροντα συμπεράσματα προέκυψαν και από τη μελέτη διακύμανσης της τριμεθυλογλυκίνης και της ιονισμένης αλλαντοΐνης. Σχετικά με την τριμεθυλογλυκίνη το κυριότερο συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι κατά την παραλαβή βλέννας 2^η φορά από τα ίδια σαλιγκάρια (μετά απο 3 μήνες) προκύπτει βλέννα πλουσιότερη σε τριμεθυλογλυκίνη. Ωστόσο, μεγαλύτερο ενδιαφέρον εμφάνισε η ιονισμένη αλλαντοΐνη, η συγκέντρωση της οποίας είχε μεγαλύτερες διακυμάνσεις. Συγκεκριμένα, τη 2^η φορά που έγινε παραλαβή - μετά από 3 μήνες - από τα ίδια σαλιγκάρια και για τα δυο υποείδη η συγκέντρωση της ιονισμένης αλλαντοΐνης μηδενίστηκε. Επίσης, κατά την 3^η παραλαβή βλέννας - 4 μήνες μετά την πρώτη παραλαβή - από τα ίδια σαλιγκάρια *Helix aspersa maxima*, παράχθηκε βλέννα χωρίς καθόλου ιονισμένη αλλαντοΐνη. Έτσι λοιπόν, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι για να πάρουμε βλέννα πλούσια σε ιονισμένη αλλαντοΐνη είναι προτιμότερο να επιλέξουμε τα σαλιγκάρια από τα οποία δεν έχουμε παραλάβει βλέννα σε διάστημα τουλάχιστον 4 μηνών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, σε συνεργασία με το εργαστήριο φαρμακολογίας του κυρίου Δρακούλη, προχωρήσαμε σε μια μικρής κλίμακας κλινική μελέτη, προκειμένου να αξιολογήσουμε την επίδραση της βλέννας σαλιγκαριού στο δέρμα συγκριτικά με την επίδραση του ελαιολάδου, που χρησιμοποιήθηκε ως βάση. Συγκεκριμένα, συμμετείχαν πέντε εθελοντές (3 γυναίκες και 2 άντρες), ηλικίας από 25-45 ετών στους οποίους χορηγήθηκαν δύο προϊόντα, ένας ορός για το πρόσωπο (face serum) ο οποίος περιείχε μόνο ελαιόλαδο και ένας ορός για την περιοχή γύρω από τα μάτια (eyes serum), το οποίο περιείχε ελαιόλαδο μαζί με βλέννα σαλιγκαριού *Helix aspersa*. Η χορήγηση των προϊόντων έγινε στην περιοχή Τ του προσώπου και στην περιοχή των ματιών και για να είναι δυνατή η αξιολόγηση της δράσης της βλέννας, στην δεξιά πλευρά του προσώπου χρησιμοποιήθηκε μόνο ο ορός προσώπου από ελαιόλαδο, ενώ στην αριστερή πλευρά χορηγήθηκε ο ορός ματιών, που περιείχε και βλέννα. Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν ήταν η ελαστικότητα, η ενυδάτωση και η μείωση ρυτίδων, ενώ ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε στα 30 και στα 90 λεπτά μετά τη χορήγηση.

11.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ - ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

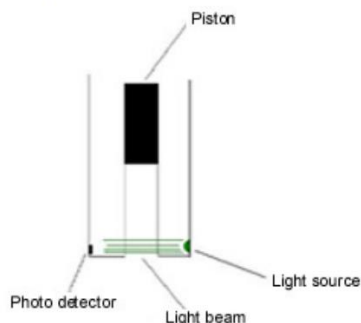
Οι μετρήσεις ενυδάτωσης, ελαστικότητας και οι φωτογραφίες για τον έλεγχο των ρυτίδων έγιναν με ειδική συσκευή μέτρησης της εταιρείας Callegari S.P.A, μοντέλο Soft Plus (Serial number: S1000000105). Πιο συγκεκριμένα, η μέτρηση της ενυδάτωσης έγινε με ένα ειδικό εξάρτημα-αισθητήρα του Soft Plus, το οποίο μετράει την ενυδάτωση της κεράτινης στοιβάδας του δέρματος με βάση την μέθοδο της χωρητικότητας.



Συμφωνα με την μέθοδο αυτή, υπολογίζεται η ποσότητα ηλεκτρικού ρεύματος που περνάει μέσω ενός πυκνωτή, ο οποίος αποτελείται από δυο αγώγιμες πλάκες. Η μια πλάκα βρίσκεται στην επιφάνεια του αισθητήρα, ενώ η άλλη έρχεται σε επαφή με την κατώτερη-καλά ενυδατωμένη στοιβάδα του δέρματος. Το στρώμα του δέρματος που αποτελείται από νεκρά κερατινοποιημένα κύτταρα διασπαρμένα σε ένα λιπιδικό μέσο αποτελεί ένα εξαιρετικό εμπόδιο στη διέλευση τόσο των χημικών ουσιών όσο και του ηλεκτρικού ρεύματος έτσι μπορεί να θεωρηθεί διηλεκτρικό μέσο (με διηλεκτρική σταθερά μικρότερη από 5). Η διηλεκτρική σταθερά του νερού είναι πολύ υψηλότερη (81), έτσι αν περιέχεται νερό στην κεράτινη στοιβάδα, αλλάζουν δραματικά οι διηλεκτρικές ιδιότητες του ανώτατου στρώματος. Με μέτρηση της ποσότητας του ρεύματος που ρέει μέσω της κεράτινης

στιβάδας είναι δυνατόν να αξιολογηθεί η διηλεκτρική σταθερά της ενυδατωμένης κεράτινης στιβάδας και να υπολογιστεί η περιεκτικότητα σε υγρασία.

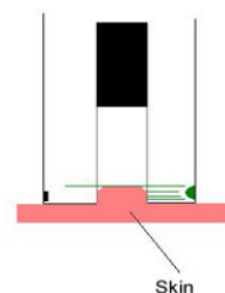
Όσο αφορά την μέτρηση της ελαστικότητας, στο Soft Plus η αρχή μέτρησης βασίζεται στη μέθοδο αναρρόφησης. Το ειδικό εξάρτημα με το οποίο γίνεται η μέτρηση είναι εφοδιασμένο με μια μικρή αντλία, εξασφαλίζοντας έτσι την εφαρμογή κενού για κάθε μέτρηση. Με την εφαρμογή κενού, προκαλείται δερματική παραμόρφωση, η οποία ποσοτικοποιείται μέσω ενός ειδικά σχεδιασμένου αισθητήρα. Ο αισθητήρας αποτελείται από μια πηγή φωτός η οποία παράγει μια εγκάρσια δέσμη φωτός στο εσωτερικό του. Όσο περισσότερο το δέρμα παραμορφώνεται, τόσο περισσότερο η ένταση



της δέσμης φωτός θα μειωθεί. Έτσι, η μείωση του σήματος συσχετίζεται με την ελαστικότητα του δέρματος.

Όταν το δέρμα δεν διεισδύσει στο εσωτερικό του οργάνου, η ποσότητα του φωτός που ανιχνεύεται από τη φωτοδίοδο είναι η μέγιστη.

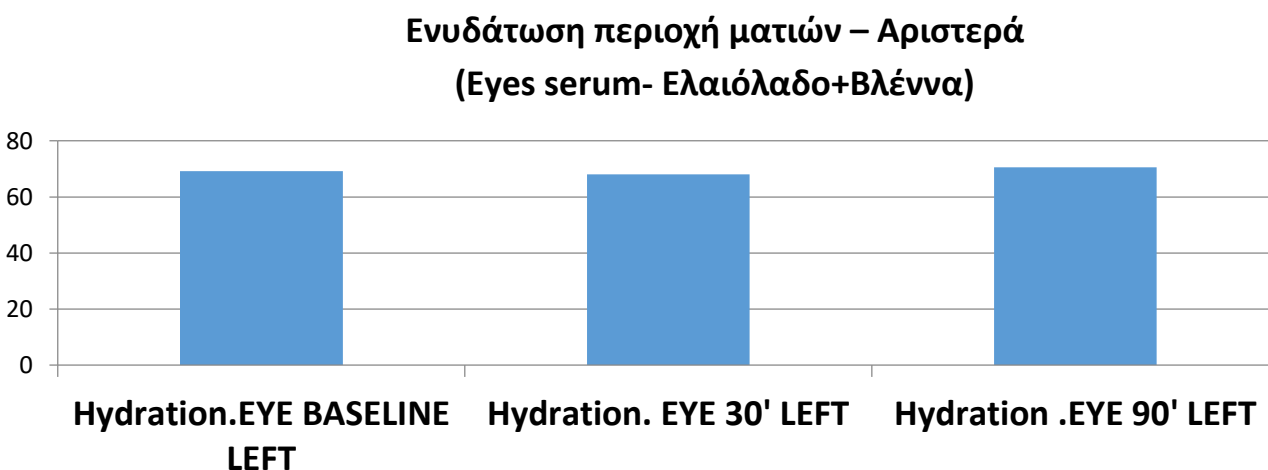
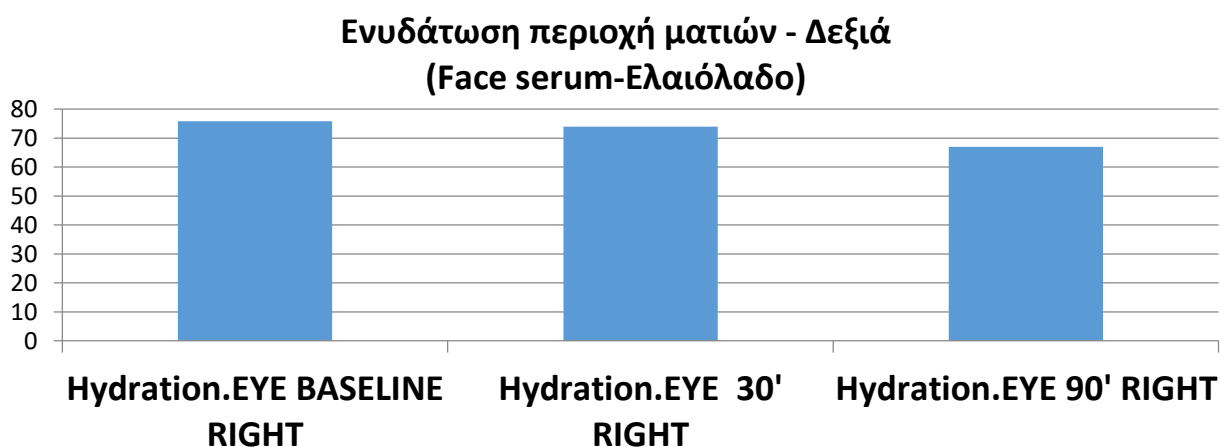
Αντίθετα, όταν το δέρμα δεν είναι σε θέση να αντισταθεί στη μηχανική καταπόνηση από την αναρρόφηση, θα διεισδύσει εσωτερικό τμήμα του οργάνου, όπως φαίνεται στην εικόνα. Η ποσότητα του δέρματος που διεισδύει, μετράται ανάλογα με τη μείωση του φωτός που φθάνει στη φωτοδίοδο.



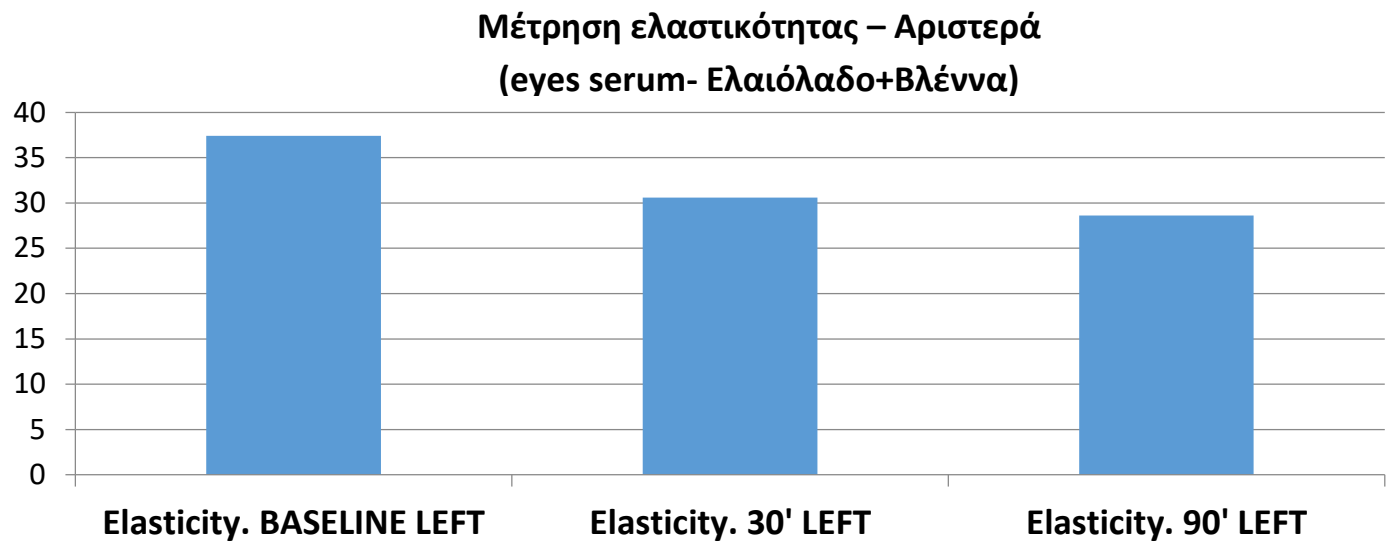
Τέλος, οι φωτογραφίες των ρυτίδων πάρθηκαν με ειδική μικροκάμερα, η οποία παρέχει 3D ανάλυση των ρυτίδων μετρώντας το βάθος, το μήκος και το πλάτος κάθε ρυτίδας πριν και μετά την θεραπεία. ("Measurement Principles of SOFT PLUS," 2018)

11.2 ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν καταγράφηκαν σε διαγράμματα για κάθε προϊόν σε κάθε περιοχή που χορηγήθηκε, για την διεξαγωγή συγκριτικών αποτελεσμάτων. Όσον αφορά την ενυδάτωση φάνηκε ότι για την Τ περιοχή του προσώπου και τα δύο προϊόντα δεν είχαν κάποια αξιόλογη επίδραση. Στην περιοχή των ματιών, το serum προσώπου που περιείχε μόνο ελαιόλαδο προκάλεσε αισθητή μείωση ενυδάτωσης, ενώ αντίθετα το serum ματιών με βλέννα σαλιγκαριού διατήρησε την ενυδάτωση σταθερή μέχρι τα 30 λεπτά μετά την εφαρμογή και μάλιστα στα 90 λεπτά φαίνεται να προκαλεί και αύξηση της ενυδάτωσης, όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα. Τα συμπεράσματα αυτά αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι η βλέννα σαλιγκαριού αποτελεί έναν πολύ καλό ενυδατικό παράγοντα για το πρόσωπο και ειδικότερα για την περιοχή των ματιών.



Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε μέτρηση της ελαστικότητας του δέρματος, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση ρυτίδων. Στην αριστερή πλευρά του προσώπου, όπου χορηγήθηκε το eyes serum με τη βλέννα σαλιγκαριού παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση της ελαστικότητας στα πρώτα 30 λεπτά και επίσης σημαντική στα 90 λεπτά. Τα αποτελέσματα αντικατροπτίζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Όσο μειώνεται η ελαστικότητα τόσο λιγότερο ορατές είναι οι ρυτίδες του δέρματος καθώς η επιδερμίδα εμφανίζεται πιο τεντωμένη, λεία και το βάθος των ρυτίδων μειώνεται. Μάλιστα η δράση αυτή φαίνεται και από φωτογραφίες που τραβήχτηκαν πριν τη χορήγηση του προϊόντος και μετά για μία συγκεκριμένη περιοχή του δέρματος όπως φαίνεται παρακάτω.

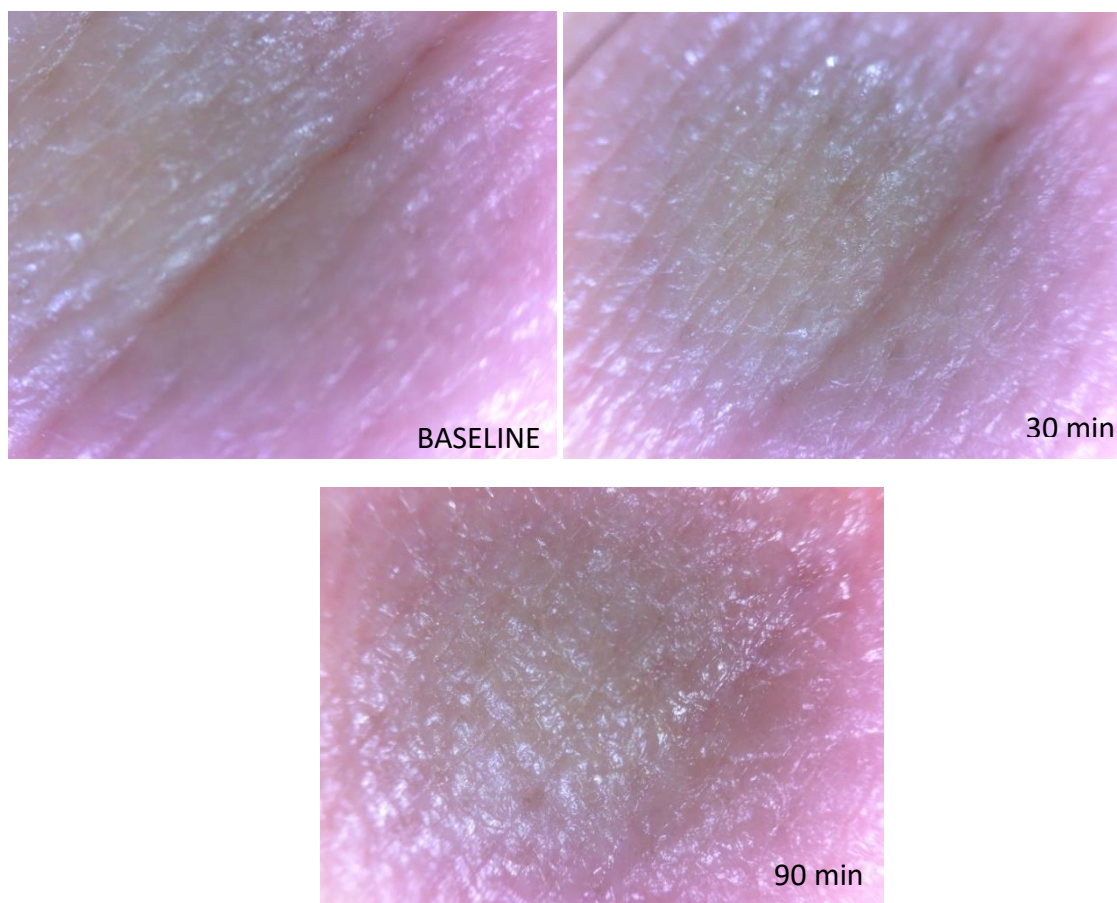


Figure 37 : Φωτογραφίες ρυτίδων με ειδική κάμερα πριν και μετά τη χορήγηση eyes serum

Συνοψίζοντας, αν και η συγκεκριμένη κλινική δοκιμή αποτέλεσε μια μικρής κλίμακας μελέτη, μας οδήγησε σε αρκετά ενδιαφέροντα συμπεράσματα σχετικά με τη επίδραση της βλέννας σαλιγκαριού *Helix aspersa* στο δέρμα. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι:

- η βλέννα σαλιγκαριού αποτελεί έναν πολύ καλό ενυδατικό παράγοντα για την περιοχή γύρω από τα μάτια, ενώ ταυτόχρονα
- η βλέννα σαλιγκαριού βοηθά στην μείωση της ελαστικότητας της επιδερμίδας και κατ'επέκταση την μείωση των ρυτίδων

Οι δράσεις αυτές αποτελούν πολύ καλές ενδείξεις σχεικά με τη χρήση της βλέννας σε καλλυντικά σκευάσματα με σκοπό τόσο την ενυδάτωση όσο και την αντιγήρανση του δέρματος, για τον λόγο αυτό είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν μελέτες σε μεγαλύτερο εύρος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 21 CFR 347.10 - Skin protectant active ingredients. [WWW Document], n.d. . LII Leg. Inf. Inst. URL <https://www.law.cornell.edu/cfr/text/21/347.10> (accessed 12.27.17).
- Abad RF., 1999. Treatment of experimental radiodermatitis with a regenerative glucoproteic mucopolysaccharide complex. *Dermatol Cosmet.* 9, 53–57.
- Akema Fine Chemicals [WWW Document], n.d. URL <http://www.akema.it/> (accessed 12.27.17).
- Alfthan, G., Tapani, K., Nissinen, K., Saarela, J., Aro, A., 2004. The effect of low doses of betaine on plasma homocysteine in healthy volunteers. *Br. J. Nutr.* 92, 665–669.
- Allen, R.H., Stabler, S.P., Lindenbaum, J., 1993. Serum betaine, N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. *Metabolism* 42, 1448–1460. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(93\)90198-W](https://doi.org/10.1016/0026-0495(93)90198-W)
- animalbase [WWW Document], n.d. URL <http://www.animalbase.org/> (accessed 12.27.17).
- Araújo, L.U., Grabe-Guimarães, A., Mosqueira, V.C.F., Carneiro, C.M., Silva-Barcellos, N.M., 2010. Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cir. Bras.* 25, 460–461. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502010000500014>
- Armstrong, L.E., Casa, D.J., Roti, M.W., Lee, E.C., Craig, S.A.S., Sutherland, J.W., Fiala, K.A., Maresh, C.M., 2008. Influence of betaine consumption on strenuous running and sprinting in a hot environment. *J. Strength Cond. Res.* 22, 851–860. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e31816a6efb>
- Blake, J.D., Clarke, M.L., Richards, G.N., 1987. Determination of organic acids in sugar cane process juice by high-performance liquid chromatography: improved resolution using dual aminex HPX-87H cation-exchange columns equilibrated to different temperatures. *J. Chromatogr. A* 398, 265–277. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)96512-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)96512-4)
- Bonnemain, B., 2005. Helix and Drugs: Snails for Western Health Care From Antiquity to the Present. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2, 25–28. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh057>
- Braga, R.R., Sales, J., Marins, R. de C.E.E., Ortiz, G.M.D., Garcia, S., 2012. Development and validation of a method for allantoin determination in liposomes and pharmaceutical formulations. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 91, 389–394. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.02.022>
- Briden, E., Jacobsen, E., Johnson, C., 2007. Combining superficial glycolic acid (alpha-hydroxy acid) peels with microdermabrasion to maximize treatment results and patient satisfaction. *Cutis* 79, 13–16.
- Brieva, A., Philips, N., Tejedor, R., Guerrero, A., Pivel, J.P., Alonso-Lebrero, J.L., Gonzalez, S., 2008. Molecular Basis for the Regenerative Properties of a Secretion of the Mollusk

Cryptomphalus aspersa. Skin Pharmacol. Physiol. 21, 15–22. <https://doi.org/10.1159/000109084>

- Bruce, S.J., Guy, P.A., Rezzi, S., Ross, A.B., 2010. Quantitative Measurement of Betaine and Free Choline in Plasma, Cereals and Cereal Products by Isotope Dilution LC-MS/MS. J. Agric. Food Chem. 58, 2055–2061. <https://doi.org/10.1021/jf903930k>
- Brychkova, G., Alikulov, Z., Fluhr, R., Sagi, M., 2008. A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1* Arabidopsis mutant. Plant J. Cell Mol. Biol. 54, 496–509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03440.x>
- Burg, M.B., Ferraris, J.D., 2008. Intracellular Organic Osmolytes: Function and Regulation. J. Biol. Chem. 283, 7309–7313. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700042200>
- Castro, A.H.F., Young, M.C.M., De, A., Alves, J.D., 2001. Influence of photoperiod on the accumulation of allantoin in comfrey plants. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 13, 49–54.
- Caussé, E., Pradelles, A., Dirat, B., Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Couderc, F., 2007. Simultaneous determination of allantoin, hypoxanthine, xanthine, and uric acid in serum/plasma by CE. Electrophoresis 28, 381–387. <https://doi.org/10.1002/elps.200600205>
- Chairman, W.F., Bergfeld, M.D., Donald V. Belsito, 2013. Safety Assessment of Alpha Hydroxy Acids as Used in Cosmetics.
- Chambers, S.T., Kunin, C.M., 1987. Isolation of glycine betaine and proline betaine from human urine. Assessment of their role as osmoprotective agents for bacteria and the kidney. J. Clin. Invest. 79, 731–737.
- Chauhan, S., DiCosimo, R., Fallon, R.D., Gavagan, J.E., Paye, M.S., n.d. Method for producing glycolic acid from glycolonitrile using nitrilase. US 6416980 B1.
- ChemSpider | Search and share chemistry [WWW Document], n.d. URL <http://www.chemspider.com/> (accessed 12.27.17).
- Chen, L., Chen, Y., Wang, L., Wei, J., Tan, Y., Zhou, J., Yang, Y., Chen, Y., Ling, W., Zhu, H., 2013. Higher homocysteine and lower betaine increase the risk of microangiopathy in patients with diabetes mellitus carrying the GG genotype of PEMT G774C. Diabetes Metab. Res. Rev. 29, 607–617. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2432>
- Cholewa, J.M., Wyszczelska-Rokiel, M., Glowacki, R., Jakubowski, H., Matthews, T., Wood, R., Craig, S.A., Paolone, V., 2013. Effects of betaine on body composition, performance, and homocysteine thiolactone. J. Int. Soc. Sports Nutr. 10, 39. <https://doi.org/10.1186/1550-2783-10-39>
- Colman, B., Miller, A.G., Grodzinski, B., 1974. A Study of the Control of Glycolate Excretion in *Chlorella*. Plant Physiol. 53, 395–397.
- Cornu aspersum (O.F. Muller, 1774) | Fauna Europaea [WWW Document], n.d. URL https://fauna-eu.org/cdm_dataportal/taxon/76ff8a48-9d7d-4ea3-9704-59797b9be8b0 (accessed 7.18.17).

- Couch, L.H., Howard, P.C., 2002. Quantification of glycolic acid in cosmetic products using reversed phase high performance liquid chromatography. *Int. J. Cosmet. Sci.* 24, 89–95. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2494.2002.00128.x>
- Coxon, B., Fatiadi, A.J., Sniegowski, L.T., Hertz, H.S., Schaffer, R., 1977. A novel acylative degradation of uric acid. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of uric acid and its degradation products. *J. Org. Chem.* 42, 3132–3140.
- Craig, S.A.S., 2004. Betaine in human nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 539–549.
- Cranga F, C.Y., 1991. *L'Escargot: Zoologie, Symbolique, Imaginaire, Médecine et Gastronomie.* Bien Public Dijon.
- Cudennec, B., Violle, N., Chataigné, G., Drevet, P., Bisson, J.-F., Dhulster, P., Ravallec, R., 2016. Evidence for an antihypertensive effect of a land snail (*Helix aspersa*) by-product hydrolysate – Identification of involved peptides. *J. Funct. Foods* 22, 602–611. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.025>
- Delgado-Reyes, C.V., Garrow, T.A., 2005. High sodium chloride intake decreases betaine-homocysteine S-methyltransferase expression in guinea pig liver and kidney. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R182–187. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00406.2004>
- Díez, M.T., Arín, M.J., Resines, J.A., 1992. Simultaneous Determination of Allantoin and Creatinine in Urine by a Rapid Reversed-Phase Liquid-Chromatographic Method. *J. Liq. Chromatogr.* 15, 1337–1350. <https://doi.org/10.1080/10826079208018291>
- Ditre, C.M., Griffin, T.D., Murphy, G.F., Sueki, H., Telegan, B., Johnson, W.C., Yu, R.J., Van Scott, E.J., 1996. Effects of alpha-hydroxy acids on photoaged skin: a pilot clinical, histologic, and ultrastructural study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 34, 187–195.
- Doi, T., Kajimura, K., Takatori, S., Fukui, N., Taguchi, S., Iwagami, S., 2009. Simultaneous measurement of diazolidinyl urea, urea, and allantoin in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 877, 1005–1010. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.032>
- Dwek, M.V., Ross, H.A., Streets, A.J., Brooks, S.A., Adam, E., Titcomb, A., Woodside, J.V., Schumacher, U., Leathem, A.J., 2001. *Helix pomatia* agglutinin lectin-binding oligosaccharides of aggressive breast cancer. *Int. J. Cancer* 95, 79–85. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20010320\)95:2<79::AID-IJC1014>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20010320)95:2<79::AID-IJC1014>3.0.CO;2-E)
- El Mubarak, M.A.S., Lamari, F.N., Kontoyannis, C., 2013. Simultaneous determination of allantoin and glycolic acid in snail mucus and cosmetic creams with high performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A* 1322, 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.086>
- Endocare- Scientific dossier, n.d.
- Fabi, S.G., Cohen, J.L., Peterson, J.D., Kiripolsky, M.G., Goldman, M.P., 2013. The effects of filtrate of the secretion of the *Cryptomphalus aspersa* on photoaged skin. *J. Drugs Dermatol. JDD* 12, 453–457.

- Fasulo, G.W.D. and T.R., 2014. Brown Garden Snail, *Cornu aspersum* (Müller, 1774) (Gastropoda: Helicidae) [WWW Document]. URL <http://edis.ifas.ufl.edu/in396>
- Faznurfariza, F., 2012. Extraction of Glycolic Acid from Natural Sources. UMP.
- Figuier O., 1840. Mémoire sur la Composition Chimique des Escargots et sur les Préparations Pharmaceutiques dont ils sont la Base. F. Gelly, Montpellier, 1840.
- Fisher, G.J., 2005. The pathophysiology of photoaging of the skin. *Cutis* 75, 5-8; discussion 8-9.
- Folin, O., Bergland, H., Derick, C., 1924. The Uric Acid Problem. *J. Biol. Chem.* LX, 361–471.
- Frederick, S.E., Gruber, P.J., Tolbert, N.E., 1973. The Occurrence of Glycolate Dehydrogenase and Glycolate Oxidase in Green Plants. *Plant Physiol.* 52, 318–323.
- Fulmer, G.R., Miller, A.J.M., Sherden, N.H., Gottlieb, H.E., Nudelman, A., Stoltz, B.M., Bercaw, J.E., Goldberg, K.I., 2010. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* 29, 2176–2179. <https://doi.org/10.1021/om100106e>
- Garrett, R.H., Grisham, C.M., 2016. Biochemistry. Cengage Learning.
- George, S.K., Dipu, M.T., Mehra, U.R., Singh, P., Verma, A.K., Ramgaokar, J.S., 2006. Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 832, 134–137. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.10.051>
- Gersovitz, M., Bier, D., Matthews, D., Udall, J., Munro, H.N., Young, V.R., 1980. Dynamic aspects of whole body glycine metabolism: Influence of protein intake in young adult and elderly males. *Metabolism* 29, 1087–1094. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(80\)90220-6](https://doi.org/10.1016/0026-0495(80)90220-6)
- Glogau, R.G., 1996. Aesthetic and anatomic analysis of the aging skin. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 15, 134–138.
- Goelzer, A., Bekkal Brikci, F., Martin-Verstraete, I., Noirot, P., Bessières, P., Aymerich, S., Fromion, V., 2008. Reconstruction and analysis of the genetic and metabolic regulatory networks of the central metabolism of *Bacillus subtilis*. *BMC Syst. Biol.* 2, 20. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-20>
- Graham, S.F., Hollis, J.H., Migaud, M., Browne, R.A., 2009. Analysis of Betaine and Choline Contents of Aleurone, Bran, and Flour Fractions of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Using ¹H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1948–1951. <https://doi.org/10.1021/jf802885m>
- Green, B.A., Yu, R.J., Van Scott, E.J., 2009. Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. *Clin. Dermatol.* 27, 495–501. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.06.023>
- Hefni, M., McEntyre, C., Lever, M., Slow, S., 2016. Validation of HPLC-UV Methods for the Quantification of Betaine in Foods by Comparison with LC-MS. *Food Anal. Methods* 9, 292–299. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0195-6>

- Hickman, C., Keen, S., Larson, A., Roberts, L., I' Anson, 2014. Ζωολογία. Ολοκληρωμένες Αρχές, Τόμος Ι, : Εκδόσεις Ουτοπία. Τόμος 1 : Εκδόσεις Ουτοπία, Αθήνα.
- Hložek, T., Bursová, M., Čabala, R., 2014. Fast determination of ethylene glycol, 1,2-propylene glycol and glycolic acid in blood serum and urine for emergency and clinical toxicology by GC-FID. *Talanta* 130, 470–474. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.020>
- Holm, P.I., Ueland, P.M., Kvalheim, G., Lien, E.A., 2003. Determination of Choline, Betaine, and Dimethylglycine in Plasma by a High-Throughput Method Based on Normal-Phase Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* 49, 286–294. <https://doi.org/10.1373/49.2.286>
- https://en.wikipedia.org/wiki/Cornu_aspersum, n.d.
- Human Metabolome Database: 1H NMR Spectrum (HMDB0000115) [WWW Document], n.d. URL http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1089#spectrum (accessed 10.13.17).
- Jin, P., Ma, J., Wu, X., Zou, D., Sun, C., Hu, X., 2009. Simultaneous determination of chondroitin sulfate sodium, allantoin and pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical eye drops by an ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50, 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.04.037>
- Jolivet, P., Gans, P., Triantaphylides, C., 1985. Determination of glycolic acid level in higher plants during photorespiration by stable isotope dilution mass spectrometry with double-labeling experiments. *Anal. Biochem.* 147, 86–91. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90012-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90012-0)
- Kahn, K., 1998. Kinetic and mechanistic characterization of the urate oxidase reaction. PhD Thesis, University of Missouri, Columbia, 1998. Univ. Mo. Columbia.
- Kahn, K., Serfozo, P., Tipton, P.A., 1997. Identification of the True Product of the Urate Oxidase Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5435–5442. <https://doi.org/10.1021/ja970375t>
- Kahn, K., Tipton, P.A., 2000. Kinetics and Mechanism of Allantoin Racemization. *Bioorganic Chem.* 28, 62–72. <https://doi.org/10.1006/bioo.2000.1162>
- Kim, K.M., Henderson, G.N., Frye, R.F., Galloway, C.D., Brown, N.J., Segal, M.S., Imaram, W., Angerhofer, A., Johnson, R.J., 2009. Simultaneous determination of uric acid metabolites allantoin, 6-aminouracil, and triuret in human urine using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 877, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.11.029>
- Kim, S.J., Park, J.H., Kim, D.H., Won, Y.H., Maibach, H.I., 1998. Increased in vivo collagen synthesis and in vitro cell proliferative effect of glycolic acid. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. Al* 24, 1054–1058.
- Koc, H., Mar, M.-H., Ranasinghe, A., Swenberg, J.A., Zeisel, S.H., 2002. Quantitation of choline and its metabolites in tissues and foods by liquid chromatography/electrospray ionization-isotope dilution mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 4734–4740.

- Legendijk, J., Ubbink, J.B., Vermaak, W.J., 1995. The determination of allantoin, a possible indicator of oxidant status, in human plasma. *J. Chromatogr. Sci.* 33, 186–193.
- Laryea, M.D., Steinhagen, F., Pawliczek, S., Wendel, U., 1998. Simple method for the routine determination of betaine and N,N-dimethylglycine in blood and urine. *Clin. Chem.* 44, 1937–1941.
- Laurent, Auguste, 1848. “Sur les acides amidés et le sucre de gélatine” (On aminated acids and the sugar of gelatine [i.e., glycine]), *Annales de Chimie et de Physique*, 3rd series, 23 : 110–123.
- Lázár-Molnár, E., Hegyesi, H., Tóth, S., Falus, A., 2000. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 12, 547–554. <https://doi.org/10.1006/cyto.1999.0614>
- Ledo, E., Las, H. de, E, M., Ledo, A., 1999. Treatment of acute radiodermatitis with *Cryptomphalus Aspersa* Secretion. *Radioproteccion Madr.* 23, 34–38.
- Lemery, N., 1738. *Pharmacopee Universelle*. Charles Maurice d’Houry.
- Lever, M., McEntyre, C.J., George, P.M., Slow, S., Elmslie, J.L., Lunt, H., Chambers, S.T., Parry-Strong, A., Krebs, J.D., 2014. Extreme urinary betaine losses in type 2 diabetes combined with bezafibrate treatment are associated with losses of dimethylglycine and choline but not with increased losses of other osmolytes. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 28, 459–468. <https://doi.org/10.1007/s10557-014-6542-9>
- Lin, C.-S., Wu, R.-D., 1986. Choline oxidation and choline dehydrogenase. *J. Protein Chem.* 5, 193–200. <https://doi.org/10.1007/BF01025488>
- Lundberg, P., Dudman, N.P., Kuchel, P.W., Wilcken, D.E., 1995. ¹H NMR determination of urinary betaine in patients with premature vascular disease and mild homocysteinemia. *Clin. Chem.* 41, 275–283.
- Magliaro, A., Gianfaldoni, R., Cervadoro, G., 1999. Treatment of burn scars with a gel based on allantoin and sulfomucopolysaccharides. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 134, 153–156.
- Measurement Principles of SOFT PLUS, 2018. . Micro-Medical.
- Meldrum, B.S., 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* 130, 1007S–155S.
- Michihiko, K., Mie, S., Hidalgo, A.-R.G.D., Michiko, N., Sakayu, S., 2001. Glycolic acid production using ethylen glycol-oxidizing microorganisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2265–2270.
- Mikami, T., Kita, K., Tomita, S., Qu, G.J., Tasaki, Y., Ito, A., 2000. Is allantoin in serum and urine a useful indicator of exercise-induced oxidative stress in humans? *Free Radic. Res.* 32, 235–244.
- Mills, E., O’Neill, L.A.J., 2014. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol.* 24, 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.11.008>

- Morganti, P., 1996. ALPHA HYDROXY ACIDS IN COSMETIC DERMATOLOGY. *J Appl Cosmetol* 14 35–41.
- Naru, E., Suzuki, T., Moriyama, M., Inomata, K., Hayashi, A., Arakane, K., Kaji, K., 2005. Functional changes induced by chronic UVA irradiation to cultured human dermal fibroblasts. *Br. J. Dermatol.* 153 Suppl 2, 6–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06964.x>
- National Center of Biotechnology Information, n.d.
- Navone, L., Casati, P., Licona-Cassani, C., Marcellin, E., Nielsen, L.K., Rodriguez, E., Gramajo, H., 2014. Allantoin catabolism influences the production of antibiotics in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 351–360. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5372-1>
- Nutrition, C. for F.S. and A., n.d. Guidance Documents - Guidance for Industry: Labeling for Cosmetics Containing Alpha Hydroxy Acids [WWW Document]. URL <https://www.fda.gov/cosmetics/guidanceregulation/guidancedocuments/ucm090816.htm#cos> (accessed 10.13.17).
- Olthof, M.R., van Vliet, T., Verhoef, P., Zock, P.L., Katan, M.B., 2005. Effect of homocysteine-lowering nutrients on blood lipids: results from four randomised, placebo-controlled studies in healthy humans. *PLoS Med.* 2, e135. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020135>
- Onofrejová, L., Vašíčková, J., Klejdus, B., Stratil, P., Mišurcová, L., Kráčmar, S., Kopecký, J., Vacek, J., 2010. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal., Natural Bioactive Compounds and Nutrigenomics* 51, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.027>
- Oulhaj, A., Refsum, H., Beaumont, H., Williams, J., King, E., Jacoby, R., Smith, A.D., 2010. Homocysteine as a predictor of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 25, 82–90. <https://doi.org/10.1002/gps.2303>
- Parida, A.K., Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 324–349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>
- Pentz, E.I., 1969. Adaptation of the Rimini-Schryver reaction for the measurement of allantoin in urine to the AutoAnalyzer: Allantoin and taurine excretion following neutron irradiation. *Anal. Biochem.* 27, 333–342. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90043-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90043-8)
- Petrarulo, M., Marangella, M., Linari, F., 1991. High-performance liquid chromatographic determination of plasma glycolic acid in healthy subjects and in cases of hyperoxaluria syndromes. *Clin. Chim. Acta* 196, 17–26. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90204-P](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90204-P)
- Pierre Charroppin, Pierre Julien, 1983. L'escargot contre la hernie ? *Rev. Hist. Pharm.* 215–219.
- Pitt, S.J., Graham, M.A., Dedi, C.G., Taylor-Harris, P.M., Gunn, A., 2015. Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail *Helix aspersa*. *Br. J. Biomed. Sci.* 72, 174–181; quiz 208.
- Pubchem, n.d. allantoin [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/204> (accessed 10.9.17a).

- Pubchem, n.d. malonic acid [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/867> (accessed 1.18.18b).
- Pubchem, n.d. glycine [WWW Document]. URL <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/750> (accessed 1.18.18c).
- Quevauviller A, M.J., Garcet S., 1953. Le mucus d'Helix pomatia L. Preparation, composition, proprietes therapeutiques et phamacodynamiques. *Rev Pathol Gen Comp* 653, 1514–38.
- Ramanjooloo, A., Bhaw-Luximon, A., Jhurry, D., Cadet, F., 2009. ¹H NMR Quantitative Assessment of Lactic Acid Produced by Biofermentation of Cane Sugar Juice. *Spectrosc. Lett.* 42, 296–304. <https://doi.org/10.1080/00387010903178632>
- Räsänen, L.A., Myllymäki, T., Hyyppä, S., Maisi, P., Pösö, A.R., 1993. Accumulation of allantoin and uric acid in plasma of exercising trotters. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1923–1928.
- Rashed, A., Afifi, F., Shehadeh, M., Taha, M., 2004. Investigation of the active constituents of *Portulaca oleraceae* L. (Portulacaceae) growing in Jordan. *Pak. J. Pharm. Sci.* 17, 37–45.
- Resines, J.A., Arín, M.J., Díez, M.T., 1992. Determination of creatinine and purine derivatives in ruminants' urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 607, 199–202. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)87075-J](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)87075-J)
- Reutter, 1915. Des remèdes d'origine humaine et animale prescrits au temps des omains en Europe. *Rev. D'Histoire Pharm.* 12, 179.
- Rivoira, L., Studzińska, S., Szultka-Młyńska, M., Bruzzoniti, M.C., Buszewski, B., 2017. New approaches for extraction and determination of betaine from *Beta vulgaris* samples by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 5133–5141. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0461-0>
- Sakamoto, A., Murata, N., 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 25, 163–171.
- Sang, S., Lao, A., Wang, H., Chen, Z., Uzawa, J., Fujimoto, Y., 1998. A phenylpropanoid glycoside from *Vaccaria segetalis*. *Phytochemistry* 48, 569–571. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00896-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00896-0)
- Savic, V.L., Nikolic, V.D., Arsic, I.A., Stanojevic, L.P., Najman, S.J., Stojanovic, S., Mladenovic-Ranisavljevic, I.I., 2015. Comparative Study of the Biological Activity of Allantoin and Aqueous Extract of the Comfrey Root. *Phytother. Res.* 29, 1117–1122. <https://doi.org/10.1002/ptr.5356>
- Scalia, S., Callegari, R., Villani, S., 1998. Determination of glycolic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 795, 219–225.
- Schumacher, U., Higgs, D., Loizidou, M., Pickering, R., Leathem, A., Taylor, I., 1994. Helix pomatia agglutinin binding is a useful prognostic indicator in colorectal carcinoma. *Cancer* 74, 3104–3107. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19941215\)74:12<3104::AID-CNCR2820741207>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19941215)74:12<3104::AID-CNCR2820741207>3.0.CO;2-0)

- Scott, E.J.V., Yu, R.J., 1974. Control of Keratinization With α -Hydroxy Acids and Related Compounds: I. Topical Treatment of Ichthyotic Disorders. Arch. Dermatol. 110, 586–590. <https://doi.org/10.1001/archderm.1974.01630100046011>
- Shattuck, M.T., n.d. Continuous glycolic acid process. US 2443482 A.
- Shestopalov, A.V., Shkurat, T.P., Mikashinovich, Z.I., Kryzhanovskaya, I.O., Bogacheva, M.A., Lomteva, S.V., Prokof'ev, V.N., Gus'kov, E.P., 2006. Biological functions of allantoin. Biol. Bull. 33, 437–440. <https://doi.org/10.1134/S1062359006050037>
- Shin, H.-D., Suh, J.-H., Kim, J.-H., Lee, H.-Y., Eom, H.-Y., Kim, U.-Y., Yang, D.-H., Han, S.-B., Youm, J.-R., 2012. Determination of Betaine in Fructus Lycii Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. Bull. Korean Chem. Soc. 33, 553–558. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2012.33.2.553>
- Shubashini, S., Gopal, P., Lalitha, P., 2011. Allantoin from the leaves of *Pisonia grandis* R. Br Int J Pharm Life Sci 2, 815–817.
- Silva, P.S.P., Castro, R.A.E., Melro, E., Silva, M.R., Maria, T.M.R., Canotilho, J., Eusébio, M.E.S., 2015. Structural evidence of polymorphism and conformational isomorphism of a somewhat flexible molecule: *m*-anisic acid. J. Therm. Anal. Calorim. 120, 667–677. <https://doi.org/10.1007/s10973-014-4289-y>
- Smith, P.M.C., Atkins, C.A., 2002. Purine Biosynthesis. Big in Cell Division, Even Bigger in Nitrogen Assimilation. Plant Physiol. 128, 793–802. <https://doi.org/10.1104/pp.010912>
- Sowa, I., Paduch, R., Strzemski, M., Zielińska, S., Rydzik-Strzemska, E., Sawicki, J., Kocjan, R., Polkowski, J., Matkowski, A., Latański, M., Wójciak-Kosior, M., 2017. Proliferative and antioxidant activity of *Symphytum officinale* root extract. Nat. Prod. Res. 0, 1–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1326492>
- Spellman, M.C., Pincus, S.H., 1998. Efficacy and safety of azelaic acid and glycolic acid combination therapy compared with tretinoin therapy for acne. Clin. Ther. 20, 711–721.
- Szymańska, E., 2012. Allantoin - Healing and anti-inflammatory properties. Pediatr. Med. Rodz. 8, 73–77.
- Takahashi, K., 1972. A Colorimetric Method for Quantitative Determination of Glycolic Acid with 2, 7-Dihydroxynaphthalene. J. Biochem. (Tokyo) 71, 563–565. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129799>
- The Cornu problem, <http://www.molluscs.at/>, n.d.
- Tretter, L., Patocs, A., Chinopoulos, C., 2016. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg., EBEC 2016: 19th European Bioenergetics Conference 1857, 1086–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2016.03.012>
- Tribó-Boixareu, M.J., 2009. Clinical and Histological Efficacy of a Secretion of the Mollusk *Cryptomphalus aspersa* in the Treatment of Cutaneous Photoaging. Cosmet. Dermatol. 22.

- Tsoutsos, D., Kakagia, D., Tamparopoulos, K., 2009. The efficacy of *Helix aspersa* Müller extract in the healing of partial thickness burns: a novel treatment for open burn management protocols. *J. Dermatol. Treat.* 20, 219–222. <https://doi.org/10.1080/09546630802582037>
- Ueland, P.M., 2011. Choline and betaine in health and disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 34, 3–15. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9088-4>
- Van Scott, E.J., Ditre, C.M., Yu, R.J., 1996. Alpha-Hydroxyacids in the Treatment of Signs of Photoaging. *Clin. Dermatol.* 14, 217–226.
- Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V., 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.* 37, 1528–1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>
- Viscosity of Glycerol and Its Aqueous Solutions - Industrial & Engineering Chemistry (ACS Publications) [WWW Document], n.d. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie50501a040> (accessed 1.18.18).
- W. S. Loots, J.M., 1979. The effect of allantoin on cellular multiplication in degenerating and regenerating nerves. *S. Afr. Med. J.* 55, 53–56.
- Wandzilak, T.R., Hagen, L.E., Hughes, H., Sutton, R.A.L., Smith, L.H., Williams, H.E., 1991. Quantitation of glycolate in urine by ion-chromatography. *Kidney Int.* 39, 765–770. <https://doi.org/10.1038/ki.1991.94>
- Weber, D.J., Higgins, J.W., 1970. Potentiometric Titration of Allantoin in Cream Formulations. *J. Pharm. Sci.* 59, 1819–1821. <https://doi.org/10.1002/jps.2600591224>
- Wightman, F., Lighty, D.L., 1982. Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. *Physiol. Plant.* 55, 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb00278.x>
- Woo, K.C., Atkins, C.A., Pate, J.S., 1980. Biosynthesis of Ureides from Purines in a Cell-free System from Nodule Extracts of Cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp.] 1. *Plant Physiol.* 66, 735–739.
- Xu, B., Sung, C., Han, B., 2011. Crystal Structure Characterization of Natural Allantoin from Edible Lichen *Umbilicaria esculenta*. *Crystals* 1, 128–135. <https://doi.org/10.3390/cryst1030128>
- Yamamoto, S., Ohtomo, M., Komatsu, K., Takamatsu, T., Matsuoka, M., 1993. [Stability of allantoin and identification of its degradation compounds]. *Yakugaku Zasshi* 113, 515–524.
- Yao, H.H., Porter, W.H., 1996. Simultaneous determination of ethylene glycol and its major toxic metabolite, glycolic acid, in serum by gas chromatography. *Clin. Chem.* 42, 292–297.
- Yardim-Akaydin, S., Sepici, A., Ozkan, Y., Torun, M., Simşek, B., Sepici, V., 2004. Oxidation of uric acid in rheumatoid arthritis: is allantoin a marker of oxidative stress? *Free Radic. Res.* 38, 623–628.
- Yin, F., Hu, L., Pan, R., 2004. Novel dammarane-type glycosides from *Gynostemma pentaphyllum*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 52, 1440–1444.

- Yobi, A., Wone, B.W.M., Xu, W., Alexander, D.C., Guo, L., Ryals, J.A., Oliver, M.J., Cushman, J.C., 2013. Metabolomic profiling in *Selaginella lepidophylla* at various hydration states provides new insights into the mechanistic basis of desiccation tolerance. *Mol. Plant* 6, 369–385. <https://doi.org/10.1093/mp/sss155>
- Yu, R.J., Van Scott, E.J., 1995. Method of using glycolic acid for treating wrinkles. US 5385938 A.
- Zeisel, S.H., Mar, M.-H., Howe, J.C., Holden, J.M., 2003. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J. Nutr.* 133, 1302–1307.
- Βαρδινογιάννη, Κ., 2013. Σημειώσεις για τα χερσαία σαλιγκάρια. Μουσείο Φυσικής Ιστορίας Κρήτης Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης.
- Βαρδινογιάννη, Κ., Γκιώκας, Σ., Μυλωνάς, Μ., 2009. Το κόκκινο βιβλίο των απειλούμενων ζώων της Ελλάδας. Υπουργείου Περιβάλλοντος, Ενέργειας και Κλιματικής Αλλαγής.
- Θεοδωρίδης, Γ., n.d. Κεφάλαιο 12: Φασματομετρία Μάζας. p. 12/1-12/6.
- Κεφαλά, Β., 2014. Αισθητική προσώπου II-Θ Ενότητα 7: Εισαγωγή για τη γήρανση- ανατομία, ιστολογία και φυσιολογία δέρματος. Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας.
- Κουμπάρης, Μ.Α., Χατζηιωάννου, Θ.Π., 2003. Ενόργανη Ανάλυση. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Παπαϊωάννου, Γ., 2010. Κοσμητολογία: Συστατικά - Παρασκευή - Χρήση Καλλυντικών. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Παρμακέλης, Ά., 2000. Ανατομή σε χερσαίο γαστερόποδο, Ζωολογία 1. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης.