



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
«Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη,  
Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών  
προϊόντων»**

**Τίτλος Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας  
«Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της δραστηρότητας  
και της σταθερότητας αντιοξειδωτικών ουσιών που  
ενσωματώνονται στα καλλυντικά προϊόντα»**

**Του / Της**

**ΒΑΡΔΑΚΑΣΤΑΝΗ ΜΑΡΙΑ**

**A.M. 202114**

Παρουσιάστηκε για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων για την απονομή του  
Μεταπτυχιακού Τίτλου Σπουδών στο Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών του  
Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής

**Επιβλέπων: ΜΕΛΛΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ**

**ΑΘΗΝΑ, 2022**



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
SCHOOL OF HEALTH AND CARE SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES**

**Master of Science in Advanced Aesthetics and Cosmetic  
Science: Development-Quality Control and Safety of new  
cosmetic products**

**Master Thesis**

**“Analysis techniques/methods for the determination of  
activity and stability of antioxidants that are incorporated  
into cosmetic products”**

**By**

**VARDAKASTANI MARIA**

**R.N. 202114**

Presented for the partial fulfillment of the obligations for the award of the  
Master's Degree in the Department of Biomedical Sciences  
of the University of West Attica

**Supervisor: MELLOU FOTEINI**

**ATHENS, 2022**

## Τίτλος εργασίας

Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της δραστικότητας και της σταθερότητας  
αντιοξειδωτικών ουσιών που ενσωματώνονται στα καλλυντικά προϊόντα

## Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι  
Εξεταστική Επιτροπή:

| A/a | ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ       | ΒΑΘΜΙΑΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ  | ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ |
|-----|---------------------|--|------------------|
| 1   | ΜΕΛΛΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ      | Ακαδημαϊκός<br>Υπότροφος Τμήματος<br>Βιοϊατρικών Επιστημών/<br>Χημικός, MSc, Phd         |                  |
| 2   | ΒΑΡΒΑΡΕΣΟΥ ΑΘΑΝΑΣΙΑ | Καθηγήτρια Τμήματος<br>Βιοϊατρικών Επιστημών/<br>Φαρμακοποιός, MSc,<br>Phd               |                  |
| 3   | ΠΑΥΛΟΥ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ    | Ακαδημαϊκός<br>Υπότροφος Τμήματος<br>Βιοϊατρικών Επιστημών/<br>Φαρμακοποιός, MSc,<br>Phd |                  |

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Βαρδακαστάνη Μαρία του Διονυσίου, με αριθμό μητρώου 202114 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

\*Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι ..... και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Η Δηλούσα

Βαρδακαστάνη Μαρία / Αισθητικός-Κοσμητολόγος

Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα  
(Υπογραφή)

Πνευματική ιδιοκτησία © 2022 Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται

Copyright © 2022 University of West Attica

All rights reserved

# Περίληψη

Τίτλος ΔΕ

Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της δραστηρότητας και της σταθερότητας αντιοξειδωτικών ουσιών που ενσωματώνονται στα καλλυντικά προϊόντα

ΒΑΡΔΑΚΑΣΤΑΝΗ ΜΑΡΙΑ

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών

Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, 2022

Η αντιοξειδωτική ικανότητα αποτελεί ένα από τα πιο βασικά και σημαντικά χαρακτηριστικά στα καλλυντικά προϊόντα σήμερα. Ο σκοπός αυτής της εργασίας είναι ο εντοπισμός και η αξιολόγηση των μεθόδων ανάλυσης αντιοξειδωτικών ουσιών που ενσωματώνονται στα καλλυντικά προϊόντα και της σταθερότητάς τους. Αρχικά, μιλάμε για τη βλάβη που μπορεί να προκληθεί στα κύτταρα από δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και τις συνέπειές της (από τη γήρανση έως και τις εκφυλιστικές παθήσεις). Έπειτα, αναφερόμαστε σε κάποια από τα συχνά χρησιμοποιούμενα και γνωστά αντιοξειδωτικά στον τομέα της κοσμητολογίας, όπως είναι οι βιταμίνες (L-ασκορβικό οξύ, Νιασιναμίδη), οι φαινολικές ενώσεις (φλαβονοειδή) και τα καροτενοειδή (β-καροτένιο). Στο κύριο κομμάτι αυτής της εργασίας βλέπουμε κάποιες παραμέτρους αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας των καλλυντικών στο δέρμα και κυρίως αναλύουμε μερικές από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους ανάλυσης αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH, ABTS, FRAP, ORAC, β-Carotene Bleaching), τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους. Τέλος, αναφέρουμε κάποια συστήματα διαδερμικής χορήγησης των αντιοξειδωτικών, τα οποία συμβάλουν εξαιρετικά στη διατήρηση της σταθερότητας και της δραστηρότητάς τους, αλλά και μελέτες σταθερότητας που αφορούν τις συνθέσεις καλλυντικών προϊόντων και των αντιοξειδωτικών που ενσωματώνονται σε αυτά. Ολοκληρώνουμε με τα συμπεράσματα από τις γνώσεις που αποκομίσαμε κατά την έρευνα του θέματος.

**Λέξεις κλειδιά:** Αντιοξειδωτικά, Μέθοδοι ανάλυσης αντιοξειδωτικής δράσης, Μελέτες σταθερότητας, Συστήματα χορήγησης/μεταφοράς ουσιών

# Abstract

Thesis Title

Analysis techniques/methods for the determination of activity and stability of antioxidants that are incorporated into cosmetic products

VARDAKASTANI MARIA

Department of Biomedical Sciences

University of West Attica, 2022

Antioxidant activity is one of the most basic and important characteristics in cosmetic products these days. The purpose of this thesis is to identify and evaluate methods for the analysis of antioxidant substances incorporated in cosmetic products and their stability. Firstly, we refer to the cell damage that can be caused by reactive oxygen species (ROS) and its consequences (from aging to degenerative diseases). Then, we refer to some of the frequently used and well-known antioxidants in the field of cosmetology, such as vitamins (L-ascorbic acid, Niacinamide), phenolic compounds (flavonoids) and carotenoids (beta-carotene). In the main part of this thesis, we see some parameters for evaluating the effectiveness of cosmetics on skin and we, mainly, analyze some of the most frequently used antioxidant capacity analysis methods (DPPH, ABTS, FRAP, ORAC,  $\beta$ -Carotene Bleaching), with their advantages and disadvantages. Finally, we mention some systems for the transdermal delivery of antioxidants, which greatly contribute to maintaining their stability and activity, as well as stability studies concerning the formulation of cosmetic products and the antioxidants incorporated into them. We conclude with the conclusions from the knowledge we obtained during the research of the topic.

Key words: Antioxidants, Antioxidant assays, Antioxidant capacity, Stability studies, Stress tests, Delivery systems

# **Βιβλιογραφικό CV**

**Βαρδακαστάνη Μαρία**

«Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων»

Τίτλος: Αισθητικός - Κοσμητολόγος

Επιστημονικό Πεδίο: Αισθητικής - Κοσμητολογίας

Βιογραφικά Στοιχεία: Ημερομηνία Γέννησης 21/11/1992

Προσωπικά Στοιχεία: ak202114@uniwa.gr

Εκπαίδευση: Πτυχιούχος Τμήματος Αισθητικής και Κοσμητολογίας Τ.Ε.Ι. Αθήνας

Εκπλήρωσε τις απαιτήσεις για το Μεταπτυχιακό Τίτλο Σπουδών «Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία: Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια νέων καλλυντικών προϊόντων» στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, τον Οκτώβρη, 2022.

ΕΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΟΣ: Μέλλου Φωτεινή



# Πίνακας περιεχομένων

|  |    |
|--|----|
| Περίληψη.....  | 5  |
| Abstract .....   | 6  |
| Βιβλιογραφικό CV .....   | 7  |
| Πίνακας εικόνων .....  | 13 |
| Εισαγωγή.....  | 16 |
| Κεφάλαιο 1. Η γήρανση του δέρματος .....   | 17 |
| 1.1. Φωτογήρανση .....   | 17 |
| 1.2. Οξειδωτικό Στρες: Σχηματισμός Δραστικών Ειδών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), Ελευθέρων Ριζών (Free Radicals)..... | 18 |
| Κεφάλαιο 2. Αντιοξειδωτικά: τρόπος δράσης, διαχωρισμός, ενσωμάτωση σε καλλυντικά προϊόντα.....                                   | 22 |
| 2.1. Βιταμίνες .....   | 24 |
| 2.1.1. Βιταμίνη C (L-ασκορβικό οξύ, L-ascorbic acid / Vitamin C) .....   | 24 |
| 2.1.2. Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη, α-tocopherol / Vitamin E).....  | 25 |
| 2.1.3. Βιταμίνη B <sub>3</sub> (Νιασιναμίδη, Niacinamide / Vitamin B <sub>3</sub> ).....   | 25 |
| 2.1.4. Βιταμίνη A (Vitamin A) .....  | 26 |
| 2.2. Φαινολικές ενώσεις (Phenolics/Phenols) .....  | 27 |
| 2.2.1. Φαινολικά Οξέα (Phenolic Acids) .....   | 28 |
| 2.2.2. Φλαβονοειδή (Flavonoids).....   | 29 |
| 2.2.3. Στιλβένια (Stilbenes).....  | 32 |
| 2.3. Καροτενοειδή (Carotenoids) .....  | 32 |
| 2.4. Λιπίδια υδρολιπιδικού φραγμού (Hydrolipid barrier lipids) .....   | 35 |
| Κεφάλαιο 3. Παράμετροι αξιολόγησης αποτελεσματικότητας .....   | 37 |
| 3.1. Παράμετροι δέρματος που εξετάζονται και μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να υποστηριχθεί ο ισχυρισμός δράσης: .....         | 37 |
| 3.1.1. Συνοπτικά η οργανολογία:.....   | 37 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1.2. Προσδιορισμός Δείκτη μελανίνης / ερυθήματος (melanin / erythema index) / χρώσης δέρματος:.....                                       | 37 |
| 3.1.3. Προσδιορισμός Ελαστικότητας (elasticity) δέρματος:.....  | 38 |
| 3.1.4. Προσδιορισμός Λάμψης (radiance) δέρματος:.....   | 39 |
| 3.1.5. Προσδιορισμός Υδάτωσης (moisture) κερατίνης στιβάδας: .....  | 39 |
| 3.1.6. Προσδιορισμός Διαδερμικής απώλειας ύδατος (transepidermal water loss, TEWL) δέρματος:.....   | 39 |
| 3.1.7. Προσδιορισμός μικροτοπογραφίας δέρματος: .....   | 40 |
| 3.1.8. Ορατό αποτέλεσμα σύσφιξης / ανόρθωσης (visual lifting effect): .....   | 41 |
| 3.2. Μέθοδοι προσδιορισμού της διαβατότητας .....   | 41 |
| 3.2.1. Κυψελίδες διάχυσης (in vitro):.....  | 41 |
| 3.2.2. Διάταξη HPLC (in vivo):.....   | 41 |
| Κεφάλαιο 4. Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας και κατηγοριοποίησή τους .....   | 42 |
| 4.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας βάσει αλλαγής χρώσης σταθερών ελευθέρων ριζών .....                                       | 43 |
| 4.1.1. Μέθοδος DPPH* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-διφαινύλο-1-πίκρυλο-υδραζίνη) .....  | 43 |
| 4.1.2. Μέθοδος ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), 2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ)) ..... | 45 |
| 4.1.3. Μέθοδος DMPD <sup>+</sup> (N,N-διμεθυλο-p-φαινυλοδιαμίνης, N,N-dimethyl-p-phenylenediamine) .....                                    | 46 |
| 4.1.4. Μέθοδος EPR spectroscopy (Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού) ...   | 47 |
| 4.2. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας βάσει μέτρησης των προϊόντων οξειδωσης.....   | 47 |
| 4.2.1. Μέθοδος TBA (2-thiobarbituric acid, 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ) .....  | 48 |
| 4.2.2. Μέθοδος TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity, Ολική Ικανότητα Δέσμευσης Οξυριζών).....   | 49 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2.3. Μέθοδος β-Carotene Bleaching (Αποχρωματισμού του β-Καροτενίου).....  | 49 |
| 4.2.4. Μέθοδος ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, Ικανότητα Απορρόφησης Ριζών Οξυγόνου) .....  | 50 |
| 4.2.5. Μέθοδος HORAC (Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity) .....  | 50 |
| 4.2.6. Μέθοδος CAA (Cellular Antioxidant Activity, Κυτταρική Αντιοξειδωτική Δράση) .....  | 51 |
| 4.3. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης βάσει της ικανότητας των δειγμάτων να ανάγουν μέταλλα υψηλού οξειδωτικού σθένους .....        | 51 |
| 4.3.1. Μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power, Αντιοξειδωτική Ικανότητα Μείωσης Σιδήρου) .....                                     | 51 |
| 4.3.2. Μέθοδος CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity, Αντιοξειδωτική Ικανότητα Μείωσης Ιόντων Χαλκού) .....                      | 53 |
| 4.3.3. Μέθοδος FOX (Ferrous Oxidation–Xylenol Orange, Οξείδωση Δισθενούς Σιδήρου—Πορτοκαλί Ξυλενόλης).....                                  | 53 |
| 4.3.4. Μέθοδος FTC (Ferric Thiocyanate, Θειοκυανικού Σιδήρου).....  | 54 |
| 4.3.5. Έλεγχος της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Monitoring of Inhibition of Lipid Peroxidation) .....                             | 54 |
| 4.4. Άλλη κατηγορία: .....  | 55 |
| 4.4.1. Μέθοδος TRAP (Telomerase Repeated Amplification Protocol, Πρωτόκολλο Επαναλαμβανόμενης Ενίσχυσης Τελομεράσης) .....                  | 55 |
| 4.4.2. Φθορισμομετρικός Έλεγχος της αναστολής της οξείδωσης των πρωτεϊνών (Fluorometric Monitoring of Inhibition of Protein Oxidation)..... | 56 |
| Κεφάλαιο 5. Σταθερότητα αντιοξειδωτικών που ενσωματώνονται στα καλλυντικά προϊόντα .....  | 57 |
| 5.1. Συστήματα χορήγησης / μεταφοράς ουσιών .....   | 57 |
| 5.1.1. Πήκτωμα (Gel).....   | 57 |
| 5.1.2. Μικρο-/Νανο-γαλακτώματα (Micro-/Nano-emulsions) .....  | 58 |
| 5.1.3. Γαλακτώματα πολλαπλών φάσεων (Multiple Emulsions).....   | 59 |

|  |    |
|--|----|
| 5.1.4. Γαλακτώματα- πηκτώματα (Emulgels, Γαλακτώματα Υδροπηκτώματα, Emulsion Hydrogels).....                                 | 59 |
| 5.2. Νανο-κυστικές δομές (Nanovesicles) .....  | 60 |
| 5.2.1. Λιπосώματα (Liposomes) .....  | 60 |
| 5.3. Έλεγχος/Μελέτες σταθερότητας (Stability Studies).....   | 64 |
| 5.3.1. Δοκιμές Καταπόνησης/Ακραίων συνθηκών (Stress Testing) .....   | 65 |
| 5.3.2. Επιλογή Παρτίδων (Selection of Batches) .....   | 65 |
| 5.3.3. Συσσκευασία (Container Closure System).....   | 66 |
| 5.3.4. Προδιαγραφές (Specifications) .....   | 66 |
| 5.3.5. Συχνότητα Δοκιμών (Testing Frequency).....  | 66 |
| 5.3.6. Συνθήκες Αποθήκευσης (Storage Conditions).....  | 67 |
| 5.3.7. Δέσμευση για σταθερότητα (Stability Commitment) .....   | 67 |
| 5.3.8. Ρεολογικές Ιδιότητες (Rheological Properties):.....   | 68 |
| 5.3.9. Αποτελεσματικότητα παγίδευσης (Entrapment Efficiency): .....  | 68 |
| 5.3.3. Δυναμικό Ζήτα (Zeta Potential), Μέγεθος Ζήτα (Zeta Size), Παράγοντας Πολυδιασποράς (Polydispersity Index, PDI): ..... | 68 |
| 5.3.10. Κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης:.....  | 69 |
| 5.3.11. Μορφολογική ανάλυση:.....  | 70 |
| 5.4. Βασικός Σχεδιασμός Ανάπτυξης Νέας Σύνθεσης (Formulation) .....  | 71 |
| 5.4.1. Διερεύνηση Παραγόντων Σταθερότητας Καλλυντικού: .....   | 71 |
| 5.4.2. Βασικοί Παράμετροι Μελέτης κατά το σχεδιασμό των stability tests και της πρόβλεψης ζωής του προϊόντος.....            | 72 |
| 5.4.3. Χρονοδιάγραμμα δοκιμών σύνθεσης (Formulation).....  | 72 |
| 5.4.4. Χρονοδιάγραμμα Ειδών Μελετών Σταθερότητας (Stability Tests):.....   | 73 |
| 5.4.5. Δοκιμές Ψύξης-Απόψυξης (Freeze / Thaw Cycles Tests): 4-6 κύκλους.....   | 73 |
| 5.4.6. Μελέτες Φωτοσταθερότητας (Light Stability):.....  | 74 |
| 5.4.7. Μηχανικά τεστ (Shock tests):.....   | 74 |
| 5.4.8. Πρακτικός Οδηγός Σχεδιασμού Μελέτης Σταθερότητας:.....  | 74 |

|   |    |
|---|----|
| 5.5. Πραγματικές Μελέτες Σταθερότητας.....    | 75 |
| 5.5.1. Ασταξανθίνη (Astaxanthin) .....        | 75 |
| 5.5.2. Φερουλικό οξύ (Ferulic Acid) .....     | 81 |
| 5.5.3. Κουρκουμίνη (Curcumin).....            | 81 |
| 5.5.4. Γαλακτώματα- πηκτώματα (Emulgels)..... | 85 |
| Επίλογος.....                                 | 86 |
| Βιβλιογραφία.....                             | 87 |

## Πίνακας εικόνων

|  |    |
|--|----|
| Εικόνα 1. Σύγκριση όψης φυσικά γηρασμένου δέρματος (αριστερό μέρος φωτογραφίας) με την όψη φωτογηρασμένου δέρματος (δεξί μέρος φωτογραφίας).   | 18 |
| Εικόνα 2. Αναπαράσταση της επίδρασης ελευθέρων ριζών και της πρόκλησης οξειδωτικού στρες στο κύτταρο.  | 19 |
| Εικόνα 3. Αναπαράσταση δημιουργίας ελευθέρων ριζών από φυσικούς και τεχνητούς παράγοντες.  | 19 |
| Εικόνα 4. Δράσεις αντιοξειδωτικών (αριστερά) και προ-οξειδωτικών (δεξιά).  | 20 |
| Εικόνα 5. Μοριακή δομή ασκορβικού οξέος.   | 24 |
| Εικόνα 6. Μοριακή δομή α-τοκοφερόλης.  | 25 |
| Εικόνα 7. Μοριακή δομή Νιασιναμίδης (Βιταμίνης Β3).  | 25 |
| Εικόνα 8. Μοριακή δομή Βιταμίνης Α.  | 26 |
| Εικόνα 9. Μορφές Βιταμίνης Α. Αριστερά: Ενεργές Μορφές Βιταμίνης Α (ρετινόλη, ρετινάλη/ρετιναλδεΐδη, ρετινοϊκό οξύ), Προσχηματισμένη Βιταμίνη Α (ρετινυλεστέρας). Δεξιά: Προβιταμίνη Α (β-καροτένιο, α-καροτένιο, β-κρυπτοξανθίνη, α-κρυπτοξανθίνη). | 26 |
| Εικόνα 10. Ταξινόμηση των φυτικών φαινολικών ενώσεων.  | 27 |
| Εικόνα 11. Κατηγορίες Φλαβονοειδών.  | 30 |
| Εικόνα 12. Μοριακή δομή ισοφλαβονών: Genistein, Daidzein, Biochanin A.   | 31 |
| Εικόνα 13. Μοριακή δομή ρεσβερατρόλης.   | 32 |
| Εικόνα 14. Τυπικά καροτενοειδή. Αριστερά: Καροτένια (με τη σειρά: λυκοπένιο, α-καροτένιο, β-καροτένιο, γ-καροτένιο, δ-καροτένιο). Δεξιά: Ξανθοφύλλες (με τη σειρά: κρυπτοξανθίνη, ασταξανθίνη, λουτεΐνη, κανθαξανθίνη, ζεαξανθίνη).                  | 33 |
| Εικόνα 15. Μοριακή δομή λιπιδίων του δέρματος.   | 35 |
| Εικόνα 16. Αντίδραση μεταξύ DPPH• και αντιοξειδωτικού για το σχηματισμό DPPH-H.  | 44 |
| Εικόνα 17. Μηχανισμός μεταφοράς υδρογόνου (HAT).   | 44 |
| Εικόνα 18. Σχηματισμός ABTS*+ μέσω αντίδρασης με υπερθειικό κάλιο.   | 46 |
| Εικόνα 19. Μοριακή δομή της Ν,Ν-διμεθυλο-ρ-φαινυλοδιαμίνης (DMPD).   | 46 |
| Εικόνα 20. Σχηματισμός συμπλόκου TBA-MA.   | 48 |
| Εικόνα 21. Α) Σχηματισμός συμπλέγματος Fe <sup>2+</sup> -TPTZ από Fe <sup>3+</sup> -TPTZ μέσω δράσης αντιοξειδωτικής ουσίας. Β)Αλλαγή χρώσης διαλύματος μετά από δράση αντιοξειδωτικού.  | 52 |
| Εικόνα 22. Αντίδραση οξειδοαναγωγής συμπλέγματος χαλκού-νεοκουπροΐνης και Trolox.  | 53 |
| Εικόνα 23. Σχηματισμός συμπλέγματος Fe <sup>3+</sup> -ΧΟ από Fe <sup>2+</sup> + οξειδωτικό   | 54 |
| Εικόνα 24. Διαφορετικοί τύποι λιποσωμάτων. Πολυστιβαδικά (MLVs), Μεγάλα μονοστιβαδικά (LUVs), Μικρά μονοστιβαδικά (SUVs)   | 61 |
| Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση ενθυλάκωσης δραστικών ουσιών σε Λιπόσωμα. ● : Υδροφιλική ουσία, ▼ : Υδροφοβική ουσία, ◀ : Φορτισμένη υδροφιλική ουσία, ♀ : Λιπίδιο   | 62 |
| Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση ενθυλάκωσης δραστικών ουσιών σε διαφορετικούς τύπους νανοκυστικών δομών. ● : Λιπόσωμα, ● : Αιθόσωμα, ● : Τρανσφερόσωμα, ● : Επιφανειοδραστικό  |    |

Τρανσφεροσώματος (μονής αλυσίδας), ●: Επιφανειοδραστικό Νιωσώματος (μονής αλυσίδας), ●: Φυτόσωμα, ◆: Υδρόφοβη δραστική ουσία, ▲: Υδρόφιλη δραστική ουσία, ◐: Αιθανόλη, ☞: Υδρόφοβη ουρά φωσφολιπιδίου/επιφανειοδραστικού \_\_\_\_\_ 63

Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση ενθυλάκωσης δραστικών ουσιών σε Τρανσφερόσωμα (αριστερό μισό), Λιπόσωμα (δεξιό μισό). ■: Υδρόφιλη δραστική ουσία, ►: Υδρόφοβη δραστική ουσία, ●: Ενεργοποιητής άκρων (Edge activator), ●: Φωσφατιδυλοχολίνη και άλλα λιπίδια \_\_\_\_\_ 63

Εικόνα 28. Αναπαράσταση διείσδυσης λιποσωμάτων στο δέρμα ανάλογα με τη δομή τους. \_\_\_\_\_ 64

## **Συντμήσεις, ακρωνύμια, σύμβολα και ορισμοί**

ROS: Reactive Oxygen Species

RNS: Reactive Nitrogen Species

RSS: Reactive Sulfur Species

RCS: Reactive Chloride Species

TPC: Total Phenolic Content

TAC: Total Antioxidant Capacity

EGCG: epigallocatechin-3-gallate

TEWL: Transepidermal Water Loss

HPLC: High-performance liquid chromatography

SELS: Surface Evaluation of Living Skin

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid

DMPD: N,N-dimethyl-p-phenylenediamine

EPR spectroscopy: Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy

TBA: 2-thiobarbituric acid

TOSC: Total Oxyradical Scavenging Capacity

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity

HORAC: Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity

CAA: Cellular Antioxidant Activity

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

CUPRAC: Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity

FOX: Ferrous Oxidation–Xylenol Orange

FTC: Ferric Thiocyanate

TRAP: Telomerase Repeated Amplification Protocol

MVV: Multivesicular vesicles

MLV: Multilamellar vesicles

ULV: Unilamellar vesicles

LUV: Large unilamellar vesicles

SUV: Small unilamellar vesicles



## Εισαγωγή

Οι τελευταίες εξελίξεις στη σύνθεση καλλυντικών θέλουν τα αντιοξειδωτικά και την αντιοξείδωση στον πρώτο ρόλο ως δραστικές ουσίες και ως ισχυρισμό, αντίστοιχα. Η έρευνα των αντιοξειδωτικών εξελίσσεται όλο και περισσότερο αφού αυτά τα πολυδραστικά μόρια ενδιαφέρουν πολλούς τομείς, όπως τη Διατροφολογία, την Ιατρική και τη Κοσμητολογία. Κατέχουν πολύπλευρα οφέλη για τον οργανισμό αλλά παρουσιάζουν και σημαντικές δυσκολίες στην συμπερίληψή τους σε συνθέσεις. Σε πρώτο στάδιο η έρευνα ασχολείται με την αποτελεσματικότητα μίας ουσίας όσον αφορά την αντιοξείδωση και έπειτα με την ενσωμάτωσή της στη σύνθεση με σκοπό να εκμεταλλευτεί τα οφέλη της. Κατά συνέπεια όταν η ουσία ενσωματωθεί στο καλλυντικό και καταλήξει στον ιστό στόχο, θέλουμε να διατηρεί τη σταθερότητά της (φυσικοχημικά), οπότε να προσδίδει τα ίδια χαρακτηριστικά και ιδιότητες που ισχυριζόμαστε ότι κατέχει. Υπάρχουν πολλοί τρόποι να προσδιορισθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα και θα αναλύσουμε κάποιους από αυτούς, όπως τα αντιδραστήρια DPPH, FRAP, CUPRAC, ABTS, ORAC, κ.ά. Όπως υπάρχουν και πολλοί τρόποι να εξασφαλιστεί η σταθερότητα του αντιοξειδωτικού μέσα σε συνθέσεις, μέσω συστημάτων τοπικής χορήγησης δραστικών ουσιών. Όλα αυτά θα τα αναλύσουμε μέσα σε αυτή την εργασία προκειμένου να παρουσιάσουμε κάποιες από τις μεθόδους ανάλυσης αποτελεσματικότητας αντιοξειδωτικών και να συμπεράνουμε ποιες παραμέτρους λαμβάνουμε υπόψιν, ώστε οι επιλογές μας να οδηγήσουν σε μια αποτελεσματική σύνθεση.

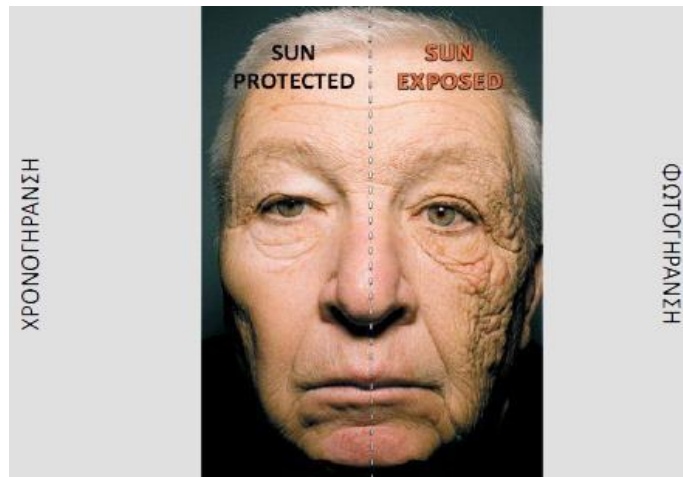
## **Κεφάλαιο 1. Η γήρανση του δέρματος**

Η γήρανση του δέρματος οφείλεται σε ενδογενείς (φυσικούς) παράγοντες, όπως είναι τα γονίδια, ο κυτταρικός μεταβολισμός, οι ορμόνες, οι μεταβολικές διαδικασίες του κυττάρου, αλλά και εξωγενείς (περιβαλλοντικούς) παράγοντες, όπως είναι η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, η ρύπανση του περιβάλλοντος, η ιονίζουσα ακτινοβολία, τα χημικά και οι τοξίνες. Στο σύνολό τους, οδηγούν σε βλάβες στη δομή του δέρματος και σε μετατροπές της φυσιολογίας του, που είναι εμφανείς στην όψη του. [1]

Ενώ η φυσική γήρανση έχει γενετικά προκαθορισμένη εξέλιξη, η γήρανση που οφείλεται σε εξωτερικούς παράγοντες μπορεί να προληφθεί. Τρόποι πρόληψής της είναι η αποφυγή εκτεταμένης έκθεσης στον ήλιο, η χρήση κατάλληλης φωτοπροστασίας, η χρήση ρετινοειδών για την ενίσχυση της παραγωγής κολλαγόνου και τον περιορισμό της δράσης της κολλαγενάσης, η χρήση αντιοξειδωτικών για τη μείωση και εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών. Επομένως, η πρόληψη είναι στα χέρια του ατόμου, αφού αφορά τη φροντίδα του δέρματός του στο σπίτι αλλά και τον τρόπο ζωής του. [2]

### **1.1. Φωτογήρανση**

Η χρόνια έκθεση του δέρματος στην υπεριώδη ακτινοβολία, η συσσωρευτική επίδρασή της σε αυτό, το φαινόμενο της τρύπας του όζοντος, ο καπνός του τσιγάρου, η ρύπανση του περιβάλλοντος και άλλα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στην κλινική εικόνα του δέρματος, οι οποίες εκφράζονται ως φωτογήρανση. Παρατηρούνται βλάβες στα μιτοχόνδρια, οξείδωση πρωτεϊνών και αποκρίσεις βλάβης του DNA βασισμένες σε τελομερή. Κατά συνέπεια, σε αντίθεση με το λεπτό, ατροφικό, με λεπτές ρυτίδες και ξηρό, ενδογενώς γηρασμένο δέρμα, το πρώιμο φωτογηρασμένο δέρμα εμφανίζει χαρακτηριστικά όπως μεταβλητό επιδερμικό πάχος (πάχυνση και λέπτυνση κατά τόπους), αλλαγές στη χρώση/δείκτη μελανίνης (melanin index) σε μορφή κηλίδων (διαφόρου μεγέθους), βαθιές ρυτίδες, δερματική ελάστωση, μείωση / κατακερμάτιση του κολλαγόνου, αυξημένη αποικοδόμηση μεταλλοπρωτεϊνών, επιδερμική χαλάρωση, τραχύτητα, ξηρότητα/αφυδάτωση και τηλεαγγειεκτασίες. [1]– [3], (Εικόνα 1)



Εικόνα 1. Σύγκριση όψης φυσικά γηρασμένου δέρματος (αριστερό μέρος φωτογραφίας) με την όψη φωτογηρασμένου δέρματος (δεξί μέρος φωτογραφίας).

Τα παραπάνω αποδίδονται στο οξειδωτικό στρες (oxidative stress) των κυττάρων, στις οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες, και πιο ουσιαστικά στην ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και της ικανότητας των αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού να τις αποδομήσουν. Έτσι, η φωτογήρανση συσχετίζεται με την παθογένεια των διαταραχών μελάγχρωσης του δέρματος (υπομελάγχρωση, υπερμελάγχρωση, μέλασμα, κ.ά.), την εμφάνιση μελανώματος και άλλων χρόνιων παθήσεων του δέρματος. [2], [4], [5]

## 1.2. Οξειδωτικό Στρες: Σχηματισμός Δραστικών Ειδών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), Ελευθέρων Ριζών (Free Radicals)

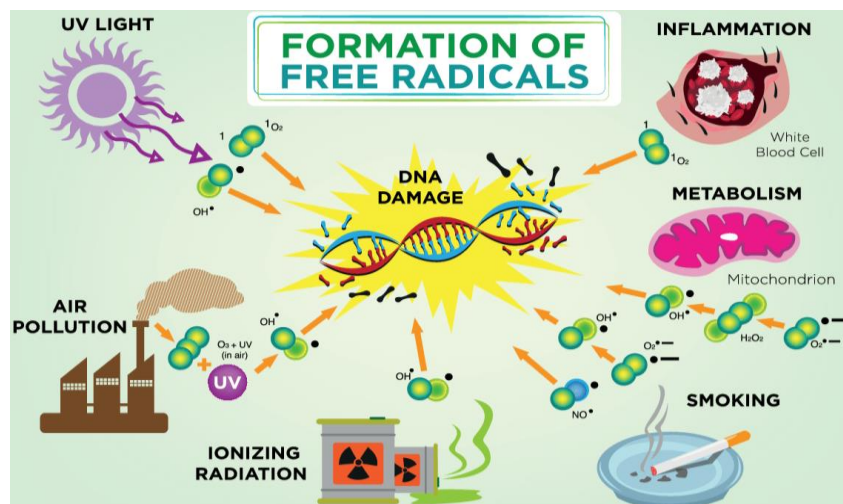
Η οξείδωση είναι μια χημική αντίδραση που περιλαμβάνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων (ET, electron transfer) μεταξύ προ-οξειδωτικών και αναγωγικών παραγόντων. Οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό, αλλά μπορούν να αποτελέσουν και πηγή δραστικών ειδών (reactive species). [6] Τα δραστικά είδη κατηγοριοποιούνται σε 4 βασικές ομάδες: τα δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), τα δραστικά είδη αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS), τα δραστικά είδη θείου (Reactive Sulfur Species, RSS), και τα δραστικά είδη χλωρίου (Reactive Chloride Species, RCS). Μεταξύ αυτών των ειδών, γνωρίζουμε ότι τα ROS είναι τα πιο πλούσια παραγόμενα. Περιέχουν είδη οξυγόνου συμπεριλαμβανομένων των: ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου (superoxide anion radical,  $O_2^{\cdot-}$ ), ρίζα υδροξυλίου (hydroxyl radical,  $OH^{\cdot}$ ), ιόν υδροξυλίου (hydroxyl ion,  $OH^-$ ), υπεροξείδιο του υδρογόνου (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ ), απλό οξυγόνο (singlet oxygen,  $^1O_2$ ) και όζον ( $O_3$ ). [4]

Τα ROS έχουν την ικανότητα να επεμβαίνουν στη σύνθεση του κολλαγόνου και να αλλοιώνουν αυτό και την ελαστίνη. Βλάπτουν, επίσης, τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, οδηγώντας στη μείωση κεραμιδίων και αραχιδονικού οξέος, με συνέπεια την αύξηση της διαδερμικής απώλειας ύδατος (transepidermal water loss, TEWL) και την πρόκληση φλεγμονώδους κατάστασης. Ένα είδος ROS είναι οι ελεύθερες ρίζες (free radicals), οι οποίες προκαλούν το οξειδωτικό στρες των κυττάρων (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Αναπαράσταση της επίδρασης ελευθέρων ριζών και της πρόκλησης οξειδωτικού στρες στο κύτταρο.

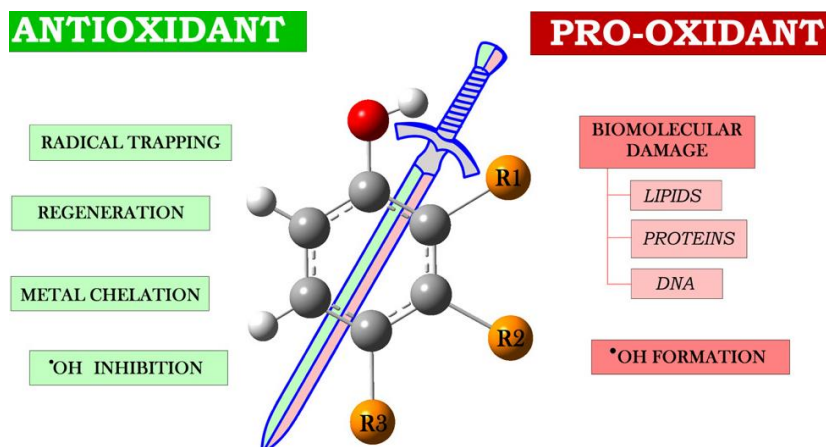
Η παραγωγή ROS μπορεί να ενεργοποιηθεί από εξωγενείς παράγοντες, ως απόκριση σε περιβαλλοντικούς ρύπους, υπεριώδη ακτινοβολία, τοξικές χημικές ουσίες και φάρμακα, αλλά και από ενδογενείς παράγοντες, όπως ένζυμα NOX στην πλασματική μεμβράνη, μυελοϋπεροξειδάσες (myeloperoxidases, MPO) στα φαγοκύτταρα, και ως παραπροϊόντα της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια (Εικόνα 3). Αποτελείται από μια αλυσίδα αντιδράσεων, που ξεκινάει από την παραγωγή  $O_2^{\cdot-}$  μέσα στα κύτταρα, υποβοηθούμενη από ενδο- και εξω- κυτταρικούς παράγοντες. [4]



Εικόνα 3. Αναπαράσταση δημιουργίας ελευθέρων ριζών από φυσικούς και τεχνητούς παράγοντες.

Υπό κανονικές συνθήκες ο σχηματισμός και η αποδόμηση των ROS ρυθμίζεται με τη βοήθεια ενδογενών αντιοξειδωτικών/δεσμευτών ROS του οργανισμού, ώστε να

διατηρηθεί η ισορροπία μεταξύ της ποσότητας νέων που σχηματίζονται και αυτών που αποδομούνται και να αποφευχθούν οι βλαβερές συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Γνωστά ενδογενή αντιοξειδωτικά είναι: υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (glutathione peroxidases, GPx), καταλάσες (catalases, CAT) και υπεροξειδικές δισμουτάσες (superoxide dismutases, SOD). Ωστόσο, η διαδικασία της καταστροφής τους μπορεί να κορεστεί, λόγω υπερπαραγωγής τους ή/και ανεπαρκούς αποδόμησής τους και να προκύψουν αυξημένα επίπεδα ROS, τα οποία θα οδηγήσουν σε μόνιμες αλλαγές ή/και βλάβες του DNA, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, και σημαντικές συνέπειες, όπως απόπτωση, μεταλλαξιγένεση, καρκινογένεση και ίνωση. Προκειμένου να ανακτηθεί η ισορροπία του συστήματος, τα προ-οξειδωτικά προχωρούν σε σύζευξη των ηλεκτρονίων τους με αυτά βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων, των λιποπρωτεϊνών και του DNA και σε τροποποίηση των λειτουργιών αυτών, προκαλώντας κυτταρικές δυσλειτουργίες ή/και κυτταρικό θάνατο. [1], [4], [5], [7]–[9], (Εικόνα 4)



Εικόνα 4. Δράσεις αντιοξειδωτικών (αριστερά) και προ-οξειδωτικών (δεξιά).

Η βλάβη αυτή στα κύτταρα σταδιακά οδηγεί σε γήρανση, χρόνιες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, καρδιαγγειακές, φλεγμονώδεις και άλλες εκφυλιστικές παθήσεις του ανθρώπινου οργανισμού (σκλήρυνση κατά πλάκας, νόσος Πάρκινσον, γεροντική άνοια, αυτοάνοσα νοσήματα). [9]–[11]

Οι προσεγγίσεις που μπορούμε να έχουμε για την πρόληψη και προστασία ενάντια της φωτογήρανσης του δέρματος, και της πρόιμης γήρανσης που αυτή προκαλεί, είναι πολλές. Μια προσέγγιση είναι η εξουδετέρωση των δραστικών φωτοχημικών

μεσολαβητών , όπως είναι τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Αυτό μπορεί να γίνει μέσω διατροφής ή/και τοπικής εφαρμογής αντιοξειδωτικών. [12] Η τοπική εφαρμογή καλλυντικών που εμπεριέχουν αντιοξειδωτικές ουσίες είναι μια μη-επεμβατική μέθοδος, η οποία μας επιτρέπει να αντιμετωπίσουμε κυτταρικές και μοριακές βλάβες που έχουν προκληθεί από τις ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες παραγόντων που ενσωματώνονται σε αντιγηραντικές κρέμες, τα αντιοξειδωτικά και οι ρυθμιστές κυττάρων. Αντιοξειδωτικά που ενσωματώνονται είναι οι βιταμίνες, οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή. Αυτά μειώνουν την αποδόμηση του κολλαγόνου εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες στους ιστούς. Οι ρυθμιστές κυττάρων που ενσωματώνονται είναι οι ρετινόλες, τα πεπτίδια και οι αυξητικοί παράγοντες. Αυτοί έχουν άμεση επίδραση στο μεταβολισμό του κολλαγόνου και επηρεάζουν την παραγωγή αυτού και των ελαστικών ινών. [3]

## **Κεφάλαιο 2. Αντιοξειδωτικά: τρόπος δράσης, διαχωρισμός, ενσωμάτωση σε καλλυντικά προϊόντα**

Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν τις ουσίες -χημικές ενώσεις ή φυσικά προϊόντα- που έχουν τη δυνατότητα να επιβραδύνουν ή και να αναστείλουν την οξείδωση που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες και να βοηθήσουν στην εξισορρόπηση των επιδράσεων του οξειδωτικού στρες. Παίζουν χαρακτηριστικό ρόλο στην προστασία φυτών και ζώων από ασθένειες καθώς και για το αμυντικό σύστημα. [7] «Δεσμεύουν» τις ελεύθερες ρίζες παρεμποδίζοντας, έτσι, την καταστροφική δράση τους. Πιο συγκεκριμένα, υποβιβάζουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια, με συνέπεια τη μείωση των κυτταρικών βλαβών, που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες. Όλες οι ουσίες οι οποίες σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με αυτή ενός υποστρώματος επιβραδύνουν σημαντικά ή αναστέλλουν την οξείδωσή του, μπορούν να χαρακτηριστούν ως αντιοξειδωτικά. Ένα μόριο αντιοξειδωτικού μπορεί να εξουδετερώσει αρκετές ελεύθερες ρίζες πριν ολοκληρωθεί η δράση του και αυτό τα καθιστά πολύ καλούς υποψήφιους για την ενσωμάτωση τους σε αντηλιακά, σε αντιγηραντικά, αλλά και σε καλλυντικά γενικότερα. Ειδικά τα φυσικά αντιοξειδωτικά, αφού έχουν χαμηλότερη πιθανότητα να προκαλέσουν παρενέργειες, σε φυσιολογικές για τον οργανισμό συγκεντρώσεις, δείχνουν πολλά υποσχόμενα για τη φωτοπροστασία. Η θεραπευτική εφαρμογή αντιοξειδωτικών για φωτοπροστασία βασίζεται στην υπόθεση του οξειδωτικού στρες του κυττάρου. Αν αυτή η υπόθεση είναι σωστή, η παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου, η εξάντληση αντιοξειδωτικών, η βλάβη που προκαλείται από τα δραστικά είδη οξυγόνου, και η ενεργοποίηση των ευαίσθητων σε οξειδοαναγωγή οδών μεταγωγής σήματος είναι αναμενόμενα στο δέρμα που έχει υποστεί ακτινοβόληση. Ο κατάλληλος χειρισμός (ενίσχυση) των αντιοξειδωτικών του δέρματος θα επηρεάσει αυτές τις μοριακές αλλαγές και τις επακόλουθες βιολογικές και κλινικές συνέπειές τους. Η παρουσία αντιοξειδωτικού στο δέρμα, πριν και μετά την έκθεσή του σε ακτινοβολία, φάνηκε να συμβάλει στη μείωση των επιβλαβών συνεπειών της. Έχουν, λοιπόν, αποδειχθεί ωφέλιμα στη διατήρηση της υγείας, στη διαχείριση ασθενειών σχετιζόμενων με τη γήρανση, στη βελτίωση των επιβλαβών συνεπειών, φυσικών και χημικών, τοξικών παραγόντων. [8], [13]

Συμπεριλαμβάνουν ποικιλία ουσιών με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Μπορούν να διαχωρισθούν σε δύο ομάδες βάσει του τρόπου δράσης τους, τα πρωτεύοντα αντιοξειδωτικά, τα οποία είναι οξειδωτικά διάσπασης μίας αλυσιδωτής

αντίδρασης και τα δευτερεύοντα αντιοξειδωτικά ή αλλιώς προληπτικά αντιοξειδωτικά. Ένα πρωτεύον αντιοξειδωτικό αναστέλλει την εκκίνηση αλυσιδωτής αντίδρασης, δεσμεύοντας τις ρίζες που παρήχθησαν από την αντίδραση του υποστρώματος με κάποια ενεργή μορφή οξυγόνου και ένα δευτερεύον αντιοξειδωτικό καθυστερεί το ρυθμό οξείδωσης. [13]

Επίσης, μπορούν να χωριστούν σε δύο ακόμα κατηγορίες, στα ενζυμικά και στα μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Παρότι το δέρμα περιέχει εκ φύσεως πολλά αντιοξειδωτικά ένζυμα (υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης), αλλά και μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά μόρια (τοκοφερόλη (βιταμίνη E), συνένζυμο Q10, ασκορβικό (βιταμίνη C) και καροτενοειδή), αυτά δεν είναι επαρκή και τείνουν να μειώνονται όσο μεγαλώνει το άτομο. Πολλά από αυτά, όπως είναι οι βιταμίνες C και E, δεν παράγονται ενδογενώς, οπότε πρέπει να προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής ή με τοπική εφαρμογή. [13]

Η ικανότητα ορισμένων φυτοχημικών εκχυλισμάτων να καταστείλουν ή να καθυστερήσουν την οξείδωση μορίων μέσω καταστολής της έναρξης ή της εξάπλωσης αλυσιδωτών οξειδωτικών αντιδράσεων, τα καθιστά σημαντικούς υποψήφιους ως εναλλακτικές στην ιατρική. Αυτά τα φυσικά αντιοξειδωτικά αποτελούνται από φαινολικές ενώσεις (φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και τοκοφερόλες), από ενώσεις αζώτου (αλκαλοειδή, παράγωγα χλωροφύλλης, αμίνες και αμινοξέα), από καροτενοειδή και από ασκορβικό οξύ. [9] Πιθανοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες είναι, επίσης, η σεσαμόλη, η κουρκουμίνη, το φερουλικό οξύ. Άλλα αντιοξειδωτικά, όπως το γαλλικό οξύ και το BHT χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά στις βιομηχανίες τροφίμων και ως πρότυπα αναφοράς στην αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων καθαρών ενώσεων ή φυτικών εκχυλισμάτων. Πολλά από τα φυσικά αντιοξειδωτικά έχουν απομονωθεί, αναλυθεί και έχουν ποικιλία εφαρμογών. Η χημική δομή αυτών των καθαρών ενώσεων συναντάται διαφοροποιημένη στη φύση. Κατά συνέπεια, η συσχέτιση της δομής και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους καθίσταται δύσκολη. [8], [10]

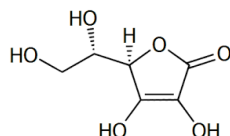
Εν κατακλείδι, τα αντιοξειδωτικά έχουν ευρύ φάσμα εφαρμογών γι' αυτό και η κατανόηση της επίδρασής τους, φυσικών και συνθετικών, στη μείωση των βλαβερών συνεπειών της ακτινοβολίας και του οξειδωτικού στρες των κυττάρων, *in vitro* και *in vivo*, είναι μεγάλης σημασίας, όπως και η εξέλιξή τους μελλοντικά παρουσιάζει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον.



## 2.1. Βιταμίνες

Οι βιταμίνες A, C, και E, και αυτές του συμπλόκου B, βοηθούν στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και στη μείωση φλεγμονωδών καταστάσεων. Εκτός των άλλων, έχουν αντιοξειδωτική λειτουργία, καθώς βοηθούν να αντιμετωπιστούν οι επιδράσεις του οξειδωτικού στρες που οδηγούν σε χρόνιες παθήσεις. [14] Οι βιταμίνες C και E δρουν συνεργιστικά για την καταπολέμηση ελευθέρων ριζών, αφού η βιταμίνη C έχει την ιδιότητα να επαναφέρει την οξειδωμένη μορφή της στην πρότερη κατάστασή της. Οι βιταμίνες C, B<sub>3</sub> και E ανήκουν στα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά, επειδή χάρη στο μικρό μοριακό τους βάρος, απορροφούνται πολύ εύκολα. Η βιταμίνη E προστίθεται συχνά σε αντηλιακά, ενώ η C είναι πολύ πιο περίπλοκο να ενσωματωθεί, καθώς οξειδώνεται πολύ γρήγορα στην επαφή με τον αέρα. Η έρευνα και ανάπτυξη στη βιομηχανία των καλλυντικών έχει καταφέρει να κατασκευάσει πιο σταθερές μορφές της βιταμίνης C (συνήθως βρίσκεται ενθυλακωμένη), ώστε να γίνει πιο εύκολη η ενσωμάτωσή της στα καλλυντικά προϊόντα και η χρήση της από τον καταναλωτή.

### 2.1.1. Βιταμίνη C (L-ασκορβικό οξύ, L-ascorbic acid / Vitamin C)

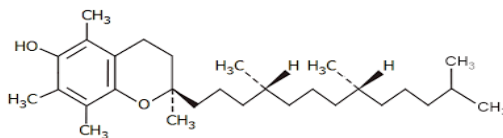


Εικόνα 5. Μοριακή δομή ασκορβικού οξέος.

Η βιταμίνη C παρουσιάζεται σε 2 μορφές: το L-ασκορβικό οξύ και την οξειδωμένη μορφή, το δεϋδρο-L-ασκορβικό οξύ. Το L-ασκορβικό οξύ είναι ένα αντιοξειδωτικό, το οποίο αποτελεί την βιολογικά ενεργή μορφή της βιταμίνης C και είναι αυτό που ανευρίσκεται πιο πλούσιο στο δέρμα. Εντοπίζεται στην υδατική φάση του κυττάρου, μπορεί να αντιδράσει άμεσα με ρίζες υδροξυλίου (hydroxyl radicals) και λιπιδικές ρίζες υπεροξυλίου (lipid peroxy radicals), σχηματίζοντας νερό H<sub>2</sub>O και λιπιδικά υδροϋπεροξειδία. Δρα δεσμεύοντας τις ρίζες και ανακυκλώνοντας τη βιταμίνη E και τη γλουταθειόνη. Καθώς είναι ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό, δρα ενάντια στη φωτογήρανση και στη μελανογένεση και υποστηρίζει τη βιοσύνθεση και τη διατήρηση της σταθερότητας του κολλαγόνου. Είναι υδατοδιαλυτό, θερμικά ασταθές και όταν προορίζεται για τοπική εφαρμογή παρασκευάζεται σε συγκεντρώσεις 5% και 15%, έχει αντιγηραντικές ιδιότητες καθώς διεγείρει την παραγωγή κολλαγόνου I και III και ενζύμων σημαντικών για την παραγωγή του κολλαγόνου και την αναστολή των μεταλλοπρωτεϊνών (matrix metalloproteinase, MMP) 1 (κολλαγενάση 1). Η

μεγαλύτερη συγκέντρωση L-ασκορβικού οξέος που συναντάται σε προϊόντα που προορίζονται για τοπική χρήση, άρα διαδερμική απορρόφηση, είναι 20%. [4], [5], [13], [15]

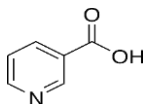
### 2.1.2. Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη, *α-tocopherol* / *Vitamin E*)



Εικόνα 6. Μοριακή δομή α-τοκοφερόλης.

Ο όρος «βιταμίνη E» αναφέρεται σε σύνολο φυσικών τοκοφερολών και τοκοτριολών που εμφανίζονται σε αφθονία σε φυτά και κυρίως σε έλαιά τους. Εμφανίζεται σε τουλάχιστον 8 διαφορετικές ισομορφές (α-, β-, γ-, δ- τοκοφερόλες, και α-, β-, γ-, δ- τοκοτριενόλες), οι οποίες διαφέρουν μόνο στον αριθμό μεθυλομάδων τους και στις πλευρικές αλυσίδες των αλειφατικών ουρών τους. Αποτελεί μια φαινολική ένωση που εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Οι λιποδιαλυτές ιδιότητες της βιταμίνης E (α-τοκοφερόλης) τη βοηθούν να διεισδύει στα βαθύτερα στρώματα της κερατίνης στιβάδας, μέσω των σημηματογόνων αδένων, για να καταλήξει στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων και να τα προστατεύσει από το οξειδωτικό στρες. Ο κύριος ρόλος της βιταμίνης E ως αντιοξειδωτικό, είναι η διάσπαση αλυσίδων, το οποίο προλαμβάνει τη συνέχιση της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Μεταξύ άλλων, έχει την ικανότητα να μειώνει την υπερμελάγχρωση που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία, να κάνει το δέρμα πιο λείο και να αυξάνει την ικανότητα της κερατίνης στιβάδας να συγκρατεί την υδάτωσή της. Συμβάλει στην αύξηση της επιθηλιοποίησης και στην φωτοπροστασία του δέρματος. Τέλος, έχει αντιφλεγμονώδεις και αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις σε συγκεντρώσεις μεταξύ 2% και 20%. [4], [5], [13]

### 2.1.3. Βιταμίνη B<sub>3</sub> (Νιασιναμίδη, *Niacinamide* / *Vitamin B<sub>3</sub>*)

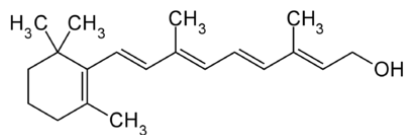


Εικόνα 7. Μοριακή δομή Νιασιναμίδης (Βιταμίνης B<sub>3</sub>).

Η Νιασιναμίδη, γνωστή και ως Νικοτιναμίδη (nicotinamide), είναι ένα υδροφιλικό αμίδιο ανάλογο της βιταμίνης B<sub>3</sub>. Αποτελεί βασικό συστατικό των οξειδοαναγωγικών συνενζύμων: δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (NAD) και φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδικής αδενίνης (NADP), τα οποία εμπλέκονται στη μεταφορά

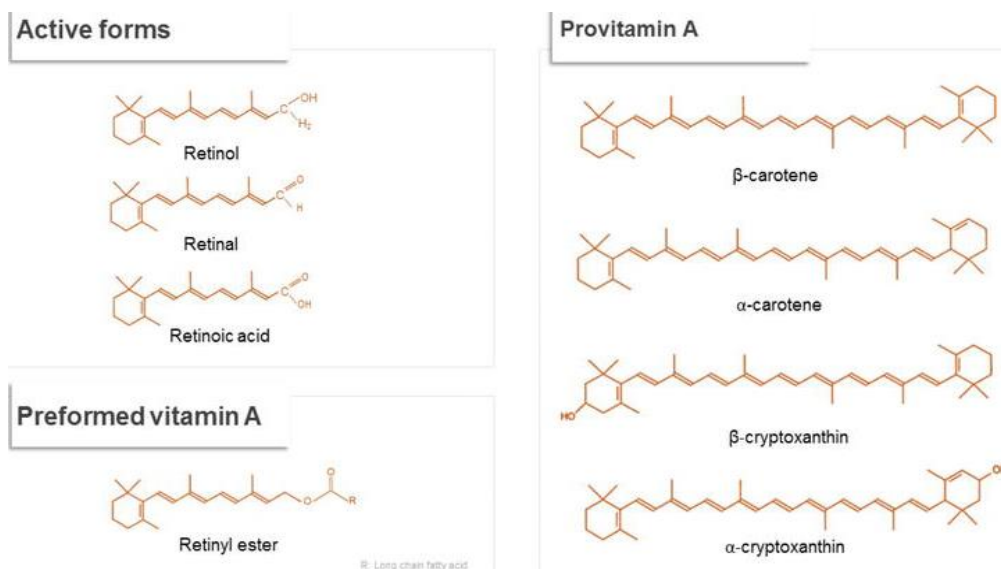
υδρογόνου. Στη δραστηριότητά της στον επιδερμικό φραγμό, μπορεί να μειώσει τη διαδερμική απώλεια νερού (TEWL), οπότε να αυξήσει τα επίπεδα υδάτωσης του δέρματος. Δύναται να ρυθμίσει τον κυτταρικό μεταβολισμό και την αναδόμηση των ιστών και αποτελεί ένωση με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Σε τοπικές εφαρμογές στην επιδερμίδα παρατηρείται αντιμικροβιακή, αντικνησμώνης, φωτοπροστατευτική, σημηματορυθμιστική, λευκαντική και αντιγηραντική δράση. Έχει πλέον εκτεταμένη χρήση στη θεραπεία του μελάσματος και των υπερμελαγχρώσεων γενικότερα, έχει επαρκή βιοδιαθεσιμότητα και χρησιμοποιείται σε διάφορες συγκεντρώσεις στα καλλυντικά προϊόντα. [2]

#### 2.1.4. Βιταμίνη Α (Vitamin A)



Εικόνα 8. Μοριακή δομή Βιταμίνης Α.

Η Βιταμίνη Α είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, η οποία βρίσκεται συχνά στη διατροφή ως προσχηματισμένη βιταμίνη Α σε ζωικά προϊόντα, σε κρέας και ψάρι, και ως προβιταμίνη Α σε φυτικά προϊόντα, όπως φρούτα και λαχανικά. Το β-καροτένιο έχει την πιο δραστική προβιταμίνη Α, η οποία μεταβολίζεται σε ρετινοϊκό οξύ και ρετινόλη, την ενεργή μορφή της βιταμίνης Α (Εικόνα 9). [4], [5],



Εικόνα 9. Μορφές Βιταμίνης Α.

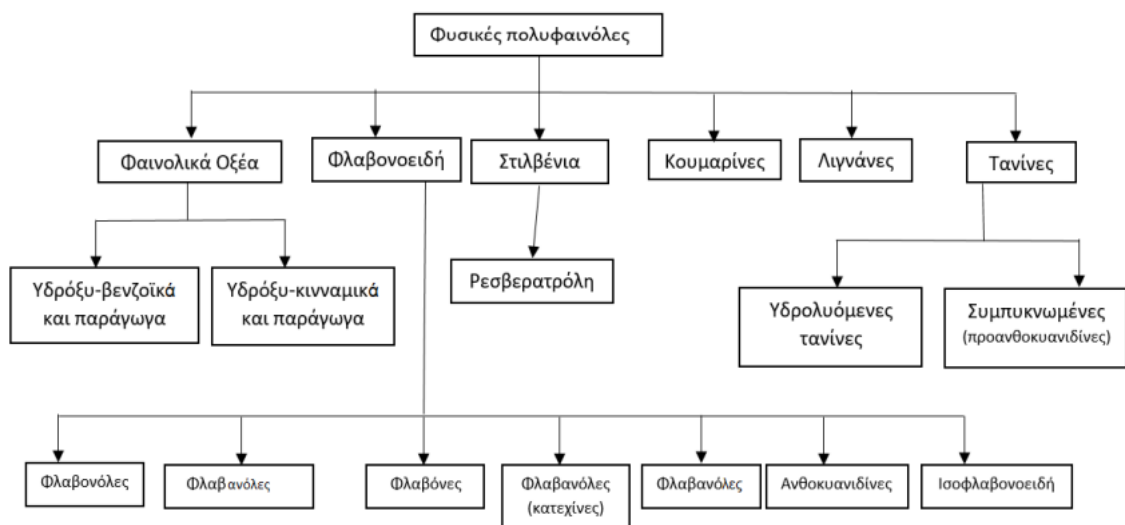
Αριστερά: Ενεργές Μορφές Βιταμίνης Α (ρετινόλη, ρετινάλη/ρετιναλδεΐδη, ρετινοϊκό οξύ), Προσχηματισμένη Βιταμίνη Α (ρετινυλεστέρας).

Δεξιά: Προβιταμίνη Α (β-καροτένιο, α-καροτένιο, β-κρυπτοξανθίνη, α-κρυπτοξανθίνη).

## 2.2. Φαινολικές ενώσεις (Phenolics/Phenols)

Οι κοινές φαινολικές και πολυφαινολικές ενώσεις, τα φλαβονοειδή, τα φυτικά οξέα και οι ενώσεις αζώτου θεωρούνται πολύ ισχυρά αντιοξειδωτικά. Χρησιμοποιούνται στη πρόληψη και θεραπεία πολλών παθήσεων, στη διατροφή, στη φροντίδα της υγείας, στη συντήρηση τροφίμων, αλλά και, αυτό που κυρίως ενδιαφέρει εμάς, στα προϊόντα που προορίζονται για τη φροντίδα του δέρματος.

Οι φαινόλες είναι μία ομάδα οργανικών ενώσεων με  $\geq 1$  αρωματικούς δακτυλίους, οι οποίοι κατέχουν  $\geq 1$  υδροξυλομάδες. Γενικώς, ταξινομούνται ως υποομάδες των φαινολικών οξέων, των φλαβονοειδών, των στυλβενίων, των κουμαρινών και των τανινών (Εικόνα 10). Αποτελούν προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή, την ανάπτυξη και το μεταβολισμό τους. Δρουν ως αμυντικός μηχανισμός ενάντια σε ιούς, μύκητες, παράσιτα και συμβάλλουν στη χρώση των φυτών. Επιπρόσθετα των δράσεών τους στα φυτά, οι φαινολικές ενώσεις στη διατροφή μας μπορούν να μειώσουν την πιθανότητα χρόνιων ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, καρδιακές παθήσεις και ο διαβήτης. [11], [14]



Εικόνα 10. Ταξινόμηση των φυτικών φαινολικών ενώσεων.

Ενώσεις όπως τα φλαβονοειδή και οι τανίνες, ανήκουν στα σημαντικότερα φαινολικά συστατικά που απαντώνται στα φυτικά εκχυλίσματα. Κατέχουν εξαιρετική ικανότητα δέσμευσης δραστικών ειδών οξυγόνου χωρίς να ενεργοποιούν περαιτέρω οξειδωτικές αντιδράσεις. Μια από τις σύγχρονες πρακτικές στην έρευνα για να προσδιορισθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός εκχυλίσματος, είναι η ποσοτικοποίηση του Συνολικού Φαινολικού Περιεχομένου (Total Phenolic Content, TPC). Όσο υψηλότερο το TPC του

εκχυλίσματος, τόσο μεγαλύτερη θεωρείται η αντιοξειδωτική του ικανότητα. Αυτό βασίζεται στο ότι τα υποκατεστημένα 5,7,3',4'-υδροξυ φλαβονοειδή πιστεύεται ότι διαθέτουν ισχυρή ικανότητα δέσμευσης των ριζών. [9]

Οι φαινολικές και οι αρωματικές ενώσεις μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά δίνοντας υδρογόνο σε μια ελεύθερη ρίζα και μετατρέποντας τις ίδιες σε ρίζες, οι οποίες θα σταθεροποιηθούν με την μεταφορά ηλεκτρονίου μέσα στον αρωματικό δακτύλιο και το σχηματισμό δομών κινόνης. Συνεπώς, η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών αυξάνεται, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των φαινολικών υδροξυλομάδων. [7]

Άλλα αντιοξειδωτικά που συναντάμε στη φύση, είναι τα πολυφαινολικά μόρια, όπως τα φλαβονοειδή και η προζιανιδίνη. Αυτά έχουν 2 υδροξυλομάδες που μπορούν να μεταφέρουν υδρογόνα ώστε να δεσμεύσουν ελεύθερες ρίζες. Οι πολυφαινόλες συναντώνται στο κρασί, στο πράσινο και μαύρο τσάι, στα φρούτα και στα λαχανικά. Εκείνες που έχουν φυτική προέλευση, όταν εφαρμόζονται τοπικά, παρουσιάζουν ιδιότητες φωτοπροστασίας και μείωση της βλάβης που προκαλείται στο DNA από την υπερϊώδη ακτινοβολία.

### **2.2.1. Φαινολικά Οξέα (Phenolic Acids)**

Τα φαινολικά οξέα έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες, καθώς μπορούν να αυξάνουν τη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης, της καταλάσης και της γλουταθειόνης και να μειώνουν τη λιπιδική υπεροξειδωση. Χωρίζονται σε 2 υποομάδες, τα υδρόξυ-βενζοϊκά οξέα και τα υδρόξυ-κινναμικά οξέα (Εικόνα 10). Τα παράγωγα υδρόξυ-βενζοϊκού οξέος υπάρχουν, συνήθως, σε δεσμευμένη μορφή στα τρόφιμα, ως συστατικά πολύπλοκων δομών, όπως οι λιγνίνες και οι υδρολυόμενες τανίνες, ή προσκολλημένα σε κυτταρικά τοιχώματα και πρωτεΐνες. Μπορούν επίσης να βρεθούν ως παράγωγα ζάχαρης και οργανικών οξέων σε φρούτα, λαχανικά και δημητριακά ολικής άλεσης. Τα παράγωγα υδρόξυ-κινναμικού οξέος υπάρχουν, συνήθως, σε δεσμευμένη μορφή, συνδεδεμένα σε δομικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, όπως η κυτταρίνη, η λιγνίνη και οι πρωτεΐνες, μέσω εστερικών δεσμών. [11], [16]

#### **2.2.1.1. Φερουλικό Οξύ (Ferulic acid)**

Τα φερουλικά οξέα ανευρίσκονται κυρίως σε σπόρους και φύλλα φυτών, ως επί το πλείστον, ομοιοπολικά συζευγμένα με μόνο- και δι-σακχαρίτες, γλυκοπρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, πολυαμίνες, αδιάλυτα πολυμερή υδατανθράκων και λιγνίνη. Παρατηρείται ότι τα φερουλικά οξέα απαντώνται στα

δημητριακά ολικής άλεσης σε 3 μορφές: ελεύθερα, διαλυτά συζευγμένα και δεσμευμένα. Κάποια φερουλικά οξέα είναι: το καφεϊκό, το π-κουμαρικό, το φερουλικό, το πρωτοκατεχικό και το βανιλικό οξύ, τα οποία βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτικά τρόφιμα. Επιπλέον, η κουρκουμίνη και τα χλωρογενικά οξέα είναι κύρια παράγωγα των υδροξυκιναμικών οξέων στα φυτά. Η κουρκουμίνη αποτελείται από 2 φερουλικά οξέα που συνδέονται με ένα μεθυλένιο σε δομή δικετόνης και είναι η κίτρινη χρωστική ουσία των μπαχαρικών κουρκουμά και μουστάρδας. Τέλος, τα χλωρογενικά οξέα είναι οι εστέρες των καφεϊκών οξέων και αποτελούν τα κύρια υποστρώματα για την ενζυμική οξειδωση που οδηγεί στο μαύρισμα των φυτών, ιδιαίτερα των μήλων και των πατατών. [11]

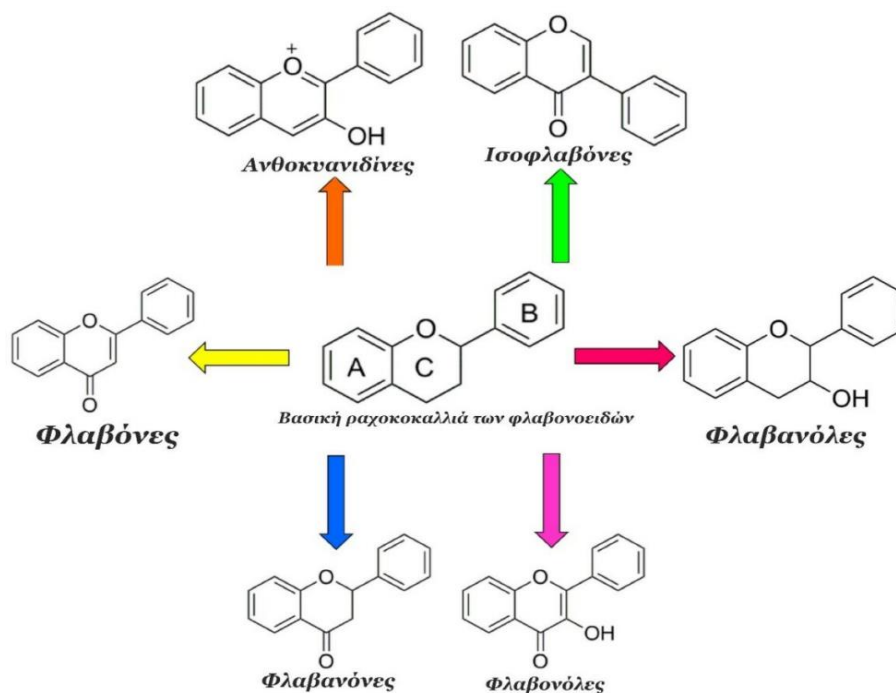
Το φερουλικό οξύ είναι μια υδρόφοβη φαινολική ένωση, γνωστή και ως 4-υδρόξυ-3-μεθοξυκιναμικό οξύ / υδροξυκιναμικό οξύ (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid / hydroxycinnamic acid). Θεωρείται ανώτερο αντιοξειδωτικό λόγω της ικανότητάς του να παραμένει περισσότερο στο αίμα σε σχέση με άλλα φαινολικά οξέα. Χρησιμοποιείται για να εξουδετερώσει ελεύθερες ρίζες, ώστε να επανορθώσει τα κατεστραμμένα κύτταρα στους μυϊκούς ιστούς. Συχνότερα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τις βιταμίνες A, C, και E, ώστε να ενισχύσει τις ικανότητές τους και να καθυστερήσει τη διαδικασία της φωτογήρανσης. Έχει πολλά οφέλη για το δέρμα, όπως την αντιγήρανση, την καταπολέμηση της υπερμελάγχρωσης και της φωτογήρανσης, τη λεύκανση του δέρματος και φωτοπροστατευτικές ιδιότητες λόγω του ότι απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία. [2], [17] Παρόλα αυτά, η εφαρμογή του περιορίζεται από την τάση του να αλλοιώνεται από την έκθεση σε ζέστη, υγρασία και φως. [18]

### **2.2.2. Φλαβονοειδή (Flavonoids)**

Τα φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη ομάδα φαινολικών ενώσεων που έχουν μια κοινότητα δομή με δύο αρωματικούς δακτυλίους (δακτύλιοι A και B), οι οποίοι συνδέονται με τρεις άνθρακες, που βρίσκονται σε ένα οξυγονωμένο ετερόκυκλο δακτύλιο (δακτύλιο C). Τα φρούτα, τα λαχανικά και άλλες φυτικές πηγές είναι πλούσιες σε φλαβονοειδή και συνδέονται με τη μείωση των πιθανοτήτων εμφάνισης σημαντικών χρόνιων ασθενειών σχετιζόμενων με τη γήρανση. Περισσότερα από 5000 διαφορετικά φλαβονοειδή έχουν απομονωθεί και αναγνωρισθεί. Βάσει δομικών διαφορών στον ετερόκυκλο δακτύλιο C, κατηγοριοποιούνται σε (Εικόνα 11):

- φλαβονόλες (flavonols: quercetin, kaempferol, and myricetin),
- φλαβόνες (flavones: luteolin and apigenin),

- φλαβανόλες (κατεχίνες) (flavanols: catechin, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate, and epigallocatechin gallate),
- φλαβονόνες (flavonones: naringenin),
- ανθοκυανιδίνες (anthocyanins: cyanidin and malvidin),
- ισοφλαβόνες (isoflavones: genistein and daidzein).



Εικόνα 11. Κατηγορίες Φλαβονοειδών.

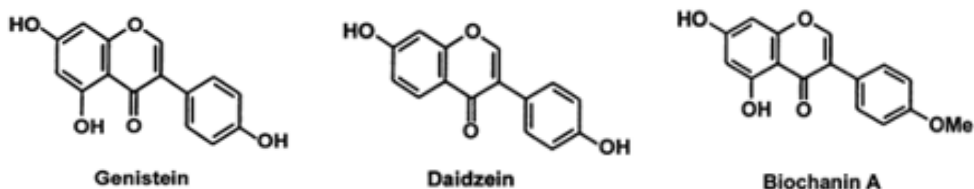
Αυτά είναι κοινά διατροφικά φλαβονοειδή, τα οποία απαντώνται συχνά στη φύση, σε γλυκοζυλιωμένες ή εστεροποιημένες μορφές, αλλά μπορεί να βρεθούν και ως αγλυκόνες, σε επεξεργασμένα τρόφιμα. Τα μήλα είναι καλή πηγή κερκετίνης, επικατεχίνης και κυανιδίνης. Τα κύρια φλαβονοειδή που βρίσκονται στα πορτοκάλια είναι η εσπερετίνη και η ναρινγενίνη. [11]

#### 2.2.2.1. Ανθοκυανιδίνες (Anthocyanins)

Οι ανθοκυανιδίνες είναι μια υποομάδα των φλαβονοειδών που βρίσκονται συχνά στη φύση. Παρέχουν μοναδικές αποχρώσεις σε κάποια φρούτα, λαχανικά και ολικής άλεσης δημητριακά. Απαντώνται ευρέως σε φρούτα και λαχανικά, όπως τα βατόμουρα, τα σμέουρα, τις φράουλες, τα φραγκοστάφυλα, τα σαμπύκους, τα σταφύλια, τα κράνμπερι, το κόκκινο λάχανο, τα κόκκινα ραπανάκια και το σπανάκι. Αποτελούν πιγμέντα που δρουν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά και είναι πλούσια κυρίως στα μούρα με απόχρωση κόκκινου, μπλε και μωβ. Συσχετίζονται με χαμηλότερη πιθανότητα

εμφάνιση κάποιων ειδών καρκίνου, με την υγεία του ουροποιητικού συστήματος, ενισχυμένη μνήμη και φυσιολογική γήρανση. [11], [14]

#### 2.2.2.2. Ισοφλαβόνες (Isoflavones)



Εικόνα 12. Μοριακή δομή ισοφλαβονών: Genistein, Daidzein, Biochanin A.

Οι ισοφλαβόνες, μία κύρια κατηγορία φυτοιστρογόνων, έχουν αντιοξειδωτικές και φωτοπροστατευτικές ιδιότητες. Ιδιαίτερως γνωστές ενώσεις είναι οι: genistein, daidzein και biochanin A (Εικόνα 12). Οι ισοφλαβόνες και οι μεταβολίτες τους δεσμεύουν τις ρίζες ανιόντων υδροξυλίου και υπεροξειδίου και προστατεύουν ενάντια στη λιπιδική υπεροξειδωση.

#### 2.2.2.3. Φλαβανόλες (Κατεχίνες, Catechins)

Η κατεχίνη είναι ένα πολυφαινολικό αντιοξειδωτικό, που απαντάται στα μούρα. Ο όρος κατεχίνη χρησιμοποιείται, επίσης, για να αναφερθούμε στην ομώνυμη οικογένεια φλαβονοειδών και την υποκατηγορία της, τις φλαβανόλες. Οι κατεχίνες διαφοροποιούνται από τα φλαβονοειδή που περιέχουν κετόνη, όπως η κερκετίνη (quercetin) και η ρουτίνη (rutin) (φλαβονόλες), οι οποίες υποστηρίζουν το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα. Οι πιο γνωστές κατεχίνες που βρίσκονται στα τρόφιμα είναι η γαλλοκατεχίνη, η επικατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη και η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη. Οι κατεχίνες που βρίσκονται στα κράνμπερις δεν διαφέρουν πολύ από εκείνες που απαντώνται στο πράσινο τσάι, οι οποίες επιπλέον της αντιοξειδωτικής τους δράσης, παρέχουν φωτοπροστασία, πρόληψη της καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος, προστασία από φλεγμονώδεις δερματοπάθειες και φωτοκαρκινογένεσεις. [13], [14], [19]

##### 2.2.2.3.1. Γαλλική επιγαλλοκατεχίνη ( (-)-epigallocatechin-3-gallate, EGCG)

Η γαλλική επιγαλλοκατεχίνη είναι μια κατεχίνη που απαντάται στο πράσινο τσάι. Το πράσινο τσάι έχει πολλές κατεχίνες, η Γαλλική επιγαλλοκατεχίνη είναι η πιο πλούσια, αντιπροσωπεύοντας περισσότερο από το 50% των κατεχινών του, επιπλέον των: epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin (EC), and (+)-catechin. Η EGCG έχει ήδη μελετηθεί για πολλά χαρακτηριστικά της, όπως την

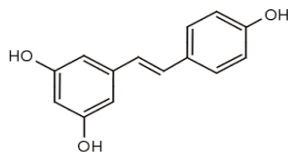


αντιοξειδωτική της ικανότητα, την αντιφλεγμονώδη της δράση και την επίδρασή της στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων. Έχει αποδειχθεί η αντιοξειδωτική δράση της και η προληπτική επίδρασή της ενάντια στην απόπτωση, που προκαλείται από την υποβίβαση της κασπάσης-8 και -3 στα κύτταρα HaCaT (ανθρώπινα κερατινοκύτταρα ευρέως χρησιμοποιούμενα στην έρευνα). Παρατηρήθηκε ότι η EGCG συμβάλει στη μείωση έκκρισης μελανίνης και παραγωγής κυττάρων μελανώματος. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η EGCG μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό σε κοσμητικά προϊόντα, με θετική επίδραση στην ενυδάτωση, στη διατήρηση υγρασίας, στην πρόληψη της γήρανσης, στη δέσμευση ελευθέρων ριζών και στη μείωση παραγωγής μελανίνης. [12], [19]

### 2.2.3. Στιλβένια (Stilbenes)

Τα φυσικά στιλβένια κατέχουν φυσικοχημικές επιδράσεις, θετικές ενάντια στη γεροντική άνοια, τον καρκίνο και τα βακτήρια. [20]

#### 2.2.3.1. Ρεσβερατρόλη (*trans*-3,5,4'-trihydroxy *trans* stilbene, RES)



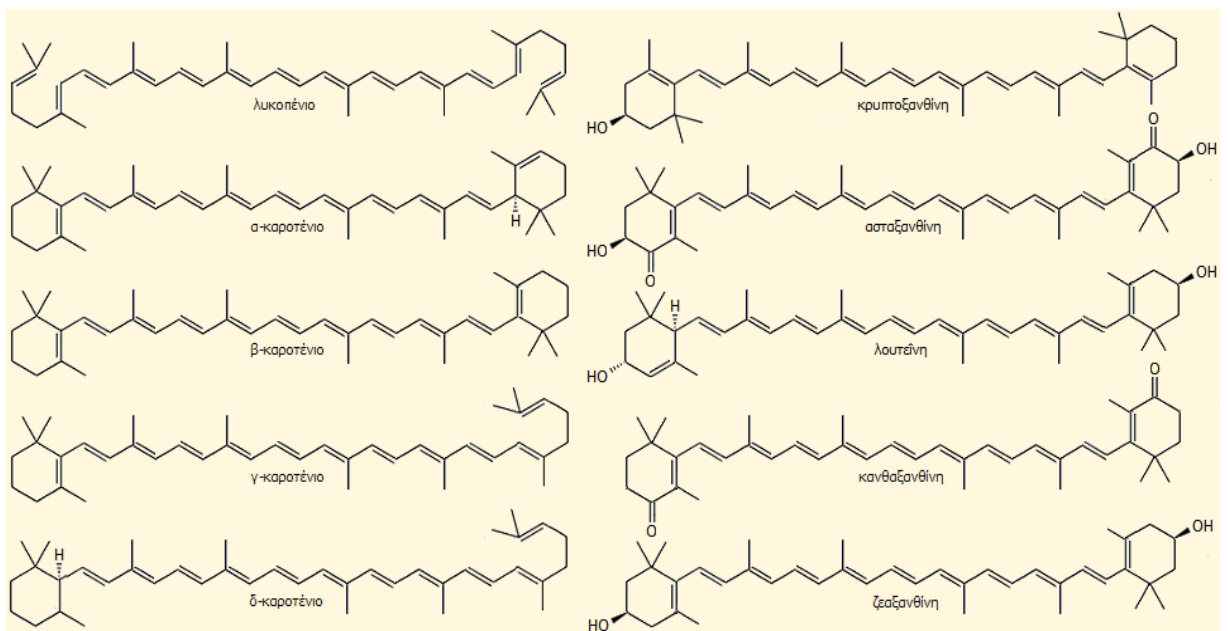
Εικόνα 13. Μοριακή δομή ρεσβερατρόλης.

Η πολυφαινόλη ρεσβερατρόλη είναι φυτικής προέλευσης. Η βασική της δομή αποτελείται από δύο δακτυλίους φαινόλης, συνδεδεμένα μεταξύ τους από μία γέφυρα αιθυλενίου, η οποία μπορεί να διαχωριστεί σε δύο ισομερείς μορφές ρεσβερατρόλης, την *trans* και τη *cis* [20]. Συναντάμε τη ρεσβερατρόλη στο γκρέιπφρουτ, σε καρπούς και στο κόκκινο κρασί. Εμφανίζει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση, προλαμβάνοντας την ανάπτυξη υδροϋπεροξειδίων στη κερατίνη στιβάδα, μειώνοντας την εισχώρηση λευκοκυττάρων στο δέρμα.

## 2.3. Καροτενοειδή (Carotenoids)

Τα καροτενοειδή κατηγοριοποιούνται ως υδρογονάνθρακες (καροτένια, carotenes) και τα οξυγονωμένα παράγωγά τους (ξανθοφύλλες, xanthophylls) (Εικόνα 14). Αποτελούν λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά και βρίσκονται, κυρίως, στις μεμβράνες των ιστών. [13] Ανήκουν στα πιο κοινά φυσικά πιγμέντα και είναι υπεύθυνα για τις περισσότερες από τις κόκκινες, πορτοκαλί και κίτρινες χρώσεις των φύλλων των φυτών, των φρούτων και των λαχανικών. Εκτιμάται ότι έχουν απομονωθεί και αναγνωρισθεί περισσότερα από

600 διαφορετικά καροτενοειδή. Τα οφέλη τους για την υγεία είναι οι μοναδικές φυσιολογικές λειτουργίες που κατέχουν ως προβιταμίνες και οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. [11] Έχουν τραβήξει πολλή προσοχή λόγω πολλαπλών ερευνών που αποκαλύπτουν ότι η κατανάλωσή τους συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών, συμπεριλαμβανόμενων καρκίνων και καρδιαγγειακών ή οφθαλμολογικών παθήσεων. Αύτη τους η ιδιότητα καταλογίζεται στην αντιοξειδωτική τους ικανότητα, η οποία προστατεύει τα κύτταρα και τους ιστούς από οξειδωτικό στρες. [9]



Εικόνα 14. Τυπικά καροτενοειδή.

Αριστερά: Καροτένια (με τη σειρά: λυκοπένιο, α-καροτένιο, β-καροτένιο, γ-καροτένιο, δ-καροτένιο).  
 Δεξιά: Ξανθοφύλλες (με τη σειρά: κρυπτοξανθίνη, ασταξανθίνη, λουτεΐνη, κανθαξανθίνη, ζεαξανθίνη).

Η μοριακή δομή των καροτενοειδών μπορεί να είναι κυκλοποιημένη στο ένα ή/και στα δύο άκρα, να έχει διάφορα υδρογονωμένα επίπεδα ή να διαθέτει λειτουργικές ομάδες που περιέχουν οξυγόνο. Το β-καροτένιο και το λυκοπένιο είναι παραδείγματα κυκλοποιημένων και μη κυκλοποιημένων καροτενοειδών, αντίστοιχα (Εικόνα 14). Το κεντρικό κομμάτι του μορίου τους σχηματίζεται από μια μακριά σειρά συζευγμένων διπλών δεσμών, οι οποίοι καθορίζουν το σχήμα τους, την χημική τους δραστηριότητα και την ιδιότητα τους να απορροφούν το φως. Είναι πολύ σημαντικά για τη φωτοσύνθεση και τη φωτοπροστασία των φυτών. Η φωτοπροστασία που παρέχουν βασίζεται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν δραστικά είδη οξυγόνου, τα οποία σχηματίζονται από την έκθεσή στον ήλιο και στην ακτινοβολία. Τα καροτενοειδή μπορούν να αντιδράσουν με τις ελεύθερες ρίζες και να μετατραπούν σε ρίζες τα ίδια. Η

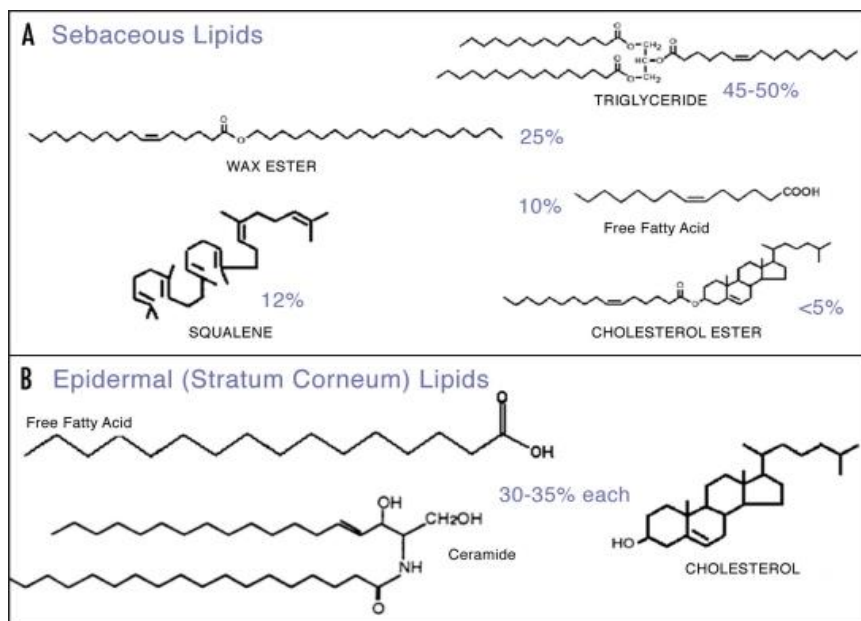
αντιδραστικότητά τους επηρεάζεται κυρίως από το μήκος της αλυσίδας των συζευγμένων διπλών δεσμών και τα χαρακτηριστικά των τελικών λειτουργικών τους ομάδων. Οι ρίζες καροτενοειδών σταθεροποιούνται με την μεταφορά ασύζευκτων ηλεκτρονίων. Τα καροτενοειδή είναι ιδιαίτερος αποτελεσματικά στη δέσμευση απλού οξυγόνου, το οποίο παράγεται από τη λιπιδική οξείδωση, που οφείλεται, επίσης, στην έκθεση σε ακτινοβολία. Η ασταξανθίνη, η ζεαξανθίνη και η λουτεΐνη είναι εξαιρετικές στο να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες λόγω της μοναδικής τους τελικής λειτουργικής ομάδας (Εικόνα 14). Το β-καροτένιο, το α-καροτένιο και η β-κρυπτοξανθίνη δρουν ως προ-βιταμίνη Α και μπορούν να μετατραπούν σε ρετινόλη (βιταμίνη Α) μέσω του μεταβολισμού (Εικόνα 9). Διατροφή πλούσια σε ζεαξανθίνη και λουτεΐνη μπορεί να μειώσει τις πιθανότητες εμφάνισης καταρράκτη και εκφύλισης της ωχράς κηλίδας. [7], [11]

### 2.3.1. Φουκοξανθίνη (*Fucoxanthin*)

Η φουκοξανθίνη αποτελεί δευτερογενή μεταβολίτη, ανήκει στην οικογένεια των καροτενοειδών και βρίσκεται στους χλωροπλάστες των κυττάρων φυκιών. Θεωρείται ένα από τα πιο πλούσια και αντιπροσωπευτικά πιγμέντα των καφέ φυκιών. Μεταξύ άλλων, οι ωφέλιμες ιδιότητές της είναι ενάντια στον καρκίνο, την υπέρταση, τις φλεγμονές, το διαβήτη, την παχυσαρκία, τις αγγειακές παθήσεις, προστατεύει επίσης τα νεύρα και έχει αντιοξειδωτικές και φωτοπροστατευτικές ιδιότητες. Κυρίως, μας απασχολούν οι ισχυρές αντιοξειδωτικές της ικανότητες. Είναι πολύ σημαντική στη βιομηχανία των καλλυντικών και των φαρμάκων λόγω της προστατευτικής της δράσης ενάντια στα εγκαύματα και στη διαταραχή της φιλαγκρίνης, που προκαλούνται από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η προστατευτική της ικανότητα βασίζεται στην ενίσχυση της φιλαγκρίνης, η οποία ενισχύει το δερματικό φραγμό. Αυτή η προστασία έχει, επίσης, συσχετισθεί με την αποκατάσταση βλαβών του DNA και την ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα στα κύτταρα των ινοβλαστών. Λόγω των παραπάνω έχει δοκιμασθεί σε διάφορες αντιγηραντικές και αντηλιακές φόρμουλες. Η παραγωγή της χημικώς είναι περίπλοκη και ασύμφορη, ενώ η μέθοδος εκχύλισής της από θαλάσσιους οργανισμούς θεωρείται πιο συμφέρουσα και με καλό αντίκτυπο στο περιβάλλον. Παρόλα αυτά, η μέθοδος εκχύλισής της δεν έχει σταθεροποιηθεί πλήρως ακόμα, γι' αυτό είναι σημαντικό να βρεθούν κατάλληλες πηγές με καλή απόδοση εκχύλισης, καθαρότητας και σταθερότητας για μελλοντική χρήση. [21], [22]

## 2.4. Λιπίδια υδρολιπιδικού φραγμού (Hydrolipid barrier lipids)

Άλλα ισχυρά αντιοξειδωτικά αποτελούν τα λιπίδια του υδρολιπιδικού φραγμού (τριγλυκερίδια, σκουαλένιο, ελεύθερα λιπαρά οξέα, εστέρας χολεστερόλης και κεραμίδια), προστατεύοντας από τη διαδερμική απώλεια ύδατος και ενεργοποιώντας τη σύνθεση υποστηρικτικών συστατικών της ενυδάτωσης, όπως είναι το υαλουρονικό οξύ. [23]



Εικόνα 15. Μοριακή δομή λιπιδίων του δέρματος.

Η αντιοξειδωτική δράση συσχετίζεται έμμεσα με την αντιγηραντική δράση. Έτσι, πολλά συστατικά που ισχυρίζονται ότι βοηθούν στην πρόληψη και αντιμετώπιση της γήρανσης του δέρματος, δηλώνουν ότι έχουν αντιοξειδωτική δράση. Αφού η γήρανση του δέρματος συνδέεται με το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και με τη μείωση των αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά μόρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση του δέρματος στην υπεριώδη ακτινοβολία, στη διατήρηση της υγείας του σώματος και στην πρόληψη ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών ασθενειών, κάποιων μορφών καρκίνου καθώς και πολλών διαταραχών που σχετίζονται με την παρουσία ελευθέρων ριζών ή ενεργών μορφών οξυγόνου. Μία ιδιότητα που χαρακτηρίζει ένα αντιοξειδωτικό ως ωφέλιμο για τον ανθρώπινο οργανισμό είναι ο βαθμός απορρόφησής του από αυτόν και η βιοδιαθεσιμότητά του. Στην περίπτωση που δεν υπάρχει επαρκής απορρόφηση, το

σώμα δεν λαμβάνει τις ευεργετικές ιδιότητές του. Τέλος, είναι σημαντικό το αν τα αντιοξειδωτικά δρουν συνεργιστικά ή ανταγωνιστικά. Κάποια αντιοξειδωτικά έχουν τη δυνατότητα να δρουν συνεργιστικά, προστατεύοντας έτσι το ένα το άλλο από φαινόμενα αυτοοξείδωσης. [13] Για να επιτευχθούν βέλτιστα αποτελέσματα αντιγήρανσης και λεύκανσης μέσω προϊόντων τοπικής χρήσης, αυτά μπορεί να περιέχουν παραπάνω από ένα και συνδυασμό ενεργών συστατικών στην ίδια φόρμουλα. Επειδή, όπως αναφέραμε παραπάνω, τα αντιοξειδωτικά αποτελούν πολλών ειδών ουσίες με ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες, είναι απαραίτητη η χρήση διαφορετικών μεθόδων για την ανάλυσή τους *in vitro*, *in vivo* και *ex vivo*.

## **Κεφάλαιο 3. Παράμετροι αξιολόγησης αποτελεσματικότητας**

### **3.1. Παράμετροι δέρματος που εξετάζονται και μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να υποστηριχθεί ο ισχυρισμός δράσης:**

- Μη επεμβατικές
  - Βιοφυσικές μετρήσεις παραμέτρων του δέρματος
  - Απεικονιστικές
  - Εκτίμηση των κλινικών αποτελεσμάτων
- Επεμβατικές
  - Για παράδειγμα λήψη ιστών για βιοψία.

#### **3.1.1. Συνοπτικά η οργανολογία:**

Για τον προσδιορισμό: της Χρώσης δέρματος / Ερυθήματος (melanin index), της Ελαστικότητας (elasticity), της Λάμπυσης (radiance), της Υδάτωσης (moisture), και της Διαδερμικής Απώλειας Νερού (transepidermal water loss, TEWL), υπολογίζονται με τα όργανα: Mexameter®, Cutometer®, Glossymeter®, Corneometer® και Tewameter®, αντίστοιχα. [16]

Για το προσδιορισμό της μικροτοπογραφίας του δέρματος μετριοούνται οι παράμετροι: απαλότητα (smoothness, SEsm), τραχύτητα (roughness, SEr), αποφολίδωση (scaliness, SEsc) και ρυτίδωση (wrinkles, SEw) με το όργανο Visioscan® και αποτελέσματα σύσφιξης μετριοούνται με το VECTRA®. [16]

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες αξιολογούνται με μελέτες ασφάλειας και η ικανοποίηση αξιολογείται επίσης με: κλινική αξιολόγηση των σημείων που αναμένεται η δράση του καλλυντικού προϊόντος από εξειδικευμένους επιστήμονες υγείας, αυτοαξιολόγηση από τον εθελοντή και αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας με βιοφυσικές μεθόδους όπως προτείνονται από τον Οργανισμό CosmeticsEurope. [24]

**3.1.2. Προσδιορισμός Δείκτη μελανίνης / ερυθήματος (melanin / erythema index) / χρώσης δέρματος:** Για τον προσδιορισμό της χρώσης του δέρματος χρησιμοποιείται το Mexameter®. Το όργανο αυτό μπορεί να υπολογίζει τους δυο βασικούς παράγοντες της χρώσης του δέρματος, τη μελανίνη και την αιμοσφαιρίνη (ερύθημα). Η μέτρηση αυτών είναι πολύ γρήγορη και εύκολη και έχει τη δυνατότητα να κάνει επαναλαμβανόμενες μετρήσεις, με σταθερή επαφή και επαναληψιμότητα στα αποτελέσματα. Είναι ένα

ευαίσθητο όργανο, το οποίο καταγράφει και τις παραμικρές αλλαγές στη χρώση. Τέλος, έχει μικρή και ελαφριά κεφαλή, για εύκολη χρήση σε όλα τα σημεία του σώματος.

Τρόπος λειτουργίας:

- Η κεφαλή της συσκευής εκπέμπει ακτινοβολία σε 3 καθορισμένα μήκη κύματος, όπου παρατηρείται απορρόφηση της μελανίνης και της αιμοσφαιρίνης.
- Η ακτινοβολία προσπίπτει στο δέρμα, ένα τμήμα της απορροφάται, ενώ άλλο ανακλάται.
- Μετρίεται η ένταση που ανακλάται μέσω ενός δέκτη, ενσωματωμένου στη συσκευή.
- Υπολογίζεται η ένταση του φωτός που απορροφήθηκε από το δέρμα, η οποία αποτελεί συνάρτηση της ποσότητας μελανίνης και αιμοσφαιρίνης. [24]

**3.1.3. Προσδιορισμός Ελαστικότητας (elasticity) δέρματος:** Για τον προσδιορισμό της ελαστικότητας του δέρματος χρησιμοποιείται το Cutometer®.

Προσδιορισμός Ελαστικότητας δέρματος με τη μέθοδο αναρρόφησης/επιμήκυνσης:

- Αναρροφάται κάθετα το δέρμα με την εφαρμογή υποπίεσης, η οποία δημιουργείται μέσω αντλίας κενού, για ορισμένα δευτερόλεπτα.
- Διακόπτεται η υποπίεση και ακολουθεί διάστημα αποκατάστασης χάλασης.
- Η κάθετη επιμήκυνση του δέρματος κατά την αναρρόφηση ανιχνεύεται μέσω οπτικού συστήματος.

Τρόποι εφαρμογής:

- Σταθερή υποπίεση και απότομη διακοπή της.
- Αρχικά σταθερά αυξανόμενη και έπειτα σταθερά μειούμενη υποπίεση.
- Αρχικά σταθερή και μετά σταθερά μειούμενη υποπίεση.
- Σταθερά αυξανόμενη υποπίεση και απότομη διακοπή της.

Τα πηλικά  $U_f/U_f$  και  $U_r/U_e$ , τα οποία αποτελούν τις παραμέτρους ελαστικότητας, μειώνονται όταν μειώνεται η ελαστικότητα του δέρματος. Το  $U_v/U_e$  αποτελεί την ιξωδοελαστική παράμετρο και αυξάνεται με τη μείωση της ελαστικότητας. Όπου  $U_e$ : η άμεση ελαστική επιμήκυνση του δέρματος κατά το διάστημα αναρρόφησης,  $U_v$ : η καθυστερημένη ιξωδοελαστική επιμήκυνση του δέρματος κατά το διάστημα αναρρόφησης,  $U_r$ : η άμεση αποκατάσταση του δέρματος κατά το διάστημα χάλασης και  $U_f$ : η συνολική επιμήκυνση του δέρματος κατά το διάστημα χάλασης. [24]

**3.1.4. Προσδιορισμός Λάμψης (radiance) δέρματος:** Για τον προσδιορισμό της λάμψης του δέρματος χρησιμοποιείται διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης γυαλάδας/στιλπνότητας (gloss Differential scanning calorimetry, DSC), μια παράμετρος η οποία υπολογίζεται μέσω Glossometer®.

**3.1.5. Προσδιορισμός Υδάτωσης (moisture) κερατίνης στιβάδας:** Για τον προσδιορισμό της υδάτωσης χρησιμοποιείται το Corneometer®.

**3.1.5.1. Αγωγιμότητα:** Προσδιορίζεται η περιεκτικότητα του δέρματος σε υγρασία, σε βάθος μέχρι 25μM. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι η εξάρτησή της από την παρουσία ηλεκτρολυτών στην επιφάνεια του δέρματος.

**3.1.5.2. Χωρητικότητα (Corneometer®):** Η μέθοδος βασίζεται στη μεγάλη διαφορά μεταξύ της διηλεκτρικής σταθεράς του νερού και των υπολοίπων ουσιών της κερατίνης στιβάδας.

**3.1.5.3. Χρήση ταινιών συλλογής κερατινοκυττάρων:**

Στη μέθοδο αυτή αφαιρούνται με ειδική κολλητική ταινία συσσωματώματα κερατινοκυττάρων (νιφάδες απολέπισης). Γνωρίζουμε ότι τα κερατινοκύτταρα αποπίπτουν από την επιφάνεια της επιδερμίδας, μεμονωμένα ή ως συσσωματώματα. Η υδάτωση της κερατίνης στιβάδας καθορίζει σε μεγάλο βαθμό το ρυθμό, το μέγεθος και την απόπτωση των κερατινοκυττάρων. [24] Συνεπώς, μετρώντας την ποσότητα κερατινοκυττάρων που προσκολλώνται στις ταινίες συλλογής, υπολογίζεται η υδάτωση της κερατίνης στιβάδας.

**3.1.6. Προσδιορισμός Διαδερμικής απώλειας ύδατος (transepidermal water loss, TEWL) δέρματος:** TEWL είναι η ποσότητα νερού που αποβάλλεται από το σώμα προς το περιβάλλον, μέσω του δέρματος, με διαδικασίες διάχυσης και εξάτμισης. Για τον προσδιορισμό της διαδερμικής απώλειας ύδατος χρησιμοποιείται το Tewameter®. Αυτό είναι εξοπλισμένο με ειδικά σχεδιασμένη κεφαλή η οποία μεταβάλλει τις ηλεκτρικές της ιδιότητες ανάλογα με την τάση ατμών που έρχεται σε επαφή. Η μέτρηση επηρεάζεται από τη λειτουργία των ιδρωτοποιών αδένων για αυτό και πρέπει να πραγματοποιείται σε κλιματιζόμενο δωμάτιο με σταθερή θερμοκρασία. [24]

$$TEWL = \frac{1}{A} \times \frac{dm}{dt} = -D \times \frac{dp}{dx}$$



Όπου  $A$  = η επιφάνεια ( $m^2$ ),  $m$  = η μάζα νερού που αποβάλλεται ( $g$ ),  $t$  = ο χρόνος ( $h$ ),  $D$  = η σταθερά διάχυσης ( $0.0877g/m.h.mmHg$ ),  $p$  = η τάση ατμών νερού ( $mm\ Hg$ ) και  $x$  = η απόσταση από την επιφάνεια του δέρματος έως το σημείο μέτρησης ( $m$ ). [24]

### **3.1.7. Προσδιορισμός μικροτοπογραφίας δέρματος:**

Υπεριώδης φωτογράφιση με απευθείας επαφή στο δέρμα (Skin Visioscan): Για το προσδιορισμό της μικροτοπογραφίας του δέρματος με Visioscan. Η συσκευή φέρει κάμερα UVA. Λαμβάνεται η φωτογραφία της εξεταζόμενης περιοχής. Το λογισμικό του υπολογιστή με τον οποίο είναι συνδεδεμένη η συσκευή προσδιορίζει τις παρακάτω παραμέτρους:

- Παράμετροι υφής
- Παράμετροι SELS (Surface Evaluation of Living Skin, Αξιολόγηση Επιφάνειας Ζωντανού Δέρματος). [24]

#### **3.1.7.1. Παράμετροι υφής:**

- Ενέργεια (Energy, NRJ): Η τιμή αυτή είναι υψηλή σε νεανικά, ενυδατωμένα δέρματα.
- Ποικιλία (Variety, VAR): Είναι η τοπική ποικιλία για έναν αριθμό κουκίδων της οθόνης. Εκφράζει την τραχύτητα του δέρματος. Το ζητούμενο είναι η τιμή αυτή να μειωθεί με τη χρήση καλλυντικού προϊόντος.
- Αντίθεση (Contrast, CONT): Είναι η διαφορά μεταξύ των γκρι επιπέδων δυο γειτονικών κουκίδων της οθόνης. Το ζητούμενο είναι να μειωθεί η τιμή αυτή.
- Εντροπία (Entropy, ENT): Εκφράζει την ακαταστασία της εικόνας. Όσο πιο ενυδατωμένο είναι το δέρμα, τόσο πιο ακατάστατη εμφανίζεται η εικόνα, το γκρι χρώμα τονίζεται και η τιμή της εντροπίας είναι μεγάλη.
- Ομοιογένεια (Homogeny, HOM): Είναι η ομοιομορφία της εικόνας. Όσο χαμηλότερη είναι, τόσο αυξάνεται η γκρι απόχρωση. Ένα καλά ενυδατωμένο δέρμα έχει υψηλότερη τιμή ομοιογένειας. [24]

#### **3.1.7.2. Παράμετροι SELS:**

- S<sub>Esc</sub> (Scaliness, αποφολίδωση): Υπολογίζει την αναλογία φωτεινών κουκίδων. Στο καλά ενυδατωμένο δέρμα, η τιμή αυτή είναι μικρή.
- S<sub>Er</sub> (Roughness, τραχύτητα): Υπολογίζει την αναλογία σκοτεινών κουκίδων. Όσο απαλότερο είναι το δέρμα, τόσο χαμηλότερη είναι αυτή η τιμή.

- SEw (Wrinkles, ρυτίδωση): Είναι ανάλογο του αριθμού και του πλάτους των ρυτίδων. Όσο περισσότερες είναι οι ρυτίδες, τόσο μεγαλύτερη η τιμή αυτή.
- SEsm (Smoothness, απαλότητα): Είναι ανάλογο του πλάτους των ρυτίδων. Όσο πιο αποτελεσματική η αντιγηραντική/ενυδατική θεραπεία, τόσο μεγαλύτερη η τιμή αυτή.
- Rku (Kurtosis): Όσο πιο κοντά είναι η τιμή αυτή στο 3, τόσο πιο απαλό είναι το δέρμα. [24]

**3.1.8. Ορατό αποτέλεσμα σύσφιξης / ανόρθωσης (visual lifting effect):** Για τον προσδιορισμό της σύσφιξης/ανόρθωσης χρησιμοποιείται το VECTRA®, μετρώντας την απόσταση μεταξύ ανώτερου και κατώτερου τμήματος του προσώπου (από τη γραμμή του τριχωτού της κεφαλής έως το κατώτατο όριο του προσώπου, την κάτω γνάθο), σε δύο σημεία από κάθε πλευρά: έσω και πλάγιο κανθό. [16]

## **3.2. Μέθοδοι προσδιορισμού της διαβατότητας**

**3.2.1. Κυψελίδες διάχυσης (in vitro):** Είναι κατασκευασμένες από αδρανές υλικό που δεν παρουσιάζει απορροφητικότητα. Το τεμάχιο τοποθετείται μεταξύ των δυο κυψελίδων. Χρησιμοποιείται όλο το δέρμα, επιδερμίδα και χόριο. Εφαρμόζεται η εξεταζόμενη ουσία ή το καλλυντικό προϊόν στην επιφάνεια του τεμαχίου. Η θερμοκρασία του υγρού υποδοχής πρέπει να διατηρείται σταθερή. Ακολουθεί ανάδευση του υγρού υποδοχής και λήψη δείγματος. Η διερχόμενη ποσότητα προσδιορίζεται με αναλυτικές τεχνικές κατά το διάστημα της δυναμικής ισορροπίας. [24]

**3.2.2. Διάταξη HPLC (in vivo):**

- Εφαρμογή και απορρόφηση της ουσίας από την κερατίνη στιβάδα.
- Αποκόλληση των κερατινοκυττάρων και εκχύλισή τους με τον κατάλληλο διαλύτη.
- Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της εξεταζόμενης ουσίας στα υγρά εκχύλισης.
- Μέθοδος εξαφανίσεως μιας ουσίας από την επιφάνεια του δέρματος.
- Διαδερμική απορρόφηση της ουσίας, μετριέται η συγκέντρωση στο αίμα ή τα ούρα. [24]

## Κεφάλαιο 4. Μέθοδοι προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας και κατηγοριοποίησή τους

Υπάρχει ποικιλία αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων συστατικών, βάσει των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων. Αυτές οι μέθοδοι, συνήθως κατηγοριοποιούνται σε δύο υποομάδες βάσει του τρόπου οξειδοαναγωγής, όπου η μία υποομάδα είναι αυτές που βασίζονται σε μεταφορά ατόμου υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT) και η άλλη είναι αυτές που βασίζονται σε μεταφορά ηλεκτρονίου (Electron Transfer, ET). Στις αντιδράσεις HAT, γίνεται μέτρηση των ανταγωνιστικών κινητικών και η ποσοτικοποίηση προκύπτει από τις κινητικές καμπύλες, ενώ στις ET, περιλαμβάνονται αντιδράσεις οξειδοαναγωγής στις οποίες το οξειδωτικό αποτελεί το δείκτη για την καταγραφή της κινητικής της αντίδρασης. Οι μέθοδοι που βασίζονται στη μεταφορά υδρογόνου (HAT) περιλαμβάνουν μια ουσία, η οποία παράγει μια ελεύθερη ρίζα, ένα δείκτη, ο οποίος οξειδώνεται κατά την πρόοδο της αντίδρασης, και ένα αντιοξειδωτικό. Κατέχουν ανταγωνιστικό σχήμα αντίδρασης, όπου το αντιοξειδωτικό και το υποστρώμα ανταγωνίζονται για τις ρίζες. Σκοπός τους είναι η μέτρηση της ικανότητας του αντιοξειδωτικού να δεσμεύσει ελεύθερες ρίζες ή να παρεμποδίσει μία οξειδωτική αντίδραση. Οι μέθοδοι που βασίζονται στη μεταφορά ηλεκτρονίου (ET) υπολογίζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα από την αλλαγή στη χρώση, καθώς αυτή αλλάζει όταν μειώνονται οι ρίζες. Καθεμία μέθοδος χρησιμοποιεί διαφορετικά χρωμογόνα οξειδοαναγωγικά αντιδραστήρια με διαφορετικές τυπικές λειτουργίες. [8], [13]

*Οι μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης μπορούν να ταξινομηθούν σε:*

- Διαδικασίες κατά τις οποίες η κατανάλωση μιας σταθερής ρίζας μετράται έπειτα από την προσθήκη του εξεταζόμενου δείγματος,
- Διαδικασίες όπου καταγράφεται η κινητική της οξείδωσης,
- Διαδικασίες όπου προσδιορίζεται ποσοτικά η κατανάλωση του υποστρώματός της,
- Διαδικασίες στις οποίες προσδιορίζονται ποσοτικά τα προϊόντα οξείδωσης. [13]

Είναι σημαντικό να εκτιμηθεί ο χρόνος αντίδρασης πριν ξεκινήσουμε τη μελέτη. Η συγκέντρωση του υποστρώματος (αντιοξειδωτικού) θα πρέπει να κρατηθεί στη μικρότερη δυνατή ποσότητα. Αυτό θα μας διευκολύνει, επίσης, να καταλήξουμε σε

έγκυρες εκτιμήσεις των παραμέτρων που χρειαζόμαστε, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας, μέσω των μεθόδων ανάλυσης. [8]

#### **4.1. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας βάσει αλλαγής χρώσης σταθερών ελευθέρων ριζών**

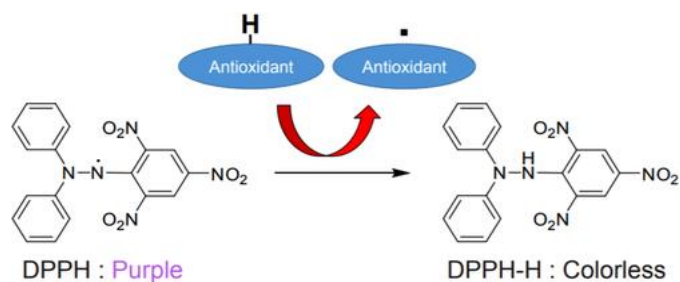
Αυτές οι μέθοδοι ακολουθούν απλή πειραματική διαδικασία και έχουν χαμηλό κόστος εξοπλισμού, καθιστώντας τις πολύ προσιτές. Βασίζονται κυρίως στην υψηλή μοριακή απορρόφηση και στη σταθερότητα των ελευθέρων ριζών. Κατά την εκτέλεσή τους, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με τα αντιοξειδωτικά με μεταφορά ηλεκτρονίου ή με μεταφορά υδρογόνου και μετατρέπονται σε σταθερές ουδέτερες οργανικές ενώσεις, αλλάζοντας ταυτόχρονα τη χρώση του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται. [13]

##### **4.1.1. Μέθοδος DPPH\* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, 2,2-διφαινύλο-1-πικρυλο-υδραζίνη)**

Η μέθοδος DPPH\* είναι μια πολύ διαδεδομένη μέθοδος, η οποία ενδείκνυται ιδιαίτερα για την ανάλυση φαινολικών ενώσεων και παραγώγων. Αποτελεί μια *in vitro* μέθοδο, η οποία χρησιμοποιείται για να υπολογισθεί η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (total antioxidant capacity, TAC) μιας ουσίας και να υποστηριχθούν οι ισχυρισμοί καλλυντικών προϊόντων. Στα οφέλη της συμπεριλαμβάνεται το ότι είναι μια απλή και οικονομική μέθοδος, όπου τα αποτελέσματά της μπορούν να επαναληφθούν, με μεγαλύτερη ευαισθησία από άλλες μεθόδους ανάλυσης. Έχουν παρατηρηθεί ακόμα και αδύναμα αντιοξειδωτικά να δίνουν εμφανή αποτελέσματα μετά τα 30 λεπτά επώασης. Λόγω της σταθερής θερμοκρασίας δωματίου, στην οποία εκτυλίσσεται η μέθοδος, μπορούν να εξετασθούν ακόμα και θερμικά ασταθείς ενώσεις. Τέλος, δίνει τη δυνατότητα να εξετασθούν ακόμα και πολλαπλά δείγματα ταυτόχρονα. Παρόλα τα θετικά που παρουσιάζει αυτή η μέθοδος δεν παύει να έχει και κάποιους περιορισμούς στη χρήση της, όπως το ότι η DPPH\* έχει τη δυνατότητα να διαλυθεί μόνο σε οργανικούς διαλύτες. Επιπρόσθετα, αντιδρά με άλλες παρευρισκόμενες στο διάλυμα ρίζες και είναι ευαίσθητη στις βάσεις Lewis. Επιπλέον, το ότι η μέθοδος πρέπει πάντα να διενεργείται στο σκοτάδι, καθώς η απορρόφηση μειώνεται στην επαφή της με το φως. [25]

Η μέθοδος βασίζεται στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων υπολογίζοντας την ικανότητα μεταφοράς υδρογόνου (Hydrogen Atom Transfer, HAT) (Εικόνα 16) ή δέσμευσης ριζών (radical scavenging), χρησιμοποιώντας

τη σταθερή ρίζα DPPH. [9] Η σταθερή ρίζα DPPH αποτελεί μια οργανική ρίζα αζώτου με βαθιά μωβ χρώση. Όταν ένα διάλυμα DPPH αναμιγνύεται με κάποιο αντιοξειδωτικό η χρώση του μετατρέπεται από βαθύ μωβ σε απαλό κίτρινο, της αντίστοιχης υδραζίνης (Εικόνα 17). Η μέθοδος εφαρμόζεται με δύο τρόπους, το δυναμικό και το στατικό. Όπου στο δυναμικό, μετράται ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης της ρίζας DPPH\* μετά από την προσθήκη του αντιοξειδωτικού, ενώ στο στατικό μετράται η ποσότητα της ρίζας DPPH\* που έχει δεσμευτεί από το εξεταζόμενο δείγμα. Η ικανότητα ενός αντιοξειδωτικού να μειώσει τη συγκέντρωση της DPPH μπορεί να υπολογισθεί μετρώντας τη μείωση της απορρόφησης στα 515-528nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε IC50 ή % αντιοξειδωτική ικανότητα σε συγκεκριμένη συγκέντρωση αντιοξειδωτικού για όλα τα δείγματα. [25]



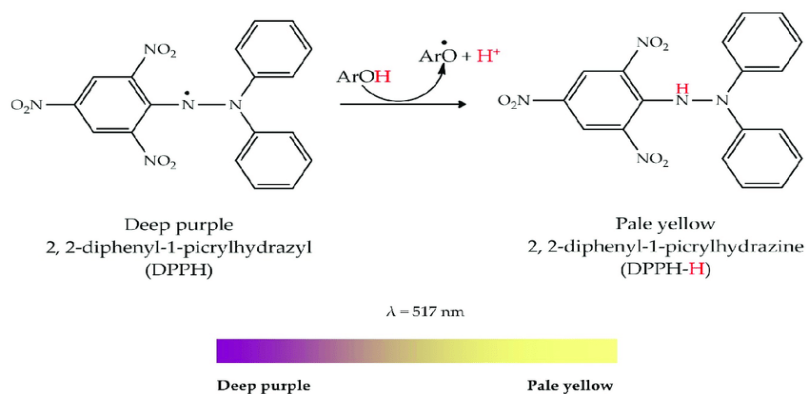
Εικόνα 16. Αντίδραση μεταξύ DPPH\* και αντιοξειδωτικού για το σχηματισμό DPPH-H.

Chemical reactions:



where ArOH: phenolic AO

Mechanism of reaction: HAT



Εικόνα 17. Μηχανισμός μεταφοράς υδρογόνου (HAT).

*Διαδικασία της μεθόδου συνοπτικά:*

- Φτιάχνουμε ένα μεθανολικό ή αιθανολικό διάλυμα DPPH \* το οποίο απορροφά σε  $\lambda=515-520\text{nm}$  (Διάλυμα Α)
- Προσθέτουμε την εξεταζόμενη αντιοξειδωτική ουσία που περιέχει ομάδες όπως φαινολομάδα (Ar -OH), σουλφυδρυλομάδα (-SH). DPPH \* + προς έλεγχο αντιοξειδωτική ουσία (Διάλυμα Β)
- Το διάλυμα διατηρείται στο σκοτάδι, στους 30°C, για 30 λεπτά.
- Θα πραγματοποιηθεί μια χημική αντίδραση, με ταχύτητα ανάλογη της ενζυμικής κινητικής της εξεταζόμενης αντιοξειδωτικής ουσίας, μεταξύ της εξεταζόμενης αντιοξειδωτικής ουσίας και της DPPH \* (Διάλυμα Β)
- Θα υπάρξει ένα προϊόν της χημικής αυτής αντίδρασης άρα θα μεταβληθεί η απορρόφηση του διαλύματος Β.
- Αυτή η μεταβολή της απορρόφησης μπορεί να μετρηθεί μέσω ενός Φασματοφωτόμετρου UV-Vis ή/και HPLC ή/και LC-MS και έτσι να μπορέσει να αποδειχθεί η αντιοξειδωτική δράση ενός συστατικού. Η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι αντιστρόφως ανάλογη της απορρόφησης. Συνεπώς ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό θα προκαλέσει μείωση της απορρόφησης στα 517nm. [26]

*ικανότητα αναστολής (%)*

$$= \frac{(\text{απορρόφηση δείγματος ελέγχου} - \text{απορρόφηση εξεταζόμενου})}{\text{απορρόφηση δείγματος ελέγχου}} \times 100$$

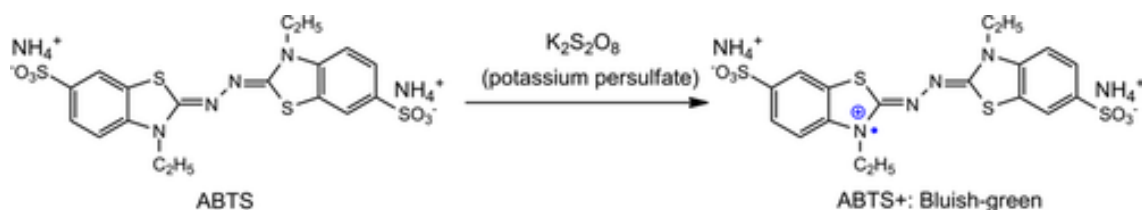
διάλυμα δείγματος ελέγχου: DPPH\* + μεθανόλη ή αιθανόλη

διάλυμα εξεταζόμενου: DPPH\* + εξεταζόμενη αντιοξειδωτική ουσία [25]

#### **4.1.2. Μέθοδος ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), 2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικό οξύ))**

Η μέθοδος ABTS χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αναστολής κατιονικών ριζών ABTS. Το προϊόν οξείδωσης του ABTS χρησιμοποιείται ως οξειδωτικός παράγοντας για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας βιολογικών δειγμάτων και αποτελεί μια in vitro μέθοδο. Πριν χρησιμοποιηθεί, το ABTS οξειδώνεται με υπερθειικό κάλιο ή διοξείδιο του μαγγανίου και μετατρέπεται σε κατιονική ρίζα (ABTS<sup>•+</sup>), αφού χάνει ένα ηλεκτρόνιο από το άτομο αζώτου του ABTS και αποκτά μπλε-πράσινη χρώση (Εικόνα 18) και απορρόφηση στα 743nm. Μετά την

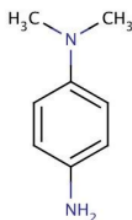
προσθήκη του εξεταζόμενου δείγματος, ο στόχος είναι ένα άχρωμο τελικό προϊόν αντίδρασης (ABTS), καθώς η παρουσία αντιοξειδωτικού στο δείγμα προκαλεί ανάσχεση του σχηματισμού της κατιονικής ρίζας  $ABTS^{*+}$ , ο βαθμός αποχρωματισμού είναι ανάλογος και υποδεικνύει την συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Ο προσδιορισμός γίνεται φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 734nm, όπου δεν απορροφούν άλλες ουσίες, ώστε να μην παρεμποδίζεται η μέτρηση. [6], [25], [26]



Εικόνα 18. Σχηματισμός  $ABTS^{*+}$  μέσω αντίδρασης με υπερθειικό κάλιο.

Η διαδικασία είναι πολύ απλή και εύκολη στην εφαρμογή, επειδή οι χρόνοι επώασης είναι πολύ μικροί, 5-30 λεπτά, και οι μετρήσεις απορρόφησης είναι πολύ γρήγορες λόγω της χρήσης συσκευής ανάγνωσης πλάκας. [6]

#### 4.1.3. Μέθοδος $DMPD^{*+}$ (*N,N*-διμεθυλο-*p*-φαινολοδιαμίνης, *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine)



Εικόνα 19. Μοριακή δομή της *N,N*-διμεθυλο-*p*-φαινολοδιαμίνης (*DMPD*).

Η μέθοδος *DMPD* αποτελεί μια *in vitro* μέθοδο προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας ουσιών, όπου η κατιονική ρίζα  $DMPD^{*+}$  παράγεται από την αντίδραση ενός οξειδωτικού με *DMPD* σε όξινο περιβάλλον. Η παραγόμενη ρίζα ( $DMPD^{*+}$ ) παρουσιάζει απορρόφηση στα 505nm, ενώ η μείωση της απορρόφησής της, με παρουσία αντιοξειδωτικής ουσίας, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής της ικανότητας. Ο χρόνος της αντίδρασης της ουσίας με τη ρίζα είναι μικρός (περίπου 10 λεπτά) και το τέλος της αντίδρασης είναι ευδιάκριτο και σταθερό. [13]

#### **4.1.4. Μέθοδος EPR spectroscopy (Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, Φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού)**

Η EPR spectroscopy αποτελεί μια μέθοδο ανάλυσης των ελευθέρων ριζών που εκτελείται in vivo και in vitro. Ανιχνεύει το παραμαγνητικό κέντρο με το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο/ασύζευκτα ηλεκτρόνια και δίνει πληροφορίες για την αλληλεπίδρασή του(ς) με γειτονικούς πυρήνες των ατόμων της ρίζας (φάσμα EPR). Η εξεταζόμενη αντιοξειδωτική ουσία θα ανιχνεύσει αυτή τη ρίζα, θα αντιδράσει με το ασύζευκτο ηλεκτρόνιό της και θα παρουσιασθεί μεταβολή στο φάσμα EPR. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγεται το ότι είναι η μόνη μέθοδος ανάλυσης που μπορεί να εντοπίσει είδη ελευθέρων ριζών και παροδικές διεγερμένες καταστάσεις, με μη-επεμβατικό και άμεσο τρόπο, ότι μπορεί να εφαρμοσθεί σε στερεό, υγρό και αέριο δείγμα και σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, πράγμα που την καθιστά ιδιαίτερος ευέλικτη. Ο περιορισμός αυτής της μεθόδου είναι η ακριβή η οργανολογία της. Η EPR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εντοπισθεί, να ποσοτικοποιηθεί και να παρακολουθηθεί η ενδογενής φωτογένεση ειδών με μικρή διάρκεια ζωής, οπότε είναι πολύ ωφέλιμη στο να εντοπισθούν ελεύθερες ρίζες σε φωτοχημικές αντιδράσεις «φαρμακοκαλλυντικών» σκευασμάτων, στην επιστήμη των πολυμερών, στο περιβάλλον, κ.ά. [26], [27]

*Διαδικασία της In Vivo μεθόδου συνοπτικά:*

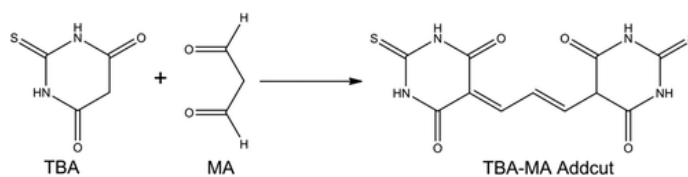
- Η ρίζα TEMPO\* (2,2,6,6 tetramethylpiperidine-1-oxyl, 2,2,6,6 τετραμεθυλπιπεριδινο-1-οξυλ, δεσμεύει υδροξύ ρίζες και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) εφαρμόζεται σε συγκεκριμένη δερματική περιοχή
- Το αντιοξειδωτικό σύστημα του δέρματος αντιδρά με τη ρίζα TEMPO και προκύπτει από την αντίδραση της TEMPO\* ένα συγκεκριμένο φάσμα EPR
- Εφαρμόζεται η εξεταζόμενη αντιοξειδωτική ουσία και υπολογίζεται η μεταβολή του φάσματος EPR (Πριν και μετά την εφαρμογή). [26]

#### **4.2. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας βάσει μέτρησης των προϊόντων οξείδωσης**

Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στη μέτρηση πρωτογενών και δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης, όπου η οξείδωση προκαλείται με χρήση θερμοδιασπώμενων ενώσεων αζώτου ή μετάλλων μεταπτώσεως. [13]



#### 4.2.1. Μέθοδος TBA (2-thiobarbituric acid, 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ)



Εικόνα 20. Σχηματισμός συμπλόκου TBA-MA.

Η μέθοδος TBA είναι μια *in vitro* μέθοδος, η οποία χρησιμοποιεί 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ ώστε να αλληλοεπιδράσει με τη μηλονική διαλδεΰδη και να σχηματίσει μία ροζ ένωση, με μέγιστη απορρόφηση στα 532nm. Η μηλονική διαλδεΰδη αποτελείται από λιπαρά οξέα με λιγότερους από τρεις διπλούς δεσμούς. Η οξείδωση που προκαλείται από τα μεταλλοϊόντα ή από την παρουσία ελευθέρων ριζών, παρεμποδίζεται από την προσθήκη αντιοξειδωτικών και καταγράφεται η μείωση της απορρόφησης. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως το γινόμενο της απορρόφησης στα 532 nm και του συντελεστή απορρόφησης της μηλονικής διαλδεΰδης, το οποίο αναφέρεται ως τιμή TBA. [25]

*Διαδικασία της μεθόδου συνοπτικά:*

- Προστίθενται δείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων σε υδατικό διάλυμα που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα τρομεθαμίνης (Tris-buffer), χλωριούχο κάλιο (KCl), 1% SDS, μουρουνέλαιο (αυτό μπορεί να είναι οποιοδήποτε είδος λιπιδίου, όπως το λινελαϊκό οξύ, το αραχιδονικό οξύ, ή ω-3 λιπαρά οξέα), δισθενής χλωριούχος σίδηρος (FeCl<sub>2</sub>) και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),
- Τοποθετούνται σε ένα καφέ αδιαφανές φιαλίδιο (ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία).
- Το δείγμα επώάζεται για 18 ώρες στους 37°C με ανάδευση.
- Μετά την επώαση, καταστέλλεται η οξείδωση προσθέτοντας 4% BHT (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο) σε αιθανολικό διάλυμα και το αντιδραστήριο TBA (0.67% TBA, TCA, 1% SDS, 5 N HCl).
- Το δείγμα θερμαίνεται στους 80°C για 1 ώρα και ρίχνουμε τη θερμοκρασία του σε μπάνιο πάγου για 10 λεπτά.
- Μετρίεται η απορρόφηση του προϊόντος στα 532nm. [25]

#### **4.2.2. Μέθοδος TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity, Ολική Ικανότητα Δέσμευσης Οξυριζών)**

Η μέθοδος TOSC, είναι μια αρκετά συνηθισμένη *in vitro* μέθοδος, στην οποία χρησιμοποιείται η αεριοχρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των ουσιών. Υπάρχουν κάποιες παραλλαγές της μεθόδου όπου αλλάζει, κυρίως, το είδος των αντιδραστηρίων. Η πιο χαρακτηριστική από αυτές αναφέρεται στη θερμική διάσπαση του 2,2-αζω-δις-(αμινοπροπανίου), ABAP και την παραγωγή ριζών υπεροξειδίου. Οι ρίζες οξειδώνουν το 2-κετο-4-θειομεθυλοβουτυρικό οξύ, με ταυτόχρονη παραγωγή αιθυλενίου. Η παρουσία αντιοξειδωτικών στο δείγμα αποτρέπει την οξείδωση του 2-κετο-4-θειομεθυλοβουτυρικού οξέος. Με συνεχείς δειγματοληψίες στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ανιχνεύεται το εκλύμενο αιθυλένιο με αεριοχρωματογραφία. Προσδιορίζεται η αντιοξειδωτική ικανότητα του εξεταζόμενου δείγματος, συγκρίνοντας τα αποτελέσματά του με αυτά ενός πρότυπου διαλύματος. [13]

#### **4.2.3. Μέθοδος $\beta$ -Carotene Bleaching (Αποχρωματισμού του $\beta$ -Καροτενίου)**

Αποτελεί μια *in vitro* μέθοδο ανάλυσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, η οποία χρησιμοποιεί το  $\beta$ -καροτένιο συνδυασμένο με λιπίδια, συμπεριλαμβανομένου του λινελαϊκού οξέος. Λιπίδια όπως αυτό, σχηματίζουν μια ρίζα υπεροξυλίου, παρουσία ROS και  $O_2$ . Η ρίζα που σχηματίζεται αντιδρά με  $\beta$ -καροτένιο και σχηματίζει μια σταθερή ρίζα  $\beta$ -καροτενίου, έτσι η ποσότητα καροτενίου στο δείγμα μειώνεται. Εάν παρευρίσκεται αντιοξειδωτικό στο δείγμα, τότε αυτό δρα ανταγωνιστικά με τη ρίζα υπεροξυλίου. Κατά συνέπεια, η επίδραση των αντιοξειδωτικών μπορεί εύκολα να διαπιστωθεί μέσω της λεύκανσης του χρώματος του δείγματος με ένα φασματοφωτόμετρο στα 470nm, όπου είναι η τυπική απορρόφηση του  $\beta$ -καροτενίου. [9], [25]

*Διαδικασία της μεθόδου συνοπτικά:*

- Σε διάλυμα  $\beta$ -καροτενίου προστίθεται λινελαϊκό οξύ και 100 % Tween 20.
- Δημιουργούνται μεθανολικά δείγματα αυτού σε αύξοντες συγκεντρώσεις.
- Επωάζονται σε μπάνιο νερού στους 40 °C για 120 λεπτά.
- Μετρείται η απορρόφηση στα 470nm χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο υπεριώδους/ορατού.
- Υπολογίζεται η % αντιοξειδωτική ικανότητα και εκφράζεται ως ποσοστό αναστολής της οξείδωσης του  $\beta$ -καροτενίου. [9]

#### **4.2.4. Μέθοδος ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity, Ικανότητα**

##### **Απορρόφησης Ριζών Οξυγόνου)**

Η μέθοδος ανάλυσης ORAC προσδιορίζει την ικανότητα διάσπασης της ρίζας υπεροξυλίου (HOO<sup>•</sup>), λόγω της θερμικής αποσύνθεσης του AAPH στους 37°C. Χρησιμοποιείται φλουορεσκεΐνη ως φθορίζων δείκτης. Η φλουορεσκεΐνη είναι φθορίζουσα ουσία η οποία αποικοδομείται παρουσία ελευθέρων ριζών με αποτέλεσμα μεταβολή στο φάσμα εκπομπής φθορισμού της. Η απώλεια στο φθορισμό είναι ένδειξη του μεγέθους της βλάβης, από την αντίδραση της φλουορεσκεΐνης με τη ρίζα υπεροξυλίου. [26]

*Διαδικασία της μεθόδου συνοπτικά:*

- Με τη θερμική διάσπαση της ουσίας 2,2'αζω δις (2-αμιδινο-προπάνιο) δις-υδροχλωρικό AAPH παράγονται υδρόξυ ρίζες.
- Παρασκευάζονται τα διαλύματα : Φλουορεσκεΐνη (Διάλυμα Α), φλουορεσκεΐνη + γνωστή αντιοξειδωτική ουσία (Διάλυμα Β), φλουορεσκεΐνη + εξεταζόμενη αντιοξειδωτική ουσία (Διάλυμα Γ)
- Τοποθετούνται τα διαλύματα στους 37°C για 30 λεπτά και λαμβάνονται οι εκπομπές φθορισμού
- Προστίθεται AAPH στα διαλύματα και προκύπτει παραγωγή ελευθέρων ριζών
- Λαμβάνονται οι εκπομπές φθορισμού των διαλυμάτων μετά την επίδραση του AAPH και της παραγωγής των ελευθέρων ριζών. [26]

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ : Με αυτή τη μέθοδο προσδιορίζονται αντιοξειδωτικές ουσίες οι οποίες αντιδρούν μόνο με υδρόξυ ρίζες. [26]

#### **4.2.5. Μέθοδος HORAC (Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity)**

Αυτή η μέθοδος βασίζεται στον υπολογισμό της χηλικής ικανότητας των αντιοξειδωτικών, υπό συνθήκες αντιδράσεων τύπου Fenton. Χρησιμοποιείται ένα σύμπλεγμα κοβαλτίου (Co(II) complex) ώστε να αξιολογηθεί η προστασία ενάντια στη δημιουργία ριζών υδροξυλίου. Η φλουορεσκεΐνη επωάζεται με το προς ανάλυση δείγμα και στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα Fenton. Μετρείται ο αρχικός φθορισμός, μετά από αυτόν γίνονται μετρήσεις ανά λεπτό και έπειτα από ανακίνηση. [25]

#### **4.2.6. Μέθοδος CAA (Cellular Antioxidant Activity, Κυτταρική Αντιοξειδωτική Δράση)**

Η μέθοδος CAA χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε κυτταρικό επίπεδο. Εμπεριέχει ένα πρωτόκολλο πλύσης PBS και ένα πρωτόκολλο χωρίς, για κύτταρα HepG2 (γραμμή κυττάρων επιθηλιακής μορφολογίας που απομονώνεται από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα) αφού τους εφαρμοστούν δείγματα, ώστε να αναπαραστήσει την πολυπλοκότητα του βιολογικού συστήματος, όπως την κυτταρική απορρόφηση, το μεταβολισμό και την κατανομή των αντιοξειδωτικών. Το πρωτόκολλο πλύσης PBS αξιολογεί εάν τα φυτοχημικά θα περνούσαν εύκολα μέσω των κυττάρων ή όχι. [28] χρησιμοποιείται φθορίζουσα ουσία DCFH-DA (Dichlorodihydro-fluorescein - diacetate, Διχλωρο-διυδρο-φλουορεσκεΐνη - διακετάνιο), αυτή απορροφάται από τα καρκινικά κύτταρα ήπατος, διαπερνά την κυτταρική τους μεμβράνη και εισέρχεται στο κύτταρο, όπου υδρολύεται από τη λιπάση, σε DCFH. Από την άλλη, εφαρμόζεται στα κύτταρα η ουσία ABAP (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, 2,2'-αζωδισ(2-αμιδινοπροπάνιο)διυδροχλωρίδιο), η οποία έχει τη δυνατότητα να διαχέεται στα κύτταρα. Το ABAP αποσυντίθεται αυθόρμητα για να σχηματίσει ρίζες υπεροξυλίου. Οι σεπεροξυλικές ρίζες επιτίθενται στην κυτταρική μεμβράνη ώστε να παράγουν περισσότερες ρίζες και να οξειδώσουν το ενδοκυτταρικό DCFH στο φθορίζον DCF (dichlorofluorescein, διχλωροφλουορεσκεΐνη). Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να εμποδίσουν την οξείδωση της DCFH και των λιπιδίων της μεμβράνης και να μειώσουν το σχηματισμό DCF. Η αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορίζεται από το βαθμό μείωσης φθορισμού. [25]

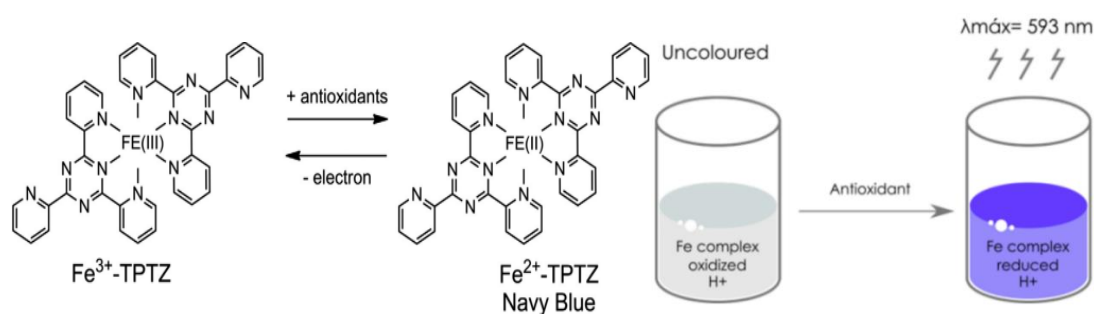
### **4.3. Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης βάσει της ικανότητας των δειγμάτων να ανάγουν μέταλλα υψηλού οξειδωτικού σθένους**

#### **4.3.1. Μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power, Αντιοξειδωτική Ικανότητα Μείωσης Σιδήρου)**

Η μέθοδος ανάλυσης FRAP εξετάζει την αναγωγή τρισθενούς σιδήρου ( $Fe^{3+}$ ) σε δισθενή σίδηρο ( $Fe^{2+}$ ), παρουσία τριαζίνης (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine, TPTZ), σε χαμηλότερο pH, εξαιτίας της δράσης αντιοξειδωτικής ουσίας. Αφού η αντίδραση του  $Fe^{3+}$ -TPTZ με ένα αντιοξειδωτικό οδηγεί στο σχηματισμό  $Fe^{2+}$ -TPTZ (εικόνα). Έτσι, υπολογίζεται η ικανότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων να αναγάγουν τον  $Fe^{3+}$  σε  $Fe^{2+}$ , μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίου (Electron Transfer, ET) (Εικόνα 21A). Η δέσμευση  $Fe^{2+}$  δίνει μια έντονη σκούρα μπλε χρώση (Εικόνα 21B). Προκειμένου να υπολογισθεί

η αντιοξειδωτική ικανότητα της εξεταζόμενης ουσίας, μετριέται η απορρόφηση στα 593nm, προσδιορίζοντας έτσι τη μείωση στην ποσότητα σιδήρου ώστε να συγκριθεί με την εναπομένουσα ποσότητα αντιοξειδωτικής ουσίας. [6], [25], [26]

Αποτελεί μια απλή και ευαίσθητη in vitro μέθοδο, η οποία χρησιμοποιείται τακτικά ώστε να εκτιμηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα βιολογικών υγρών, διατροφικών ενώσεων και συμπληρωμάτων. [6] Βρίσκει, επίσης, εφαρμογή στην ανάλυση κοσμητικών συστατικών και καλλυντικών προϊόντων (μετά από κατεργασία). [26]



Εικόνα 21. Α) Σχηματισμός συμπλέγματος  $Fe^{2+}$ -TPTZ από  $Fe^{3+}$ -TPTZ μέσω δράσης αντιοξειδωτικής ουσίας. Β) Αλλαγή χρώσης διαλύματος μετά από δράση αντιοξειδωτικού.

*Διαδικασία της μεθόδου συνοπτικά:*

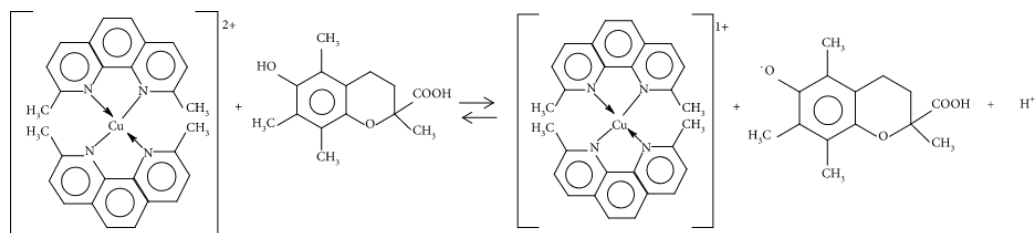
- ο Λαμβάνει χώρα αναγωγή του  $Fe^{3+}$ , που δρα ως ηλεκτρονιοδέκτης, οξειδωση της εξεταζόμενης ουσίας, που δρα ως ηλεκτρονιοδότης, και σχηματίζεται  $Fe^{2+}$  δίνοντας μεταβολή του φάσματος του διαλύματος, η οποία ανιχνεύεται και μετριέται στα  $\lambda=593\text{nm}$ . Το διάλυμα επώασθη στους  $37^\circ\text{C}$  για 5 λεπτά. [9]
- ο Η ποσοτικοποίηση γίνεται με φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης.

#### 4.3.1.1. Μέθοδος PFRAP (Ferric reducing ability of plasma, Ικανότητα Μείωσης Σιδήρου από το Πλάσμα)

Στη μέθοδο PFRAP, οι ενώσεις που κατέχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες αντιδρούν με το σιδηρικόκυανιούχο κάλιο  $K_3[Fe(CN)_6]$  και σχηματίζεται σιδηροκυανιούχο ιόν του καλίου  $K_4[Fe(CN)_6]$ . Το τελευταίο αντιδρά με το μολυσίτη ( $Fe(III)$  chloride), δίνοντας πρωσικό μπλε, μια ένωση με μπλε χρώση, με μέγιστη απορρόφηση στα 700nm. Αύξηση στην απορρόφηση μπορεί να συσχετισθεί με την ικανότητα μείωσης των αντιοξειδωτικών. [25]

### 4.3.2. Μέθοδος CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity,

#### Αντιοξειδωτική Ικανότητα Μείωσης Ιόντων Χαλκού)



Εικόνα 22. Αντίδραση οξειδοαναγωγής συμπλέγματος χαλκού-νεοκουπροΐνης και Trolox.

Η μέθοδος CUPRAC είναι απλή και ευέλικτη, *in vitro*, μέθοδος προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας, χρήσιμη για ευρύ φάσμα πολυφαινόλων, όπως των φαινολικών οξέων, των υδροξυκιναμικών οξέων, των φλαβονοειδών, των καροτενοειδών, των ανθοκυανινών και των θειολών, συνθετικών αντιοξειδωτικών και βιταμινών C και E. [29] Στη μέθοδο ανάλυσης CUPRAC, έχουμε αναγωγή του συμπλέγματος δισθενούς χαλκού-νεοκουπροΐνης  $[Cu(Nc)_2]^{2+}$  από το αντιοξειδωτικό (ηλεκτρονιοδότης), παρουσία οξικού αμμωνίου, και σχηματισμό  $[Cu(Nc)_2]^+$ , μίας κιτρινωπής ένωσης, με μέγιστη απορρόφηση στα 450nm. Τα αποτελέσματα αποδίδονται σε milligrams Trolox ανά λίτρο δείγματος. [30], [31]

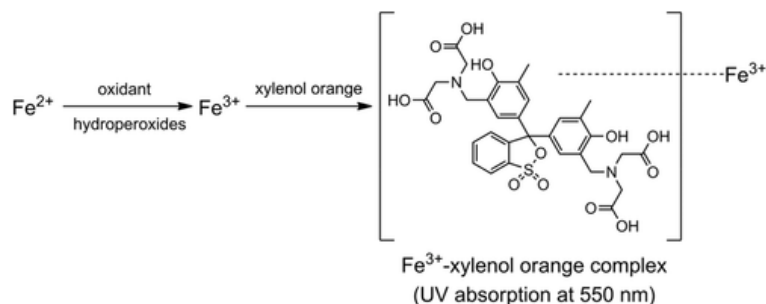
Διαδικασία της μεθόδου συνοπτικά:

- Το δείγμα αναμιγνύεται σε διάλυμα χλωριούχου χαλκού, αλκοολικό διάλυμα νεοκουπροΐνης, ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου και απιονισμένο νερό.
- Μετά από 30 λεπτά επώασης μετريέται η απορρόφηση στα 450nm.

### 4.3.3. Μέθοδος FOX (Ferrous Oxidation–Xylenol Orange, Οξείδωση Δισθενούς

#### Σιδήρου—Πορτοκαλί Ξυλενόλης)

Το αντιδραστήριο FOX αποτελεί μια *in vivo* μέθοδο, η οποία χρησιμοποιείται για να υπολογισθούν τα επίπεδα υδροϋπεροξειδίων λιπιδίων σε βιολογικά συστήματα. Δισθενή ιόντα σιδήρου οξειδώνονται για να σχηματισθούν τρισθενή ιόντα σιδήρου, τα οποία στη συνέχεια υποβάλλονται σε επεξεργασία, με xylenol orange (XO, πορτοκαλί ξυλενόλης) για να σχηματισθεί ένα σύμπλοκο τρισθενούς σιδήρου ( $Fe^{3+}$ )-XO, με μπλε-μωβ χρώση. Αυτό το σύμπλοκο εμφανίζει απορρόφηση στα 550nm. Ο σχηματισμός ή η παρουσία υδροϋπεροξειδίων σε ένα δείγμα μπορεί να παρακολουθηθεί εύκολα με ένα φασματοφωτόμετρο. [25]



Εικόνα 23. Σχηματισμός συμπλέγματος Fe<sup>3+</sup>-XO από Fe<sup>2+</sup> + οξειδωτικό

#### 4.3.4. Μέθοδος FTC (Ferric Thiocyanate, Θειοκυανικού Σιδήρου)

Οι μηχανισμοί που σχετίζονται με τη μέθοδο ανάλυσης FTC είναι ίδιοι με αυτούς της μεθόδου FOX. Η διαφορά είναι ότι ένα ιόν τρισθενούς σιδήρου, σχηματισμένο από ένα οξειδωτικό, εντοπίζεται από ένα φασματοφωτόμετρο στα 500nm ως ένα θειοκυανικό σύμπλεγμα. [25]

#### 4.3.5. Έλεγχος της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Monitoring of Inhibition of Lipid Peroxidation)

Μέσω του οξειδωτικού stress που δημιουργείται από την υπεριώδη ακτινοβολία, προκαλείται οξείδωση των λιπιδίων του δέρματος (κυρίως των ακόρεστων), αυτή ονομάζεται λιπιδική υπεροξειδωση. Σε αυτή την περίπτωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων από τα λιπίδια και παραγωγή ριζών υπεροξυλίου, ως ενδιάμεσο προϊόν. Δεν παθαίνουν όλα τα λιπίδια λιπιδική υπεροξειδωση, αλλά κυρίως μια υποομάδα τους, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (poly-unsaturated fatty acids, PUFA), αυτά είναι πιο ευάλωτα. Αποτέλεσμα της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι η παραγωγή πρωτοταγών προϊόντων υπεροξειδωσης, των υδροϋπεροξειδίων, και δευτεροταγών προϊόντων οξείδωσης (τελικών προϊόντων), των αλδεϋδών, του πεντανίου και του αιθανίου. Η μηλονική διαλδεϋδη (malondialdehyde, MDA) είναι ένα προϊόν της λιπιδικής υπεροξειδωσης, το οποίο αν προσδιορισθεί μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κοσμητικών συστατικών και τελικών καλλυντικών προϊόντων. [26]

Διαδικασία της *ex vivo* μεθόδου συνοπτικά:

- Χρησιμοποιείται ταινία αποκόλλησης κερατινοκυττάρων (tape stripping).
- Ζυγίζεται η ταινία αποκόλλησης των κερατινοκυττάρων πριν και μετά την αποκόλληση.
- Ακολουθεί UV ακτινοβολία των ταινιών με τα κερατινοκύτταρα, με τη χρήση ηλιακού προσομοιωτή.

- Ακολουθεί εκχύλιση των ταινιών με τα κερατινοκύτταρα με μεθανόλη. Αυτό το μεθανολικό εκχύλισμα, που περιέχει πλέον τη μηλονική διαλδεύδη (MDA), διότι έχει γίνει λιπιδική υπεροξειδωση, θα αντιδράσει με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (thioarbituric acid, TBA).
- Προκύπτει φθορίζουσα χημική ένωση (σύμπλοκο MDA + TBA) που μπορεί να μετρηθεί φασματοσκοπικά. [26]

#### **4.4. Άλλη κατηγορία:**

##### **4.4.1. Μέθοδος TRAP (Telomerase Repeated Amplification Protocol, Πρωτόκολλο Επαναλαμβανόμενης Ενίσχυσης Τελομεράσης)**

Η μέθοδος TRAP είναι μια δημοφιλής *ex vivo* μέθοδος προσδιορισμού της δραστηριότητας της τελομεράσης, σε κύτταρα και δείγματα ιστών που ανήκουν σε θηλαστικά. Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο ριβονουκλεοπρωτεΐνης, μια αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση του μήκους των τελομερών, καθώς προσθέτει επαναλήψεις τελομερών στα 3' άκρα των χρωμοσωμάτων. Συναντάται σχεδόν εξολοκλήρου σε καρκινικά κύτταρα (>85%), δεν μπορεί να ανιχνευθεί στα περισσότερα κύτταρα φυσιολογικού ιστού, παρέχοντας έτσι στα καρκινικά κύτταρα την ικανότητα να αποφεύγουν τη γήρανση και να έχουν απεριόριστη ικανότητα αναπαραγωγής, ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του καρκίνου. Επομένως, χρησιμεύει ως διαγνωστικός δείκτης καρκίνων. [32], [33] Η μέθοδος TRAP Περιλαμβάνει τρία στάδια: επέκταση, ενίσχυση και ανίχνευση προϊόντων τελομεράσης. Στο στάδιο της επέκτασης, προστίθενται στο υπόστρωμα (μη-τελομερικό ολιγονουκλεοτίδιο) τελομερικές επαναλήψεις, από την τελομεράση. Στο στάδιο της ενίσχυσης, τα προϊόντα της επέκτασης ενισχύονται από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές. Τέλος, στο στάδιο της ανίχνευσης, η παρουσία/απουσία της τελομεράσης ανιχνεύεται με ηλεκτροφόρηση. [34], [35]

*Διαδικασία της μεθόδου συνοπτικά:*

- Τα κύτταρα λύνονται μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει ένα απορρυπαντικό (επιφανειοδραστικό με καθαριστικές ιδιότητες).
- Μέρος του προϊόντος λύσης αναμιγνύεται με μια αντίδραση επέκτασης που περιέχει το υπόστρωμα τελομεράσης (ένα ολιγονουκλεοτίδιο DNA) και dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates, Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια), τα οποία χρησιμοποιούνται από την τελομεράση (εάν υπάρχει στο δείγμα) για την προσθήκη επαναλήψεων εξαμερών τελομερών. [32]



#### **4.4.2. Φθορισμομετρικός Έλεγχος της αναστολής της οξείδωσης των πρωτεϊνών (Fluorometric Monitoring of Inhibition of Protein Oxidation)**

*Αρχή της ex vivo μεθόδου συνοπτικά:*

- Προηγείται απομάκρυνση των λιπιδίων της κερατίνης με πλύσιμο με σαπούνι στη δερματική περιοχή των εθελοντών, που θα εφαρμοσθεί η ταινία αποκόλλησης των κερατινοκυττάρων (tape stripping)
- Κατά την οξείδωση των πρωτεϊνών που προκαλείται από το οξειδωτικό stress μέσω UVA ακτινοβολήσης παράγονται καρβονυλικά παράγωγα των πρωτεϊνών (carbonylated Proteins, CPs)
- Λαμβάνεται με τη μέθοδο tape stripping (ταινία αποκόλλησης κερατινοκυττάρων) η κερατίνη στιβάδα από ορισμένες περιοχές του δέρματος υγιών εθελοντών
- Ακτινοβολούνται τα κερατινοκύτταρα πάνω στην ταινία αποκόλλησης με UVA ακτινοβολία (ηλιακός προσομοιωτής) με δόσεις 10, 20, 30, 40, 50 J/cm<sup>2</sup> και τοποθετούνται στους 37°C για 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση
- Εκπλένονται οι ταινίες που φέρουν τα κερατινοκύτταρα με ακετόνη (για την απομάκρυνση λιπιδίων)
- Ακολουθεί χρώση με την ένωση θειοσεμικαρβαζίδιο 5 φλουορεσκεΐνη η οποία αντιδρά με τα CPs
- Τοποθετούνται οι ταινίες με τα κερατινοκύτταρα σε μικροσκόπιο φθορισμού και λαμβάνονται φωτογραφίες οι οποίες τοποθετούνται σε ειδικό ψηφιακό σύστημα που προσδιορίζει την ένταση φθορισμού
- Από την ένταση φθορισμού προσδιορίζεται η συγκέντρωση των CPs. [26]

## **Κεφάλαιο 5. Σταθερότητα αντιοξειδωτικών που ενσωματώνονται στα καλλυντικά προϊόντα**

Συχνά τα αντιοξειδωτικά είναι πολύ ευπαθείς και ασταθείς ουσίες, οι οποίες λόγω αλλαγών στο περιβάλλον τους μπορούν να αποσταθεροποιηθούν, να οξειδωθούν, να χάσουν τη δραστηριότητά τους. Έτσι, υπάρχουν διαδικασίες για την ενσωμάτωσή τους στα καλλυντικά και την προστασία τους μέσα σε αυτά, τα συστήματα χορήγησης ουσιών. Αυτά εξυπηρετούν στην προστασία των αντιοξειδωτικών από εξωτερικούς παράγοντες και την κατάληξή τους στον ιστό στόχο διατηρώντας την αρχική τους δραστηριότητα.

### **5.1. Συστήματα χορήγησης / μεταφοράς ουσιών**

Το δέρμα αποτελείται από διάφορες στιβάδες και αποτελεί ένα αποτελεσματικό φραγμό ενάντια σε εξωτερικούς παράγοντες. Όταν όμως, είναι απαραίτητο να αντιμετωπιστεί κάποια πάθηση με χορήγηση ουσιών μέσω του δέρματος, υπάρχουν τρόποι να διαπεραστεί αυτός ο φραγμός και να χορηγηθεί η ουσία τοπικά. Η πλούσια σε λιπίδια και δομικά περίπλοκη κερατίνη στιβάδα, επιτρέπει επιλεκτικά τη διείσδυση ουσιών και είναι πιο διαπερατή σε λιπόφιλα μόρια, που θέλουμε να εισχωρήσουν στα βαθύτερα στρώματα του δέρματος. Άλλες πιθανές οδοί διείσδυσης είναι οι τριχοσημηματογόνοι θύλακες και οι ιδρωτοποιοί πόροι. Για να διαπεράσει μια ουσία την κερατίνη στιβάδα θα πρέπει να έχει βάρος μικρότερο από 0.6kDa και ισορροπημένη διαλυτότητα σε νερό και έλαιο. Η χορήγηση μιας ουσίας επηρεάζεται τόσο από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ίδιας (διαλυτότητα, σταθερότητα, βιοδιαθεσιμότητα, κ.ά.), όσο και από το μέσο που θα χρησιμοποιηθεί ώστε να χορηγηθεί. Η σωστή επιλογή του μέσου χορήγησης για στοχευμένη εφαρμογή αντιοξειδωτικών σε διαταραχές του δέρματος είναι μεγάλης σημασίας, γι' αυτό αναπτύσσονται κατάλληλα συστήματα τοπικής χορήγησης για κάθε περίπτωση, που διευκολύνουν τη διείσδυση μέσω του δέρματος, όπως τα βασιζόμενα σε γαλάκτωμα (κρέμες, λοσιόν, μικρο-γαλακτώματα, νανο-γαλακτώματα, κ.ά.), σε πηκτώματα (υδροτζέλ, κ.ά.), σε λιποσώματα (νιοσώματα, τρανσφεροσώματα, κ.ά.). [16], [36]

#### **5.1.1. Πηκτώμα (Gel)**

Τα πηκτώματα χαρακτηρίζονται από μια δικτυωτή δομή, με δυνατότητα αποθήκευσης μεγάλων ποσοτήτων νερού, το οποίο τα καθιστά καλύτερα στη διάλυση των δραστικών ουσιών, κυρίως υδρόφιλων. Επιπρόσθετα, η μεταβίβαση της ουσίας στο δέρμα είναι

πολύ ευκολότερη σε σύγκριση με τα γαλακτώματα, πράγμα που εξηγεί το άμεσο εφέ δροσίματος και ενυδάτωσης που έχουν τα πηκτώματα. Παρόλα αυτά, όταν χρειάζεται να χορηγηθούν υδρόφοβες ουσίες και να αλληλεπιδράσουν με τις υδρολιπιδικές στιβάδες του δέρματος, τα γαλακτώματα υπερσχύουν των πηκτωμάτων. [16]

*5.1.1.1. Υδροπηκτώματα (Hydrogel):* Τα hydrogels είναι υδρόφιλα πολυμερή δίκτυα, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αποθηκεύσουν σημαντική ποσότητα υγρών. Είναι βιοσυμβατά και επιτρέπουν την ελεγχόμενη απελευθέρωση δραστικών ουσιών. [37]

*5.1.1.2. Οργανοτζέλ (Organogels):* Είναι ημιστερεά συστήματα, που αποτελούνται από μια οργανική υγρή φάση μέσα σε ένα τρισδιάστατο, διασταυρούμενο δίκτυο. Εμπεριέχουν γνωστούς ενισχυτές διείδυσης, όπως λιπαρά οξέα, επιφανειοδραστικά, αλκοόλες, λαυροκαπράμη (Laurocapram/azone), N-μεθυλοπυρρολιδόνη (N-methylpyrrolidone), ουρία, σουλφοξείδια, τερπενοειδή και γλυκόλες. Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα Organogels για τοπική και διαδερμική εφαρμογή, είναι τα λεκιθινικά οργανοτζέλ. Τα συστατικά αυτών διαχωρίζονται αποτελεσματικά από το δέρμα και ενισχύουν τη διείδυση πολλών δραστικών ουσιών. Αυτό οφείλεται στη λεκιθίνη και σε κάποιους διαλύτες, όπως μυριστικό ισοπροπυλεστέρα (isopropyl myristate) και ελαϊκό αιθύλιο (ethyl oleate). Τα δίκτυα Organogel μπορούν να σχηματιστούν με δύο τρόπους. Ο πρώτος είναι ο σχηματισμός κλασικού πηκτώματος μέσω πολυμερισμού. [36], [38]

### **5.1.2. Μικρο-/Νανο-γαλακτώματα (Micro-/Nano-emulsions)**

Η νανοτεχνολογία είναι ένας ανερχόμενος τομέας, ο οποίος ασχολείται με τη νανοκλίμακα με την οποία οι επιστήμες της φυσικής, της χημείας και της βιολογίας μπορούν να τροποποιήσουν και να δημιουργήσουν δομές ξεχωριστών μορίων σε μεγέθη μεταξύ 1 και 1000nm, αποκαλούμενα ως νανοσωματίδια (nanoparticles, NPs) και νανοπολυμερή (nanopolymers, NPOs). Τα νανοκαλλυντικά, ανάλογα με τους φορείς που χρησιμοποιούν, μπορούν να είναι μικρο-/νανο-γαλακτώματα ή μικρο-/νανο-πολυμερή, χαρακτηριζόμενα από τη συμπερίληψη επιλεγμένων NPs. Και οι δυο αυτές δομές διαθέτουν νέα μοριακή οργάνωση και διάσταση νανομεγέθους, δίνοντάς τους διαφορετικές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες λόγω της υψηλής αναλογίας επιφάνειας-όγκου, σε σύγκριση με μεγαλύτερα σωματίδια. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των NPs και NPOs, για την επίτευξη αποτελεσματικών συνθέσεων, είναι πολλά. Ο στόχος είναι να μπορούν να διανεμούν τις δραστικές ουσίες στο σωστό βάθος, τη σωστή ποσότητα/δόση, στο σωστό χρόνο. [39] Μια μοναδική κατηγορία πολυμερών νανοσφαιρών είναι παρασκευασμένα από ομάδα βιοσυμβατών, αμφίφιλων, μη

κυτταροτοξικών συμπολυμερών προερχόμενα από τυροσίνη. Αυτά έχουν αναπτυχθεί και ερευνηθεί για ιατρικές εφαρμογές. [40]

Τα μικρογαλακτώματα είναι καθαρά, θερμοδυναμικά σταθερά, ισοτροπικά υγρά διαλύματα ελαίου, νερού και επιφανειοδραστικού. Το μέγεθος των σταγονιδίων της διεσπαρμένης φάσης τους είναι μικρότερο από 100nm. Είναι γνωστά για την αύξηση της απορρόφησης των δραστικών ουσιών σε τοπική εφαρμογή. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ενισχυμένη διείσδυση των φορέων, συχνά κορεσμένων ή ακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία αποτελούν την ελαιώδη φάση. [36]

### **5.1.3. Γαλακτώματα πολλαπλών φάσεων (*Multiple Emulsions*)**

Τα γαλακτώματα πολλαπλών φάσεων είναι μια εξέλιξη στην τεχνολογία των γαλακτωμάτων, όπου σφαιρίδια της διεσπαρμένης φάσης εμπεριέχουν, τα ίδια, μικρότερα διεσπαρμένα σταγονίδια διαφορετικής φάσης. Αποτελούν σύνθετα πολυδισεπαρμένα συστήματα με εξωτερική και εσωτερική φάση, διαχωριζόμενες από μια ενδιάμεση φάση. Σε αυτά συνυπάρχουν νερό σε έλαιο (water in oil, w/o) και έλαιο σε νερό (oil in water, o/w) γαλακτώματα, και για τη σταθεροποίησή τους είναι απαραίτητα υδρόφιλα και λιπόφιλα επιφανειοδραστικά, αντίστοιχα. Σε αυτά τα γαλακτώματα, έχουμε τη δυνατότητα να ενσωματώσουμε υδρόφιλα και λιπόφιλα συστατικά. Μεγαλύτερο εύρος εφαρμογής έχουν τα γαλακτώματα νερό σε έλαιο σε νερό (water-in-oil-in-water, w/o/w) σε σχέση με τα έλαιο σε νερό σε έλαιο (oil-in-water-in-oil, o/w/o). Τα γαλακτώματα πολλαπλών φάσεων είναι αρκετά δημοφιλή ως συστήματα τοπικής χορήγησης, καθώς έχουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως μεγάλη χωρητικότητα ενθυλακωμένων συστατικών, προστασία της ενθυλακωμένης ουσίας, χαμηλό ιξώδες λόγω υδατικής εξωτερικής φάσης, απαλή υφή και χαμηλή ερεθιστικότητα. Δρουν ως συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης, όπου η ουσία είναι αποθηκευμένη στην εσωτερική φάση και απελευθερώνεται στην εξωτερική, πριν απορροφηθεί από το δέρμα. Εξελιγμένα συστήματα χορήγησης είναι τα νανογαλακτώματα, όπου η διάμετρος των διεσπαρμένων σταγονιδίων είναι 20-200nm. Αυτά παρέχουν αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα στις ουσίες και καλύτερη διείσδυσή τους στο δέρμα. [16]

### **5.1.4. Γαλακτώματα-πηκτώματα (*Emulgels, Γαλακτώματα Υδροπηκτώματα, Emulsion Hydrogels*)**

Τα γαλακτώματα-πηκτώματα (emulgel), ως γαλακτώματα w/o ή o/w που η εξωτερική τους φάση είναι πήκτωμα, αποτελούν ημιστέρεα συστήματα χορήγησης ουσιών, διπλού

ελέγχου απελευθέρωσης, που παρέχουν το συνδυασμό γαλακτωμάτων με πήκτωμα, έχοντας, έτσι, τα πλεονεκτήματα και των δύο συστημάτων, όπως είναι η θιξοτροπία, η καλή ικανότητα επάλειψης, η καλύτερη αποδοχή από το χρήστη, η έλλειψη λιπαρότητας, η μαλακτική ικανότητα, η καλύτερη σταθερότητα της δραστικής ουσίας (κυρίως υδροφοβικών), αλλά και η σταθερότητα του ίδιου του προϊόντος, έχοντας ελεγχόμενο ρυθμό απελευθέρωσης. Υπάρχουν δυο ειδών πηκτωματοποιητές, οι φυσικοί και οι συνθετικοί. Σε σύγκριση με νανο-κυστικές δομές, όπως είναι τα λιποσώματα και τα νιοσώματα, τα emulgel προσφέρουν καλύτερη ικανότητα αποθήκευσης λόγω του πηκτικού παράγοντα, και είναι ευκολότερα στην παραγωγή, αφού χρειάζονται απλό εξοπλισμό. Κάποια μειονεκτήματα που παραμένουν, είναι η χαμηλή απορρόφηση των μακροσωματιδίων μέσω του δέρματος και η παγίδευση φυσαλίδων κατά τη διάρκεια της σύνθεσης. Η σταθερότητα του συστήματος μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες, όπως το pH, τη θερμοκρασία, τις συγκεντρώσεις/τροποποιήσεις των πολυμερών, προσθήκες/συνδυασμούς κατιόντων ή ανιόντων. [16], [41]–[43]

## **5.2. Νανο-κυστικές δομές (Nanovesicles)**

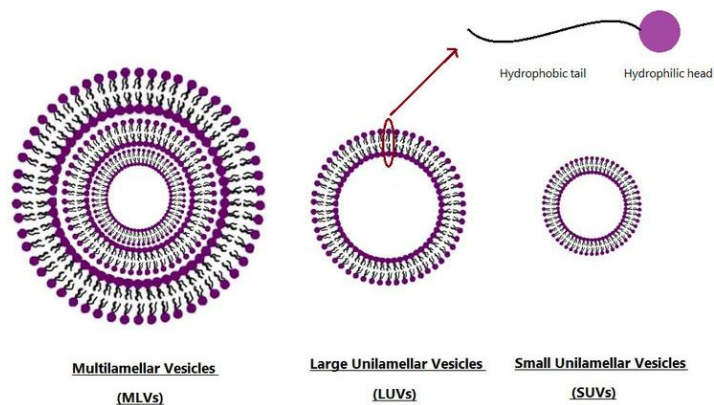
### **5.2.1. Λιποσώματα (Liposomes)**

Τα λιποσώματα είναι κολλοειδή συστήματα, σφαιρικού σχήματος, αποτελούμενα από διστρωματικά κυστίδια φωσφολιπιδίων. Μπορούν να περιέχουν μονοστρωματική ή ολιγοστρωματική ή πολυστρωματική ομόκεντρη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα. Η ταξινόμηση των λιποσωμάτων ανάλογα με το μέγεθος και τον αριθμό των στιβάδων τους, είναι η ακόλουθη:

- Πολυλιποσώματα (Multivesicular vesicles, MVVs)
- Πολυστιβαδικά (Multilamellar vesicles, MLVs): Τα MLVs είναι ο πιο απλός τύπος λιποσωμάτων, χαρακτηρίζονται από αρκετές ομόκεντρες διπλοστιβάδες, οι οποίες διαχωρίζονται μεταξύ τους από την υδατική φάση. Η διάμετρός τους κυμαίνεται από 500nm έως λίγα  $\mu\text{m}$ . (Εικόνα 24)
- Μονοστιβαδικά (Unilamellar vesicles, ULVs)
- Μεγάλα μονοστιβαδικά (Large unilamellar vesicles, LUVs): Τα LUVs αποτελούνται από μια διπλοστιβάδα και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 100 έως 1000 nm. Σε σύγκριση με τα με τα MLVs, τα LUVs έχουν μεγαλύτερο όγκο υδατικής φάσης και μπορούν να εγκλωβίσουν 30 L/mol λιπιδίου, ενώ τα MLVs μόλις 1-4 L/mol. (Εικόνα 24)

- ο Μικρά μονοστιβαδικά (Small unilamellar vesicles, SUVs): Τα SUVs αποτελούνται από μια διπλοστιβάδα και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 20 έως 75 nm. Έχουν ικανότητα να εγκλωβίσουν 0.2-1.5 L/mol και σχηματίζουν διαυγείς διασπορές σε αντίθεση με τις θολές διασπορές των MLVs και των LUVs. (Εικόνα 24)

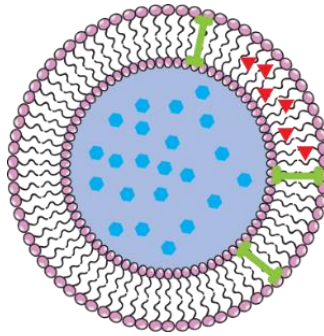
Οι διαστάσεις και ο αριθμός των στιβάδων του λιποσώματος εξαρτάται από τη μέθοδο παρασκευής καθώς και από την ένταση της μηχανικής ανάδευσης κατά τη διασπορά του λιπιδίου στην υδατική φάση. [36], [44]



Εικόνα 24. Διαφορετικοί τύποι λιποσωμάτων. Πολυστιβαδικά (MLVs), Μεγάλα μονοστιβαδικά (LUVs), Μικρά μονοστιβαδικά (SUVs)

Τα λιποσώματα έχουν υδρόφιλα και υδρόφοβα τμήματα, οπότε χαρακτηρίζονται ως αμφίφυλα μόρια. Λόγω της διαμερισματοποίησης που παρουσιάζουν και της ομοιότητάς τους με τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών, μπορούν να χρησιμεύσουν για την ενδοδερμική μεταφορά δραστικών ουσιών και την αργή απελευθέρωσή τους στο δέρμα. [44] Τα υδροφιλικά μόρια βρίσκονται συνήθως στο εσωτερικό, υδατικό, διαμέρισμα, ενώ τα λιποφιλικά ή αμφιφιλικά, και μερικές φορές φορτισμένα, μόρια, είναι συνήθως σχετιζόμενα με τη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα (Εικόνα 25). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως το μέγεθος, η θερμοδυναμική κατάσταση, το φορτίο, η στρωματικότητα και η ελαστικότητα, καθορίζονται από τη σύσταση των κυστιδίων και επηρεάζουν τη ενδο/διαδερμική μεταφορά των εγκλωβισμένων στο λιπόσωμα δραστικών ουσιών. Αυτές οι ιδιότητες έχουν μεγάλη επίδραση στην αποτελεσματικότητα των λιποσωμάτων ως μέσα χορήγησης ουσιών. Τα λιποσώματα δρουν ως ενισχυτές της διείσδυσης, λόγω των φωσφολιπιδίων που διαπερνούν την κερατίνη στιβάδα και αλλάζουν τις λιπιδικές διπλοστιβάδες του δέρματος. Άλλα πλεονεκτήματα τους είναι ότι μειώνουν την ερεθιστικότητα και αυξάνουν τη

σταθερότητα των ουσιών. Μόρια μεγαλύτερα των 10μm συνηθίζουν να παραμένουν στην επιφάνεια της κερατίνης στιβάδας, αυτά των 3-10μm εντοπίζονται στους τριχοσμηγματογόνους θύλακες, ενώ σωματίδια κάτω από 3μm μπορούν να διαπεράσουν την κερατίνη στιβάδα. [36], [44]



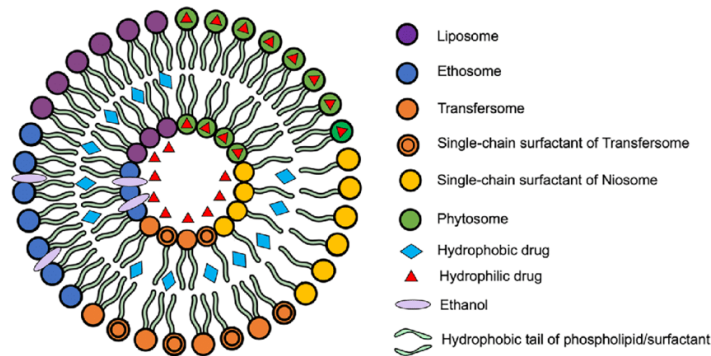
Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση ενθυλάκωσης δραστικών ουσιών σε Λιπόσωμα.

● : Υδροφιλική ουσία, ▼ : Υδροφοβική ουσία, Y : Φορτισμένη υδροφιλική ουσία, ρ : Λιπίδιο

5.2.1.1. *Νιωσώματα (Niosomes)*: Όταν οι διπλοστιβάδες των κυστιδίων αποτελούνται από μη-ιονικά επιφανειοδραστικά. Μπορεί να είναι μονοστιβαδικά ή πολυστιβαδικά και έχουν μεγαλύτερη χημική σταθερότητα και καθαρότητα από τα λιποσώματα των φωσφολιπιδίων. Μειώνουν τη διαδερμική απώλεια ύδατος και αφήνουν ένα αίσθημα απαλότητας κατά την εφαρμογή αναπληρώνοντας τα χαμένα λιπίδια του δέρματος. [36], [44]

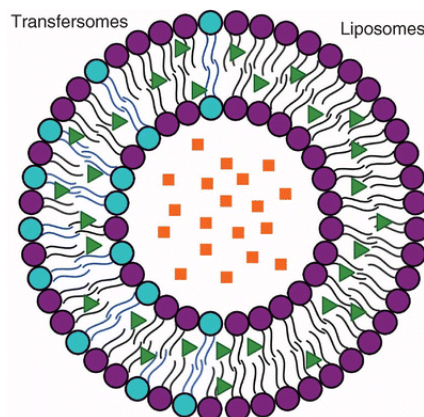
5.2.1.2. *Υπερσώματα (Ultrasomes)*: Περιέχουν κάποια ενδονουκλεάση, η οποία εκχυλίζεται από το *Micrococcus luteus*. Η συγκεκριμένη ενδονουκλεάση αναγνωρίζει τη βλάβη που προκαλεί ο ήλιος στο DNA του δέρματος και την απομακρύνει. [44]

5.2.1.3. *Φωτοσώματα (Photosomes)*: Περιέχουν ένα ένζυμο που εκχυλίζεται από το *Anacystis nidulans*. Ενεργοποιείται παρουσία φωτός και αναστέλλει την καταστροφή του DNA που προκαλείται από τον ήλιο. Ενσωματώνονται σε αντηλιακά καλλυντικά προϊόντα. [44]



Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση ενθυλάκωσης δραστικών ουσιών σε διαφορετικούς τύπους νανο-κυστικών δομών.  
 ●: Λιπόσωμα, ●: Αιθόσωμα, ●: Τρανσφερόσωμα, ●: Επιφανειοδραστικό Τρανσφεροσώματος (μονής αλυσίδας),  
 ●: Επιφανειοδραστικό Νιοσώματος (μονής αλυσίδας), ●: Φυτόσωμα, ◆: Υδρόφοβη δραστική ουσία,  
 ▲: Υδρόφιλη δραστική ουσία, ○: Αιθανόλη, ~: Υδρόφοβη ουρά φωσφολιπιδίου/επιφανειοδραστικού

5.2.1.4. *Τρανσφεροσώματα (Transfersomes)*: Μια άλλη τάξη εξαιρετικά παραμορφώσιμων ελαστικών ή υπερελαστικών λιποσωμάτων είναι τα τρανσφεροσώματα. Αυτά, όταν εφαρμόζονται σε μη-αποφρακτικές συνθήκες, μπορούν να διαπερνούν τις στιβάδες του δέρματος και να φτάνουν στη συστημακή κυκλοφορία. Αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια και έναν ενεργοποιητή άκρων (edge activator), και έχουν μέγεθος 3-6 φορές μεγαλύτερο από αυτό των πόρων του δέρματος. Ο edge activator αποσταθεροποιεί τις λιπιδικές διπλοστιβάδες του λιποσώματος, αυξάνοντας, έτσι, την ικανότητα παραμόρφωσής τους. Το τελικό μέγεθος αυτών των λιποσωμάτων είναι 100-150 nm, είναι μονοστιβαδικά και, παρά το μέγεθός τους, έχουν τη δυνατότητα να αλλάζουν σχήμα και να διέρχονται ανάμεσα στα κερατινοκύτταρα. [36], [44]



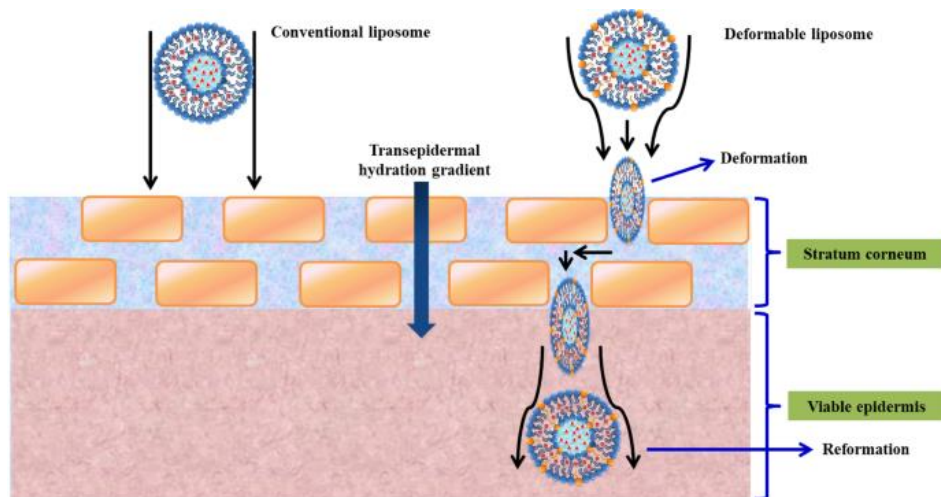
Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση ενθυλάκωσης δραστικών ουσιών σε Τρανσφερόσωμα (αριστερό μισό), Λιπόσωμα (δεξί μισό).  
 ■: Υδρόφιλη δραστική ουσία, ▲: Υδρόφοβη δραστική ουσία,  
 ●: Ενεργοποιητής άκρων (Edge activator), ●: Φωσφατιδυλοχολίνη και άλλα λιπίδια

5.2.1.5. *Αιθωσώματα (Ethosomes)*: Είναι λιπιδικά κυστίδια, αποτελούμενα από φωσφολιπίδια, αιθανόλη και νερό. Είναι γνωστά για την υψηλή περιεκτικότητά τους σε



αιθανόλη (20-45%) και εμφανίζουν εξαιρετικά αποτελέσματα στη δερματική χορήγηση. Διάφορες μελέτες δείχνουν την επιρροή της συγκέντρωσης της αιθανόλης πάνω στις φυσικοχημικές ιδιότητες των συστημάτων χορήγησης. Το μέγεθος των αιθοσωμάτων εντοπίζεται να μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης κατά 20-45%. Η συγκέντρωση των φωσφολιπιδίων επηρεάζει το μέγεθος των αιθοσωμάτων. Τέλος, τα αιθοσώματα παρουσιάζουν υψηλή αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης κυρίως λόγω της πολυστιβαδικότητας των κυστιδικών δομών. [36]

Γνωρίζουμε ότι η αιθανόλη διαταράσσει την οργάνωση της κερατίνης στιβάδας και αυξάνει τη ρευστότητα των λιπιδίων για να διευκολύνει τη διείσδυση των αιθοσωμάτων στις διαταραγμένες λιπιδικές διπλοστιβάδες της. Η απελευθέρωση ουσιών στα βαθύτερα στρώματα του δέρματος συμβαίνει μέσω της συσσωμάτωσης των αιθοσωμάτων με τα λιπίδιά του. Η υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης ρευστοποιεί τις μεμβράνες του αιθοσώματος και παράγει υψηλά παραμορφώσιμα κυστίδια που μπορούν να συμπτυχθούν ώστε να περάσουν ανάμεσα από τα κύτταρα της κερατίνης στιβάδας μεταφέροντας μεγάλες ποσότητες δραστικών ουσιών μέσα από άθικτο δέρμα. Αντίθετα με τα παραμορφώσιμα λιποσώματα, τα αιθοσώματα ενισχύουν τη δερματική χορήγηση ουσιών κάτω από αποφρακτικές αλλά και μη-αποφρακτικές συνθήκες. [36]



Εικόνα 28. Αναπαράσταση διείσδυσης λιποσωμάτων στο δέρμα ανάλογα με τη δομή τους.

### 5.3. Έλεγχος/Μελέτες σταθερότητας (Stability Studies)

Ο σκοπός των δοκιμών σταθερότητας είναι να παρέχουν στοιχεία σχετικά με την ποιότητα μιας φαρμακευτικής ουσίας ή φαρμακευτικό προϊόν, η οποία ποικίλλει με την πάροδο του χρόνου υπό την επίδραση ποικίλων περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και το φως, και να καθοριστεί μια περίοδος επανεξέτασης για

την ουσία ή διάρκεια ζωής για το φαρμακευτικό προϊόν και συνιστώμενες συνθήκες αποθήκευσης. [45]

Διεξάγονται μελέτες σταθερότητας σε διάφορες συνθήκες, όπως φυγοκέντρωση (centrifugation), κύκλος θερμοκρασιών (temperature cycle test), αποθήκευση (storage) για 1 χρόνο, κ.ά. Οι μελέτες σταθερότητας αφορούν αλλαγές στη χρώση, στην οσμή, στο μέγεθος των μορίων, στο pH, την υγροποίηση κατά τη φυγοκέντρωση, τον διαχωρισμό των φάσεων, μέσα σε ορισμένο χρονικό διάστημα (1 μήνα, 3 μήνες, 6 μήνες, 1 χρόνο, κ.ά.).

### **5.3.1. Δοκιμές Καταπόνησης/Ακραίων συνθηκών (Stress Testing)**

Η δοκιμή καταπόνησης της ουσίας μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό των πιθανών προϊόντων αποδόμησης, το οποίο θα βοηθήσει στον καθορισμό των οδών αποδόμησης και της ενδογενούς σταθερότητας του μορίου και στην επιβεβαίωση της ισχύος των αναλυτικών διαδικασιών που χρησιμοποιούνται. Ωστόσο, μπορεί να μην είναι απαραίτητο να εξεταστούν για ορισμένα προϊόντα αποδόμησης, εάν έχει φανεί ότι δεν σχηματίζονται υπό συνθήκες ταχείας/επιταχυνόμενης ή μακροχρόνιας αποθήκευσης. Η φύση της δοκιμής καθορίζεται από την ουσία και τον τύπο του προϊόντος που εξετάζονται. Η δοκιμή καταπόνησης είναι πιθανό να πραγματοποιηθεί σε μία μόνο παρτίδα της φαρμακευτικής ουσίας. Πρέπει να περιλαμβάνει την επίδραση των θερμοκρασιών [σε αυξήσεις 10°C (π.χ. 50°C, 60°C, κ.λπ.) πάνω από αυτήν για επιταχυνόμενη δοκιμή], επίδραση της υγρασίας (π.χ. 75% RH ή μεγαλύτερη) όπου χρειάζεται, οξείδωση και φωτόλυση της ουσίας. Η δοκιμή θα πρέπει επίσης να αξιολογήσει την ευαισθησία της ουσίας σε υδρόλυση, σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH όταν βρίσκεται σε διάλυμα ή εναιώρημα. Οι δοκιμές φωτοσταθερότητας πρέπει να αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της δοκιμής ακραίων καταστάσεων. Το πρότυπο για τις συνθήκες της δοκιμής φωτοσταθερότητας περιγράφονται στο ICH Q1B. Τα αποτελέσματα από αυτές τις μελέτες θα αποτελούν αναπόσπαστο μέρος των πληροφοριών που παρέχονται στις ρυθμιστικές αρχές. [45]

### **5.3.2. Επιλογή Παρτίδων (Selection of Batches)**

Θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα από επίσημες μελέτες σταθερότητας σε τουλάχιστον τρεις κύριες παρτίδες της ουσίας. Οι παρτίδες θα πρέπει να κατασκευάζονται σε ελάχιστη πιλοτική κλίμακα μέσω της ίδιας συνθετικής διαδρομής και χρησιμοποιώντας μια μέθοδο κατασκευής και μια διαδικασία που προσομοιώνει την τελική διαδικασία που θα χρησιμοποιηθεί για παρτίδες παραγωγής. Η συνολική

ποιότητα των παρτίδων που τοποθετούνται σε επίσημες μελέτες σταθερότητας, θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική της ποιότητας του υλικό που θα κατασκευαστεί σε κλίμακα παραγωγής. [45]

### **5.3.3. Συσκευασία (Container Closure System)**

Οι μελέτες σταθερότητας θα πρέπει να διεξάγονται με την ουσία συσκευασμένη σε δοχείο/σύστημα κλεισίματος το οποίο θα είναι ίδιο ή θα προσομοιώνει τη συσκευασία που προτείνεται για αποθήκευση και διανομή. [45]

### **5.3.4. Προδιαγραφές (Specifications)**

Οι μελέτες σταθερότητας θα πρέπει να περιλαμβάνουν δοκιμές των ιδιοτήτων της ουσίας που είναι ευαίσθητες σε αλλαγές κατά την αποθήκευση και είναι πιθανό να επηρεάσουν την ποιότητα, την ασφάλεια ή/και την αποτελεσματικότητα. Η δοκιμή θα πρέπει να καλύπτει, κατά περίπτωση, τις φυσικές, τις χημικές, τις βιολογικές και τις μικροβιολογικές ιδιότητες. Πρέπει να είναι εφαρμόζονται οι επικυρωμένες αναλυτικές διαδικασίες που δείχνουν τη σταθερότητα. Το αν και σε ποιο βαθμό θα πρέπει να πραγματοποιηθεί η αναπαραγωγή των δοκιμών, θα εξαρτηθεί από τα αποτελέσματα των μελετών επικύρωσης. [45]

### **5.3.5. Συχνότητα Δοκιμών (Testing Frequency)**

Για τις μελέτες μακράς διάρκειας αποθήκευσης, η συχνότητα των δοκιμών θα πρέπει να είναι αρκετή ώστε να εδραιωθεί το προφίλ σταθερότητας της ουσίας. Για ουσίες με προτεινόμενη περίοδο επανάληψης δοκιμών τουλάχιστον 12 μηνών, η συχνότητα στη μακράς διάρκειας αποθήκευση, θα πρέπει να είναι κάθε 3 μήνες για το πρώτο έτος, κάθε 6 μήνες για το δεύτερο και έπειτα κάθε χρόνο. [45]

Για τις επιταχυνόμενες μελέτες, προτείνεται ένα ελάχιστο τριών χρονικών σημείων συμπεριλαμβανομένων των αρχικών και τελικών (π.χ. 0, 3 και 6 μήνες), σε μια μελέτη 6 μηνών. Όπου, αναλόγως την εμπειρία, τα αποτελέσματα της επιταχυνόμενης μελέτης ενδέχεται να προσεγγίζουν σημαντικά κριτήρια αλλαγής, θα πρέπει να διεξαχθούν περισσότερες δοκιμές, είτε προσθέτοντας δείγματα στο τελικό χρονικό σημείο, είτε συμπεριλαμβάνοντας ένα τέταρτο χρονικό σημείο στο σχεδιασμό της μελέτης. [45]

Όταν απαιτούνται μελέτες ενδιάμεσης διάρκειας αποθήκευσης, ως αποτέλεσμα σημαντικής αλλαγής στην επιταχυνόμενη αποθήκευση, προτείνονται τουλάχιστον τέσσερα χρονικά σημεία, συμπεριλαμβανομένων των αρχικών και τελικών χρονικών σημείων (π.χ. 0, 6, 9, 12 μήνες), σε μια μελέτη 12 μηνών. [45]

### **5.3.6. Συνθήκες Αποθήκευσης (Storage Conditions)**

Γενικότερα, μια ουσία πρέπει να αξιολογηθεί υπό συνθήκες αποθήκευσης που δοκιμάζουν τη θερμική της σταθερότητα και, εάν αρμόζει, την ευαισθησία της στην υγρασία. Οι συνθήκες αποθήκευσης και οι μελέτες που επιλέγονται πρέπει να είναι αρκετές ώστε να καλύψουν την αποθήκευση, τη διακίνηση και την επακόλουθη χρήση. [45]

Στις μελέτες μακράς διάρκειας αποθήκευσης πρέπει να καλύπτεται διάρκεια τουλάχιστον 12 μηνών, σε τουλάχιστον 3 πρωτογενείς παρτίδες, κατά τη στιγμή της υποβολής και θα πρέπει να συνεχιστούν για κάποιο χρονικό διάστημα, επαρκές για την κάλυψη της προτεινόμενης περιόδου επανεξέτασης. Επιπλέον δεδομένα που συλλέγονται κατά την αξιολόγηση, πρέπει να υποβάλλονται στις αρχές εάν ζητηθούν. Δεδομένα από επιταχυνόμενη μελέτη και, εάν αρμόζει, από ενδιάμεσης διάρκειας αποθήκευσης μελέτη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αξιολογηθεί η επίδραση βραχυπρόθεσμων εκθέσεων εκτός των προκαθορισμένων συνθηκών αποθήκευσης, όπως μπορεί να προκύψουν κατά τη διακίνηση. [45]

### **5.3.7. Δέσμευση για σταθερότητα (Stability Commitment)**

Όταν τα διαθέσιμα δεδομένα μακράς διάρκειας σταθερότητας σε αρχικές παρτίδες δεν καλύπτουν την προκαθορισμένα διάρκεια επανεξέτασης, η οποία ορίστηκε τη στιγμή της έγκρισης, πρέπει να υπάρχει μια δέσμευση να συνεχιστούν οι μελέτες σταθερότητας, ακόμη και αργότερα από το προκαθορισμένο διάστημα ώστε να οριστεί ο χρόνος επανεξέτασης. [45]

Όταν έχουμε δεδομένα μακράς διάρκειας σταθερότητας από τρεις παρτίδες παραγωγής, τα οποία καλύπτουν το προτεινόμενο διάστημα επανεξέτασης, δεν κρίνεται απαραίτητη η δέσμευση μετά την έγκριση. [45]

Σε άλλη περίπτωση, θα πρέπει να γίνει μια από τις παρακάτω δεσμεύσεις:

- Εάν εμπεριέχονται δεδομένα σταθερότητας από τουλάχιστον τρεις παρτίδες παραγωγής, πρέπει να γίνει δέσμευση να συνεχιστούν οι μελέτες για το προτεινόμενο διάστημα επανεξέτασης.
- Εάν εμπεριέχονται δεδομένα σταθερότητας από λιγότερες από τρεις παρτίδες παραγωγής, πρέπει να γίνει δέσμευση να συνεχιστούν οι μελέτες για το προτεινόμενο διάστημα επανεξέτασης και να τοποθετηθούν πρόσθετες παρτίδες

παραγωγής (με μέγιστο τις τρεις επιπλέον) σε μακράς διάρκειας σταθερότητας για το προτεινόμενο διάστημα επανεξέτασης.

- Εάν δεν εμπεριέχονται δεδομένα σταθερότητας για παρτίδες παραγωγής, πρέπει να γίνει δέσμευση να τοποθετηθούν οι πρώτες τρεις παρτίδες παραγωγής σε δοκιμές μακράς διάρκειας σταθερότητας για το προτεινόμενο διάστημα επανεξέτασης. [45]

Το πρωτόκολλο σταθερότητας που θα χρησιμοποιηθεί στις μακράς διάρκειας δοκιμές για τη δέσμευση σταθερότητας, θα πρέπει να είναι ίδιο με των πρωταρχικών παρτίδων, εκτός αν αποδειχθεί διαφορετικά επιστημονικώς. [45]

**5.3.8. Ρεολογικές Ιδιότητες (Rheological Properties):** χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο περιστροφικού ροόμετρου, υπολογίζονται οι ρεολογικές ιδιότητες και η συνοχή των δειγμάτων χρησιμοποιώντας το νόμο Ostwald-de Waele.

$$\tau = K\gamma^n$$

Όπου K είναι ο δείκτης συνοχής (consistency index),  $\gamma$  είναι ο ρυθμός διάτμησης (shear rate),  $\tau$  είναι η διατμητική τάση (shear stress) και n είναι ο δείκτης ροής (flow index). [2]

**5.3.9. Αποτελεσματικότητα παγίδευσης (Entrapment Efficiency):** Μια από τις καλύτερες μεθόδους για να υπολογισθεί η ποσότητα της δραστικής ουσίας που παγιδεύτηκε στο σύστημα γαλακτώματος. Ελέγχεται με τη μέθοδο έμμεσης υπερφυγοκέντρωσης. Το δείγμα φυγοκεντρίζεται στις 12000rpm, για 45 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο διαχωρίζεται από το ίζημα, αναλύονται τα δεδομένα χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο. Η ελεύθερη δραστική ουσία υπολογίζεται από την ακόλουθη φόρμουλα:

$$EE\% = \frac{\text{Συνολική δραστ. ουσ.} - \text{Ελεύθερη δραστ. ουσ.}}{\text{Συνολική δραστ. ουσ.}} \times 100$$

Τα γαλακτώματα πολλαπλών φάσεων που συντίθενται με διπλή γαλακτωματοποίηση έχουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα παγίδευσης και αργή απελευθέρωση, κάνοντάς τα ελεγχόμενης απελευθέρωσης. Αυτό το σχήμα απελευθέρωσης ίσως οφείλεται στο ομογενές μέγεθος σωματιδίων, κάτι που το καθιστά και πιο σταθερά. [2]

**5.3.3. Δυναμικό Ζήτα (Zeta Potential), Μέγεθος Ζήτα (Zeta Size), Παράγοντας Πολυδιασποράς (Polydispersity Index, PDI):** Το δυναμικό Zeta είναι η έκφραση του

φορτίου στην επιφάνεια των σωματιδίων και αποτελεί σημαντική παράμετρο ενδεικτική της σταθερότητας. Όσο υψηλότερο είναι το δυναμικό Ζήτα, τόσο μεγαλύτερη σταθερότητα έχει το διάλυμα και αντίστροφα. Επιπλέον, η αρνητική του τιμή δείχνει ότι η ηλεκτροστατική απόθεση μεταξύ των σωματιδίων θα εμποδίσει τη συσσωμάτωσή τους και κατά συνέπεια, θα σταθεροποιήσει τη σύνθεση. Το δυναμικό Ζήτα είναι ένας επιστημονικός όρος για το ηλεκτροκινητικό δυναμικό σε κolloειδείς διασπορές. Υπολογίζεται με τη χρήση μιας ηλεκτροφορητικής τεχνικής μέτρησης της κινητικότητας, το Laser Doppler. Τόσο το δυναμικό όσο και το μέγεθος Ζήτα μετρούνται στους 25°C. [2]

Δοκιμάζονται διαφορετικές αναλογίες του επιφανειοδραστικού για να εντοπιστεί ο πιο σταθερός συνδυασμός από το τεστ φυγοκέντρωσης, όπου ποσότητα του γαλακτώματος φυγοκεντρίζεται σε  $\chi$  rpm/ $\chi$  min)

Εξετάσθηκε η σταθερότητα του φερουλικού οξέος όταν εκτέθηκε σε θερμοκρασία 45°C και φως. Μετά από 1 μήνα το ενθυλακωμένο φερουλικό οξύ σε κρέμα ήταν σε καλύτερη φυσικοχημική κατάσταση σε σχέση με το φερουλικό οξύ που βρισκόταν απλώς ενσωματωμένο σε κρέμα. Για να κριθεί αυτό εξετάστηκαν οι παράγοντες SELS. [18]

**5.3.10. Κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης:** όπου κρίθηκε η εμφάνιση, ο διαχωρισμός φάσης, το μέγεθος των σταγονιδίων και ο δείκτης αστάθειας. Οι κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης βοηθούν να εξετασθεί η προκαταρκτική φυσικοχημική σταθερότητα των συστημάτων με τα κατάλληλα χαρακτηριστικά, όπως η απουσία διαχωρισμού ελαιώδους φάσης μετά από την υποβολή τους σε θερμική καταπόνηση. Οι προκαταρκτικές μελέτες σταθερότητας, επιταχυνόμενης ή βραχυπρόθεσμης, στοχεύουν στο να βοηθήσουν και να οδηγήσουν τις αποφάσεις που πρέπει να παρθούν για τον προγραμματισμό των συνθέσεων (formulations). Οι ακραίες αλλαγές θερμοκρασίας επιτρέπουν την επιτάχυνση πιθανών χημικών αντιδράσεων μεταξύ των ενώσεων και την εμφάνιση βλάβης, όπως διαχωρισμό φάσεων, τα οποία αναλύονται βάσει των χαρακτηριστικών κάθε συστήματος χορήγησης. [46]

Ο διαχωρισμός των φάσεων αξιολογείται βάσει θερμικής καταπόνησης και φυγοκέντρωσης.

Οι προκαταρκτικές (φυσικοχημικές) μελέτες σταθερότητας των emulgel συστημάτων επιτυγχάνονται με ψύξη στους  $-5\pm 2^\circ\text{C}$  και απόψυξη στους  $40\pm 2^\circ\text{C}$ , για διάρκεια 24

ωρών, επί 12 ημέρες, καλύπτοντας 6 κύκλους, όπως ορίζεται από τον οδηγό σταθερότητας κοσμητικών προϊόντων της ANVISA (Cosmetics Stability Guide from ANVISA, Brasilia, DF, Brazil). Οι συνθέσεις αξιολογούνται οργανοληπτικά (χρώμα και όψη), μορφολογικά, κοκκομετρικά (μέση διάμετρο και δείκτη πολυδιασποράς ελαιωδών σταγονιδίων) και με ανάλυση της καθίζησης μέσω φυγοκέντρωσης, στην έναρξη και στη λήξη κάθε μελέτης. Επιπρόσθετα, οι οργανοληπτικές ιδιότητες των συστημάτων αξιολογούνται έπειτα από κάθε κύκλο. [46]

Φυσική σταθερότητα μέσω αναλυτή διασποράς (dispersion analyzer): Ο διαχωρισμός φάσης των συστημάτων emulgel στην έναρξη και στη λήξη κάθε μελέτης αξιολογείται με αναλυτική φυγόκεντρο. Τα δείγματα τοποθετούνται στην υποδοχή μιας κυψελίδας 2mm-οπτικής δέσμης και φυγοκεντρώνται στις 4000rpm για 60 λεπτά. Καθώς τα δείγματα εκτίθενται στη φυγόκεντρο δύναμη, μια λυχνία φωτός που εκπέμπει στο σχεδόν-υπέρυθρο φωτίζει την κυψελίδα, επιτρέποντας τη μέτρηση της έντασης του μεταδιδόμενου φωτός. Αυτή η μέτρηση είναι συνάρτηση του χρόνου και της θέσης του δείγματος προς όλο το μήκος της κυψελίδας, το οποίο παρέχει το προφίλ διαπερατότητας. Ο δείκτης αστάθειας προσδιορίζεται από τα προφίλ μετάδοσης. [46]

**5.3.11. Μορφολογική ανάλυση:** Η μορφολογία των emulgels στην έναρξη και στη λήξη κάθε μελέτης αξιολογείται με οπτικά μικρογραφήματα, τα οποία παίρνουμε μέσω μικροσκοπίου. Το μέγεθος των σταγονιδίων που αποτελούν την καθοριστική απόσταση μεταξύ των 2 εφαπτομένων σε αντίθετες πλευρές, αξιολογείται επίσης μέσω λογισμικού Image Pro-Plus 4.5.0.29 (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA). Προσμετρούνται περισσότερα από 800 σταγονίδια ελαιώδους φάσης και ο δείκτης πολυδιασποράς υπολογίζεται μέσω της συνάρτησης:

$$PI = \frac{(D90\% - D10\%)}{D50\%}$$

Όπου  $D_{90\%}$ ,  $D_{50\%}$ , και  $D_{10\%}$  αντιστοιχούν στη συνολική μέση διάμετρο των σταγονιδίων, αντίστοιχα. [46]

Η μικροσκοπική αξιολόγηση είναι ένα χρήσιμο εργαλείο έρευνας των χαρακτηριστικών των γαλακτωμάτων πολλαπλών φάσεων, το οποίο δίνει εικόνα και για την σταθερότητά τους. Έτσι όσο πιο επιβραδυσμένη η αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων, τόσο μεγαλύτερη η σταθερότητα των γαλακτωμάτων, και αντίστροφα.

Στα γαλακτώματα πολλαπλών φάσεων, η αύξηση στο μέγεθος των σωματιδίων υποδεικνύει αστάθεια, αυτό μπορεί να οφείλεται σε λόγους όπως τη συνένωση σταγονιδίων, τη διάσπαση των ελαιωδών στιβάδων, συρρίκνωση και διόγκωση των εσωτερικών σταγονιδίων. [2]

Προσδιορισμός θερμοκρασίας μετάβασης sol-gel (sol: ανόργανο κολλοειδές εναιώρημα, inorganic colloidal suspension-ζελατινοποίηση του κολλοειδούς): η ανάλυση της θερμοκρασίας ζελατινοποίησης (Tsol/gel) εκτελείται με τη χρήση ροόμετρου ελεγχόμενης κλίσης και τάσης MARS II. Χρησιμοποιούμε γεωμετρία κώνου-πλάκας (με σταθερή ενδιάμεση απόσταση 0.052mm) παράλληλου χαλύβδου, διαμέτρου 35mm. χρησιμοποιήθηκε η ρύθμιση ταλάντωσης στη ράμπα θερμοκρασίας, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν και τους επιτράπηκε να σταθεροποιηθούν (για 1 λεπτό) πριν από κάθε ανάλυση για την πιστοποίηση της ελάχιστης διάτμησης. Έπειτα, προσδιορίστηκε η γραμμική ιξωδοελαστική περιοχή για κάθε σύστημα γαλακτώματος-πηκτώματος, στους 5°C και στους 60°C. Η ανάλυση σάρωσης θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκε στην περιοχή από τους 5°C έως τους 60°C. Η συχνότητα ταλάντωσης ρυθμίστηκε στα 1,0Hz και ο ρυθμός θέρμανσης ήταν 10°C/min, με ελεγχόμενη τάση. Υπολογίστηκαν ο συντελεστής αποθήκευσης ( $G'$ ), ο συντελεστής απώλειας ( $G''$ ), το δυναμικό ιξώδους ( $\eta'$ ) και η εφαπτομένη απώλεια (loss tangent,  $\tan \delta$ ). Tsol/gel θεωρήθηκε η θερμοκρασία στην οποία το  $G'$  βρισκόταν στα μισά του δρόμου μεταξύ του διαλύματος και του πηκτώματος, και υπολογίστηκε για κάθε περίπτωση όπου το  $\eta'$  αυξήθηκε σημαντικά ( $p < 0,05$ ) εξ' αιτίας αύξησης της θερμοκρασίας. [46]

Τα εξεταζόμενα δείγματα διατηρούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες, 8°C, 25°C, 40°C, για διάστημα 3 μηνών κι έπειτα αξιολογούνται για τις διαφορετικές παραμέτρους (αλλαγές στη χρώση, στην οσμή, στο μέγεθος των μορίων, στο pH, υγροποίηση κατά τη φυγοκέντριση). [2]

## **5.4. Βασικός Σχεδιασμός Ανάπτυξης Νέας Σύνθεσης (Formulation)**

### **5.4.1. Διερεύνηση Παραγόντων Σταθερότητας Καλλυντικού:**

- Σταθερότητα και φυσικοχημική κατάσταση καλλυντικών προϊόντων κάτω από κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης, μεταφοράς και χρήσης
- Χημική Σταθερότητα
- Μικροβιολογική Σταθερότητα



- Φυσική Σταθερότητα
- Συμβατότητα περιεχομένου και περιέκτη συσκευασίας (Compatibility) [47]

#### **5.4.2. Βασικοί Παράμετροι Μελέτης κατά το σχεδιασμό των *stability tests* και της πρόβλεψης ζωής του προϊόντος**

- Εμφάνιση, Χρώμα, Οσμή
- pH
- Αλλαγές στον περιέκτη συσκευασία
- Ιξώδες
- Μεταβολές βάρους
- Ικανότητα του προϊόντος για αποφυγή μόλυνσης, στο χρόνο ζωής [47]

#### **5.4.3. Χρονοδιάγραμμα δοκιμών σύνθεσης (*Formulation*)**

##### *5.4.3.1. Χρονοδιάγραμμα 1<sup>ου</sup> σταδίου δοκιμών σύνθεσης:*

- Μικρό σύνολο παραγωγής/παρτίδα στο εργαστήριο (Small Lab Batch)
- Προκαταρκτικές δοκιμές (Preliminary Tests)
- Χρονική Διάρκεια: 1 Μήνας [45], [47]

##### *5.4.3.2. Χρονοδιάγραμμα 2<sup>ου</sup> σταδίου δοκιμών σύνθεσης:*

- Μεγάλο σύνολο παραγωγής/παρτίδα στο εργαστήριο (Large Lab Batch)
- Συνέχεια Προκαταρκτικών δοκιμών (Preliminary Tests)
- Επιταχυνόμενες δοκιμές (Accelerated tests) και δοκιμές πραγματικού χρόνου (Real Time tests)
- Χρονική Διάρκεια: Τουλάχιστον 3 μήνες πριν το πρώτο πιλοτικό σύνολο παραγωγής/παρτίδα (Pilot batch) [47]

##### *5.4.3.3. Χρονοδιάγραμμα 3<sup>ου</sup> σταδίου δοκιμών σύνθεσης:*

- Πιλοτικό σύνολο παραγωγής/παρτίδα (Pilot batch) στην παραγωγή, πριν το τελικό
- Επιταχυνόμενες δοκιμές (Accelerated tests) και δοκιμές πραγματικού χρόνου (Real Time tests)
- Χρονική Διάρκεια: 3 μήνες πριν το πρώτο σύνολο παραγωγής/παρτίδα πλήρους κλίμακας (Full Scale batch)
- Συνολική Χρονική Διάρκεια Μεγάλου συνόλου παραγωγής/παρτίδα: 6 μήνες πριν το πρώτο σύνολο παραγωγής/παρτίδα πλήρους κλίμακας (Full Scale batch) [47]

**5.4.3.4. Χρονοδιάγραμμα 4<sup>ο</sup> σταδίου δοκιμών σύνθεσης:**

- Πρώτο σύνολο παραγωγής/παρτίδα πλήρους κλίμακας (Full Scale batch)
- Επιταχυνόμενες δοκιμές (Accelerated tests) και δοκιμές πραγματικού χρόνου (Real Time tests)
- Χρονική Διάρκεια: 6 μήνες (Accelerated tests)
- Συνολική Διάρκεια: 3 χρόνια (Real Time tests) [47]

**5.4.4. Χρονοδιάγραμμα Ειδών Μελετών Σταθερότητας (Stability Tests):**

**5.4.4.1. Μακράς διάρκειας (Long term) αποθήκευση, γενικής χρήσης:**

Στους  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  και σε  $60\% \pm 5\%$  σχετική υγρασία (relative humidity, RH) για 12 μήνες  
ή στους  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  και σε  $65\% \pm 5\%$  RH για 12 μήνες. [47]

**5.4.4.2. Ενδιάμεσης διάρκειας (Intermediate) αποθήκευση, γενικής χρήσης:**

Στους  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  και σε  $65\% \pm 5\%$  RH για 6 μήνες. [47]

**5.4.4.3. Επιταχυνόμενης διάρκειας (Accelerated) αποθήκευση, γενικής χρήσης:**

Στους  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  και σε  $75\% \pm 5\%$  RH για 3-6 μήνες. [47]

**5.4.4.4. Μακράς διάρκειας δοκιμές αποθήκευσης σε Ψυγείο:**

Στους  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  για 12 μήνες. [47]

**5.4.4.5. Επιταχυνόμενης διάρκειας (Accelerated) δοκιμές αποθήκευσης σε Ψυγείο:**

Στους  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  και σε  $60\% \pm 5\%$  RH για 6 μήνες. [47]

**5.4.4.6. Μακράς διάρκειας δοκιμές αποθήκευσης σε Καταψύκτη:**

Στους  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  για 12 μήνες. [45]

**5.4.5. Δοκιμές Ψύξης-Απόψυξης (Freeze / Thaw Cycles Tests): 4-6 κύκλους**

- Στους  $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  για 24h,
- Στους  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  για 8h,
- Στους  $42^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  για 24h. [46], [47]

#### **5.4.6. Μελέτες Φωτοσταθερότητας (Light Stability):**

Σε UV λαμπτήρα, στα 254nm: 1-8 ώρες

Σε περιβάλλον ηλιοφάνειας: 24 -48 ώρες. [46]

#### **5.4.7. Μηχανικά τεστ (Shock tests):**

##### **5.4.7.1. Δοκιμές Δονήσεων (Vibrations):**

Για αποφυγή διαχωρισμού γαλακτωμάτων, κόννων ή κόκκων σε προϊόντα. [46]

#### **5.4.8. Πρακτικός Οδηγός Σχεδιασμού Μελέτης Σταθερότητας:**

- Προσδιορισμός παραμέτρων που θα ερευνηθούν στη μελέτη: το είδος του προϊόντος, την ειδική σύνθεση, τη συσκευασία και τη νομοθεσία (Ευρώπη, Αμερική, Κίνα, Ασία κ.ά.).
- Προσδιορισμός σχετικών συνθηκών αποθήκευσης: αναπαριστούν την αναμενόμενη έκθεση του προϊόντος σε θερμοκρασία, φως, υγρασία, φυσικά συμβάντα, κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του.
- Προσδιορισμός της συσκευασίας, όπου το προϊόν πρέπει να αποθηκευτεί και ακριβής εκτίμηση του τρόπου διατήρησης του κλειστού προϊόντος στην αγορά.
- Προσδιορισμός χαρακτηριστικών περιέκτη και πιθανών αλληλεπιδράσεων αυτού και του προϊόντος, πρέπει να αναγνωριστούν και να δοκιμαστούν: σύνθεση, είδος συσκευασίας, μέγεθος, υλικό.
- Προσδιορισμός του συνόλου παραγωγής του προϊόντος που πρέπει να ελεγχθεί, ώστε το προϊόν να είναι αντιπροσωπευτικό της εμπορικής παραγωγής.
- Προσδιορισμός της τάξης των αποχρώσεων του προϊόντος ή των αρωμάτων, που πρέπει να περιληφθούν στη μελέτη. Όπου υπάρχει μεγάλος αριθμός αποχρώσεων ή αποκλίσεων του αρώματος, πρέπει να πραγματοποιηθούν stability tests σε όλα τα είδη.
- Προσδιορισμός της συχνότητας στην οποία πρέπει να ελέγχεται το προϊόν. Γίνεται πρόβλεψη για την επαρκή ποσότητα που απαιτείται να ελεγχθεί (δειγματοληψία, αναλύσεις, επανέλεγχοι).
- Προσδιορισμός της φύσης των ελέγχων που θα πρέπει περιλαμβάνονται, ώστε να εξασφαλισθεί η διερεύνηση όλων των ειδικών παραμέτρων.
- Επιβεβαίωση ότι το σχέδιο μελέτης σταθερότητας ακολουθείται και όλες οι πληροφορίες των δοκιμασιών σταθερότητας έχουν αποθηκευτεί, μπορούν να αντιπαραβληθούν και η διαδικασία ελέγχων σταθερότητας να συνεχιστεί. [46]

## 5.5. Πραγματικές Μελέτες Σταθερότητας

### 5.5.1. Ασταξανθίνη (*Astaxanthin*)

Η ασταξανθίνη είναι ένα βιομόριο, το οποίο ανήκει στις ξανθοφύλλες των καροτενοειδών, γνωστό για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές του ικανότητες. Παρέχει μεγάλες δυνατότητες με την ενσωμάτωσή της σε καλλυντικά προϊόντα, αλλά έχει κάποια μειονεκτήματα. Έχει κακή διαλυτότητα σε νερό, εμφανίζει χημική αστάθεια, χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα, κ.ά. χαρακτηριστικά που το καθιστούν δύσκολο στη χρήση. Έτσι, εξετάζεται η χρήση συστημάτων χορήγησης για τη διευκόλυνση της τοπικής εφαρμογής της, την ενίσχυση της δράσης και της σταθερότητάς της. Η σταθερότητα της ασταξανθίνης αξιολογήθηκε σε διάφορους φορείς και συνθήκες αποθήκευσης. Δοκιμάστηκαν κυστικές δομές (λιποσώματα), γαλακτώματα (μικρογαλακτώματα, νανογαλακτώματα), συστήματα σωματιδίων (μικροσωματίδια, νανοσωματίδια), ενώσεις εγκλεισμού (κυκλοδεξτρίνη) και συστήματα σχηματισμού μεμβρανών (films). [48], [49]

Σε μία μελέτη προσδιορίστηκε η ασταξανθίνη που προέρχεται από τον *Haematococcus* και η σταθερότητά της σε διάφορα βρώσιμα έλαια. Βρέθηκε σταθερή στους 70–90°C σε έλαια ρυζεμπράνου και φοινικέλαιου, με 84%–90% διατήρηση της περιεκτικότητάς της, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε τρόφιμα, φαρμακευτικές και διατροφικές εφαρμογές, ενώ η περιεκτικότητά της μειώθηκε στους 120 και 150°C. Η σταθερότητα των νανοδιασπορών ασταξανθίνης αξιολογήθηκε στο αποβουτυρωμένο γάλα, όπου χρησιμοποιήθηκε ο χυμός πορτοκαλιού και το απιονισμένο νερό ως δείγμα ελέγχου. Διαπιστώθηκε ότι η αποικοδόμηση της ασταξανθίνης ήταν σημαντικά υψηλότερη στο αποβουτυρωμένο γάλα σε σύγκριση με το χυμό πορτοκαλιού. Σε μια άλλη μελέτη, η σταθερότητα της βιομάζας ασταξανθίνης εξετάστηκε μετά από ξήρανση και αποθήκευση σε διάφορες συνθήκες για 9 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αποικοδόμηση της ασταξανθίνης, μετά από εννέα εβδομάδες αποθήκευσης, ήταν πολύ χαμηλή (10%), σε βιομάζα που ξηράνθηκε στους 180/110°C και αποθηκεύτηκε στους -21°C υπό άζωτο. Μελετήθηκε η σταθερότητα της ασταξανθίνης από το *Phaffia rhodozyma* και βρέθηκε ότι ήταν υψηλή σε pH 4,0 και χαμηλότερη θερμοκρασία. Η σταθερότητα αποθήκευσης της ασταξανθίνης ενισχύθηκε στους 4°C και στους 25°C, σε ένα σύνθετο μείγμα υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνης και νερού. Η σταθερότητα της ασταξανθίνης διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας μικροενθυλάκωση με χιτοζάνη, πολυμερικές νανοσφαίρες, γαλακτώματα και β-κυκλοδεξτρίνη. [49]

*Αναλυτικότερα άλλες μελέτες σταθερότητας της ασταξανθίνης σε διάφορα συστήματα χορήγησης ουσιών:*

#### *5.5.1.1. Σε Κυστικές δομές:*

Σε Λιποσώματα: Η χρήση λιποσωμάτων βοηθάει να μειωθεί το πρόβλημα της υδατοδιαλυτότητας, της χαμηλής σταθερότητας και της βιοδιαθεσιμότητας της ασταξανθίνης, αλλά σε υδατικά διαλύματα μειώνει την ελαστικότητα των κυστιδίων, το οποίο δημιουργεί προβλήματα στη σύνθεση αποτελεσματικών λιποσωμικών συστημάτων. Το πρόβλημα φαίνεται να διορθώνεται με χρήση νανολιποσωμάτων, τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης, και πυριτωμένων λιποσωμάτων (Silicified liposomes), τα οποία αποτελούν μια οικονομική και απλή μέθοδο για την ενσωμάτωση ασταξανθίνης σε καλλυντικά προϊόντα. [48]

#### *5.5.1.2. Σε Γαλακτώματα:*

Σε Μικρογαλακτώματα: Συντίθεται ο/w μικρογαλάκτωμα με ασταξανθίνη και εξετάζεται η επίδραση διαφόρων αντιοξειδωτικών είτε μεμονωμένων, είτε με πρόσθετα που βοηθούν στη σταθερότητά τους. Στο διάλυμα που εμπεριέχει μόνη την ασταξανθίνη, προστίθεται Tween 80 ως γαλακτωματοποιητής και ρυθμιστικό διάλυμα αιθανόλης, παρουσιάζει καθυστερημένη αποσύνθεση της ασταξανθίνης, αποδεικνύοντας ότι είναι εξαιρετικό εναλλακτικό σύστημα χορήγησης της. [48]

Σε Νανογαλακτώματα: Αντίστοιχα στα νανογαλακτώματα, το μικρό μέγεθος των σταγονιδίων, η χαμηλή πιθανότητα συνένωσης και κροκίδωσης, η αποτελεσματική χορήγηση ενεργών συστατικών, η ταχεία διείσδυσή τους, οι μακράς διάρκειας επιδράσεις και η ομοιόμορφη εναπόθεσή τους στο δέρμα, τα καθιστούν πλέον κατάλληλα για χρήση σε καλλυντικά. Συντίθεται ο/w νανογαλάκτωμα με ασταξανθίνη, χρησιμοποιώντας εστέρες γλυκερόλης ως γαλακτωματοποιητές, εναλλακτικά από την υδρογονωμένη λεκιθίνη. Τα νανογαλακτώματα εξετάστηκαν για τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και χαρακτηρίστηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης κατάψυξης (freeze-fracture scanning electron microscopy, FF-SEM), με TEM (transmission electron microscopy) και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Όσα παρουσίασαν δυναμικό Zeta σε εύρος -10 έως -57mV και μέγεθος σωματιδίων κατά μέσο όρο 170nm, εμφανίστηκαν σταδιακά πιο ασταθή με την αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων όταν χρησιμοποιήθηκε υδρογονωμένη λεκιθίνη. Σε μια δεύτερη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε νανογαλάκτωμα ασταξανθίνης με carboxymethyl chitosan, για τη

διερεύνηση της επίδρασής της στο μέγεθος των σταγονιδίων, τη σταθερότητα, τη δερματική διείσδυση και την κυτταροτοξικότητα της σύνθεσης. Για αυτό το σκοπό, χρησιμοποιήθηκε μέθοδος αναστροφής φάσης γαλακτώματος χαμηλής ενέργειας, η οποία εμπόδισε την αποδόμηση της ασταξανθίνης κατά την παραγωγή, ενώ επιπλέον δίνει τα πλεονεκτήματα χαμηλού κόστους, υψηλής ενεργειακής απόδοσης, απλότητα παραγωγής και εύκολη κλιμάκωση. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν βελτίωση της χημικής σταθερότητας και της δερματικής διείσδυσης, ενώ το μικρό μέγεθος σταγονιδίων, η ικανοποιητική φυσική σταθερότητα και η χαμηλή κυτταροτοξικότητα, δεν επηρεάστηκαν από το λειτουργικό ναυογαλάκτωμα. [48]

5.5.1.3. Σε Συστήματα Σωματιδίων (*Particulate Systems*): Αυτές οι συνθέσεις δημιουργούν κατάλληλο περιβάλλον για ευάλωτα μόρια και τα προστατεύουν από το φως, το οξυγόνο, το pH, τη ζέστη, την ενζυμική αποσύνθεση και άλλους εξωτερικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα. [48]

#### Σε Μικροσωματίδια:

Σε Μικροκάψουλες: Συντέθηκαν ανομογενούς μεγέθους μικροκάψουλες ασταξανθίνης, διαμέτρου 5-50μm, σε μήτρα χιτοζάνης (chitosan) διασταυρωμένης με γλουταραλδεϋδη με μέθοδο πολλαπλού γαλακτώματος/εξάτμισης διαλύτη. Η σταθερότητα του συστήματος αξιολογήθηκε βάσει της ποσότητας της χρωστικής που συγκρατείται κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των μικροκαψουλών στους 25°C, 35°C και 45°C, η οποία ποσοτικοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης (HPLC) με εβδομαδιαία λήψη. Σε όλες τις λήψεις δεν εμφανίστηκε αξιοσημείωτη μείωση στη συγκέντρωση της ασταξανθίνης στις μικροκάψουλες και διατηρήθηκε σε σταθερές συνθήκες. [48]

Σε Ελαιωσώματα (*Oil Bodies*): Είναι μικρά φυτικά οργανίδια παρόμοια με τα λιποσώματα, με διάμετρο 0,5–2,0μm, αποτελούνται από έναν πυρήνα ελαίου ο οποίος περιβάλλεται από μια μονοστιβάδα φωσφολιπιδίων με μια πρωτεϊνική μεμβράνη και χρησιμοποιούνται για την παροχή φυτοορμονών και άλλων υδρόφοβων ενώσεων στα φυτά. Αυτές οι δομές, οι οποίες έχουν απομονωθεί από κραμβόσπορους, έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν έναν νέο τύπο μικροκάψουλας που είναι κατάλληλος για την εξαγωγή υδρόφοβων οργανικών ενώσεων από υδατικά περιβάλλοντα. Υδρόφοβες ενώσεις, όπως η ασταξανθίνη, που χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά έχουν ενθυλακωθεί σε αυτά τα συστήματα, για να τα προστατευτούν από την οξείδωση. Αναπτύχθηκαν μικροκάψουλες ασταξανθίνης με ελαιωσώματα, τα οποία εξάχθηκαν από σπόρους

*Brassica napus*, με υψηλή απόδοση μικροενθυλάκωσης (>99%) και χρησιμοποίησε μια μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών. Τα δείγματα εξετάστηκαν με οπτικό μικροσκόπιο, το οποίο απέδειξε μορφολογική σταθερότητα, αυτοφθορισμό, σφαιρικές δομές και παρουσία ασταξανθίνης στον πυρήνα. Οι μελέτες έδειξαν υψηλή σταθερότητα των μικροκαψουλών όσον αφορά τη συσσώρευση και τη συνένωση, καθώς και διπλάσιο χρόνο ζωής σε έκθεση σε αέρα και φως, συγκριτικά με την ελεύθερη ασταξανθίνη, αποδεικνύοντας έτσι τον προστατευτικό ρόλο των ελαιοσωμάτων. Οι ερευνητές πρότειναν τη χρήση ελαιοσωμάτων ως νέο σύστημα χορήγησης, πολλά υποσχόμενο για τον καλλυντικό τομέα, επειδή ενσωματώνεται εύκολα σε επαφή με το δέρμα, απελευθερώνοντας το αντιοξειδωτικό με ασφάλεια και προσφέρει έναν νέο και φυσικό φορέα για την παροχή σταθερής ασταξανθίνης. [48]

Σε Μικροσφαίρες: Αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας τη διεργασία υπερκρίσιμου αντιδιαλύτη (supercritical anti-solvent, SAS) και το πολυ L-γαλακτικό οξύ (poly L-lactic acid), ως πολυμερικό φορέα. Οι βέλτιστες συνθήκες εξασφάλισαν απόδοση ενθυλάκωσης 91,5% και μέσο όρο μεγέθους σωματιδίων 954,6nm. Οι προσδιορισμοί απέδειξαν τον σχηματισμό ομοιόμορφων σωματιδίων και την άμορφη κατάσταση της ασταξανθίνης που ενθυλακώθηκε στη μήτρα, ενώ δοκιμές αποθήκευσης 6 μηνών στους 40 °C έδειξαν την ενίσχυση της σταθερότητάς της. [48]

#### Σε Νανοσωματίδια:

Το πολύ (γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ) (PLGA) είναι ένα συμπολυμερές που προτείνεται για χρήση σε συστήματα τοπικής χορήγησης για την πρόληψη και τη θεραπεία της φωτοφθοράς, είναι μη τοξικό και μπορεί να υδρολυθεί *in vivo* στα βιοαποδομήσιμα μονομερή του, π.χ. γαλακτικό και γλυκολικό οξέα. Τα νανοσωματίδια PLGA-AST (AST-PLGA NP) αναπτύχθηκαν σε μια μελέτη βελτιστοποίησης, βασισμένη σε πειραματικό σχεδιασμό, με στόχο τη μεγιστοποίηση της απόδοσης ενθυλάκωσης ( $96,42 \pm 0,73\%$ ) και της ικανότητας χορήγησης φαρμάκου ( $7,19 \pm 0,12\%$ ) και την ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση του μεγέθους των σωματιδίων ( $154,4 \pm 0,35\text{nm}$ ). Η φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR), η θερμοδομετρία διαφορικής σάρωσης και οι θερμοβαρυμετρικές αναλύσεις επιβεβαίωσαν την ενθυλάκωση της ασταξανθίνης μέσα στα νανοσωματίδια PLGA. Για να αξιολογηθεί η ικανότητα κυτταρικής πρόσληψης, πραγματοποιήθηκε ένα *in vitro* μοντέλο με φθορίζοντα ανιχνευτή σε κύτταρα HaCaT. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κυτταρική πρόσληψη των νανοσωματιδίων αυξήθηκε, με αύξηση εξαρτώμενη από το

χρόνο. Ο έλεγχος της προστασίας και καθαρισμού των ελεύθερων ριζών πραγματοποιήθηκε στην ίδια κυτταρική σειρά, όπου η καθαρή ασταξανθίνη και το AST-PLGA NP εμφάνισαν παρόμοιες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. [48]

Τα νανοσωματίδια χιτοζάνης είναι πολλά υποσχόμενα ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων, λόγω της βιοσυμβατότητας, της βιοαποδομησιμότητας, της τοξικότητας και της βιοδραστικότητας τους. Η περιεκτικότητα σε ασταξανθίνη στο δείγμα ήταν υψηλότερη από ότι στο διάλυμα αιθανόλης, επιβεβαιώνοντας την ενίσχυση της διαλυτότητάς του. Η ανάλυση MTT, που πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση του κυτταροπροστατευτικού αποτελέσματος, έδειξε ότι το σύστημα νανοσωματιδίων χιτοζάνης απέτρεψε τη βλαβερή επίδραση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στη βιωσιμότητα των κυττάρων περισσότερο από τη βιταμίνη C (θετικός έλεγχος) και την ελεύθερη ασταξανθίνη, παρά τη συγκέντρωση βιταμίνης C που ήταν τρεις φορές υψηλότερη. Η αποτελεσματικότητα δέσμευσης ROS των νανοσωματιδίων χιτοζάνης ήταν διπλάσια από εκείνη της ελεύθερης ασταξανθίνης στην ίδια βιοδραστική συγκέντρωση. Λόγω της ευαισθησίας της ασταξανθίνης στη θερμότητα, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της αντοχής στη θερμική αποικοδόμηση των νανοσωματιδίων ασταξανθίνης που παρασκευάζονται με τη διαδικασία μετατόπισης διαλύτη, χρησιμοποιώντας τρία διαφορετικά πολυμερή, συγκεκριμένα πολύ (αιθυλενοξειδίο)-4-μεθοξυ κινναμοΐλ φθαλοΐλο-χιτοζάνη (PCPLC), πολύ (βινυλαλκοόλη-συν-βινυλο-4-μεθοξυκινναμικό) (PB4) και αιθυλοκυτταρίνη (EC). Ενώ το EC ήταν αναποτελεσματικό και το PB4 ελάχιστα αποδοτικό για την ενθυλάκωση της βιοδραστικής ένωσης, το PCPLC επέτρεψε μια αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης 98%, μια φόρτωση ~40% και ένα μέγεθος σωματιδίων 312 ± 5,83 nm. Σε δοκιμές θερμικής αποδόμησης στους 70°C για δύο ώρες, το μεγαλύτερο μέρος της ελεύθερης ασταξανθίνης αποικοδομήθηκε, ενώ η σύνθεση νανοσωματιδίων ήταν σε θέση να προστατεύσει το μόριο από την αποικοδόμηση. [48]

#### 5.5.1.4. Σε Συμπλέγματα Ένταξης/Εγκλεισμού (*Inclusion complexes*):

Κυκλοδεξτρίνη: Ανήκει σε μια οικογένεια κυκλικών πολυσακχαριτών που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό συμπλεγμάτων εγκλεισμού μεγάλης ποικιλίας ουσιών, που χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικά προϊόντα, καλλυντικά και βιομηχανίες τροφίμων και χημικών. Ο εγκλεισμός μορίων μπορεί να αλλάξει τις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες, καθώς και να αυξήσει τη διαλυτότητα και τη σταθερότητά τους στο νερό. Είναι μια εξαιρετική εναλλακτική για τον εγκλεισμό ποικιλίας φυσικών ενώσεων, όπως τα έλαια. Παρασκευάστηκαν συμπλέγματα ένταξης ασταξανθίνης με



διάφορους τύπους CD σε διαφορετικές αναλογίες, ποσοτικοποιήθηκε κάθε σύνθεση με HPLC, SEM και FT-IR και αξιολογήθηκε η σταθερότητα μετά από 28 ημέρες, η διαλυτότητά τους στο νερό υπό διαφορετικές συνθήκες pH, φωτός, θερμοκρασίας και οξείδωσης. Για την ελαχιστοποίηση του κόστους, έγινε σύγκριση με μια β-κυκλοδεξτρίνη ( $\beta$ -CD) που χρησιμοποιείται ευρέως σε εφαρμογές τροφίμων και καλλυντικών. Σχηματίστηκαν συμπλέγματα εγκλεισμού σε αναλογία ασταξανθίνης 1:200 και το μόριο ξενιστή έδειξε ομοιόμορφο σχήμα και μέγεθος σωματιδίου. Το  $\beta$ -CD αποδείχθηκε ότι ενσωματώνει την ασταξανθίνη, με απόδοση εγκλεισμού υψηλότερη από 90%, και η διαλυτότητα του συμπλέγματος ήταν 13 φορές αυξημένη στους 25°C και περίπου 100 φορές εκείνη της ελεύθερης ασταξανθίνης σε pH 6.5. Στη μελέτη σταθερότητας, η απόδοση του συμπλέγματος εγκλεισμού παρέμεινε πάνω από 80% μετά από 21 ημέρες ακτινοβολίας UV, ενώ η ελεύθερη ασταξανθίνη υποβαθμίστηκε πλήρως. Επιπλέον, αποδείχθηκε σταθερό έναντι της οξείδωσης, ευνοήθηκε από όξινες συνθήκες και παρουσίασε μεγαλύτερη αντοχή στη θερμοκρασία για βιομηχανική επεξεργασία. [48]

#### 5.5.1.5. Σε Συστήματα σχηματισμού μεμβράνης (Films):

Τα τοπικά συστήματα σχηματισμού φιλμ είναι συστήματα χορήγησης τοπικής εφαρμογής, ικανά να προσκολλώνται στο δέρμα, σχηματίζοντας ένα λεπτό διαφανές φιλμ που παρέχει τα δραστικά συστατικά στον ιστό. Παρόλο που είναι μια πολλά υποσχόμενη επιλογή για τοπική χορήγηση φαρμάκου, η βιβλιογραφία σχετικά με την ενσωμάτωση ασταξανθίνης για τις αντιοξειδωτικές της επιδράσεις στο δέρμα είναι σπάνια. Παρασκευάστηκαν συστήματα μεμβρανών για να καταδείξουν τις ιδιότητες επούλωσης πληγών της ασταξανθίνης όταν ενσωματώνονται σε μεμβράνες κολλαγόνου. Πραγματοποιήθηκαν *in vivo* δοκιμασίες για την αξιολόγηση της αναγέννησης ιστού και της χορήγησης φαρμάκου, και *in vitro* προσδιορισμοί για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης. Εκτός από το φιλμ κολλαγόνου ασταξανθίνης, αναπτύχθηκε ένα φιλμ κολλαγόνου που ενσωματώνει γενταμικίνη (gentamicin) για να αξιολογηθούν τα αντιβιοτικά του αποτελέσματα. Οι δοκιμές βιοαποικοδόμησης έδειξαν ότι τα υλικά φιλμ αποικοδομούνται πιο γρήγορα από τη μήτρα του κολλαγόνου, υποδηλώνοντας την ελεγχόμενη αποικοδόμηση των υλικών κολλαγόνου. Η δραστηριότητα επούλωσης τραυμάτων μετρήθηκε με τη μείωση της μη επουλωτικής περιοχής στη διαδικασία επούλωσης, που έλαβε χώρα σε διάστημα 21 ημερών. Ο μάρτυρας που δεν υποβλήθηκε σε θεραπεία εμφάνισε τη χαμηλότερη σύσπαση του

τραύματος, ενώ το φιλμ κολλαγόνου ασταξανθίνης έδειξε την υψηλότερη μεταξύ των πειραματικών ομάδων, καθώς και την ταχύτερη πρόοδο επούλωσης πληγών, με πλήρη επούλωση σε 15 ημέρες. Η αντιοξειδωτική ανάλυση με τη μέθοδο σάρωσης ελευθέρων ριζών DPPH έδειξε την υψηλότερη δραστικότητα του φιλμ κολλαγόνου ασταξανθίνης σε σύγκριση με το ασκορβικό οξύ. [48]

### **5.5.2. Φερουλικό οξύ (*Ferulic Acid*)**

Το φερουλικό οξύ παρέχει ευρείες βιολογικές λειτουργίες που έχουν χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση καλλυντικών ως φωτοπροστατευτικό, αντιγηραντικό και λευκαντικό. Ωστόσο, η εφαρμογή του περιορίζεται από την τάση του να αλλοιώνεται από την έκθεση στη θερμότητα, την υγρασία και το φως. Μια μελέτη είχε ως στόχο να ενισχύσει τη σταθερότητα του φερουλικού οξέος με ενθυλάκωση σε φωσφορυλιωμένο άμυλο ρυζιού (phosphorylated rice starch, PRS) και να αξιολογήσει την επίδρασή του στη βελτίωση του ανθρώπινου δέρματος. Αρχικά το φερουλικό ενθυλακώθηκε σε PRS και χαρακτηρίστηκε από FTIR, SEM, XRD και DSC. Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η σταθερότητά του όταν εκτέθηκε σε θερμοκρασία 45°C και φως και η αντιγηραντική του δράση σε 16 εθελοντές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το φερουλικό ενθυλακώθηκε επιτυχώς σε PRS με απόδοση ενθυλάκωσης 77%, EE (73%) και LE (65%). Μετά από 1 μήνα στην υψηλή θερμοκρασία/80%RH, το ενθυλακωμένο φερουλικό διατήρησε την ποσότητα του (70%), ενώ το ελεύθερο φερουλικό διατηρήθηκε μόνο στο 50%. Υπό συνθήκες έκθεσης στο φως, το ενθυλακωμένο φερουλικό διατηρήθηκε στο 65%, το οποίο ήταν υψηλότερο από το ελεύθερο (35%). Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα διάχυσης Franz και απέδειξε ότι το PRS παρείχε ελεγχόμενη απελευθέρωση. Η εφαρμογή έγκλειστων κρεμών φερουλικού οξέος και FA έδειξε απουσία ερεθισμού του δέρματος σε όλους τους εθελοντές. Μετά από 1 μήνα, η ενθυλακωμένη κρέμα βρέθηκε να είναι καλύτερη από την απλή κρέμα, σε όλες τις παραμέτρους SELS, για τη λεύκανση, την ελαστικότητα, την απαλότητα, την τραχύτητα, την λέπτυνση και τις ρυτίδες του δέρματος (skin lightening, elasticity, smoothness, roughness, scaliness, and wrinkle). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το PRS είναι ένα πιθανό υλικό τοιχώματος για την ενίσχυση της σταθερότητας του φερουλικού οξέος, με αποτέλεσμα πιο αποτελεσματικές ιδιότητες, λεύκανσης και αντιγήρανσης του δέρματος. [50]

### **5.5.3. Κουρκουμίνη (*Curcumin*)**

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η κουρκουμίνη έχει ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων βιοδραστηριοτήτων, όπως

αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιπολλαπλασιαστικές και αντιαγγειογενετικές επιδράσεις. Ωστόσο, η αστάθεια της κουρκουμίνης επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα του προϊόντος. Εφόσον η κουρκουμίνη είναι εξαιρετικά υδρόφοβη και λιποδιαλυτή, μπορεί να ενσωματωθεί στην ελαιώδη φάση των γαλακτωμάτων O/W. Το γαλάκτωμα σχηματίζεται από μικρά σταγονίδια κουρκουμίνης διασκορπισμένα σε μια υδατική συνεχή φάση και κάθε σταγονίδιο κουρκουμίνης περιβάλλεται από μόρια γαλακτωματοποιητή. Έχει προταθεί ότι η πρωτεΐνη και ο πολυσακχαρίτης έχουν σημαντικές επιδράσεις στις φυσικοχημικές ιδιότητες των γαλακτωμάτων, αφού πολλές πρωτεΐνες λειτουργούν ως γαλακτωματοποιητές λόγω της ικανότητάς τους να απορροφούν στη διεπιφάνεια λαδιού-νερού και να αυξάνουν τη σταθερότητα του γαλακτώματος και οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες δρουν ως σταθεροποιητές γαλακτώματος, σχηματίζοντας ένα εκτεταμένο δίκτυο στη συνεχή φάση η οποία αποκτά έτσι υψηλό ιξώδες. Δοκιμάζεται η μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (Microcrystalline cellulose, MCC), η οποία είναι παράγωγο κυτταρίνης που έχει εγκριθεί για χρήση σε τρόφιμα, ως πρόσθετο φυτικών ινών. Οι ιδιότητες του MCC εξαρτώνται από τη διαδικασία αποπολυμερισμού που συχνά περιλαμβάνει την εφαρμογή μηχανικών δυνάμεων για τη δημιουργία κρυστάλλων κυτταρίνης συγκεκριμένων μεγεθών. Το MCC είναι ένα ανιονικό βιοπολυμερές που έχει πολλές πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων λόγω των μοναδικών θρεπτικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων του. Η επεξεργασία κατάψυξης-απόψυξης είναι τα πιο καταστροφικά και αντιπροσωπευτικά πειράματα για τη σταθερότητα του γαλακτώματος. Ως εκ τούτου, ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διερευνήσει την επίδραση του MCC στη φυσική σταθερότητα του γαλακτώματος κουρκουμίνης. Η φυσική σταθερότητα αξιολογήθηκε με μέσο μέγεθος σωματιδίων μέσω τεχνικής δυναμικής σκέδασης φωτός (dynamic light scattering, DLS), δυναμικού ζήτα (zeta potential), δείκτη σταθερότητας (stability index) από ένα πρόσφατα αναπτυγμένο οπτικό αναλυτή (Turbiscan) και η μικρορολογική συμπεριφορά μέσω τεχνικής φασματοσκοπίας διάχυσης κυμάτων (diffusing wave spectroscopy, DWS). Η σταθερότητα του γαλακτώματος στην επεξεργασία κατάψυξης-απόψυξης αξιολογήθηκε επίσης για να προσδιοριστεί εάν το MCC θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την προστασία της βιοδραστικής ένωσης σε γαλακτώματα. Τελικά ο στόχος ήταν να χρησιμοποιηθούν πρωτεϊνικά υδρολύματα-πολυσακχαρίτες για την προστασία των βιοδραστικών συστατικών και την επέκταση της εφαρμογής τους. [51]

**Δυναμικό Ζήτη:** Το δυναμικό ζήτη των σταγονιδίων κουρκουμίνης προσδιορίστηκε με ένα όργανο ηλεκτροφόρησης σωματιδίων, μετρώντας την κατεύθυνση και την ταχύτητα της κίνησης των σταγονιδίων στο εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Οι μετρήσεις αναφέρθηκαν ως ο μέσος όρος των μετρήσεων για δύο πρόσφατα δείγματα, με πέντε καταγραφές αναγνώσεων για κάθε δείγμα. Το καθαρό φορτίο στα σταγονίδια δεν έδειξε σημαντική διαφορά, υποδεικνύοντας περίσσεια MCC που υπάρχει στο σύστημα συνεχούς γαλακτώματος. [51]

**Μέσο Μέγεθος Σωματιδίων:** Το μέσο μέγεθος σταγονιδίων προσδιορίστηκε με δυναμική σκέδαση φωτός, σε σταθερή γωνία ανιχνευτή 90°. Οι μετρούμενες συναρτήσεις συσχέτισης χρόνου αναλύθηκαν με Αυτόματο Πρόγραμμα εξοπλισμένο με τον συσχετιστή. Το μέσο μέγεθος σταγονιδίων λήφθηκε με ανάλυση τρόπου CONTIN. Τα αποτελέσματα περιγράφηκαν ως μέση διάμετρος συσσωρευτών (μέγεθος, nm) για το μέγεθος σταγονιδίων. Όταν η συγκέντρωση πολυσακχαρίτη ήταν σχετικά χαμηλή, το MCC αλληλεπιδρούσε έντονα με την επιφάνεια του σταγονιδίου, οδηγώντας έτσι σε μια μικρή αύξηση του μεγέθους τους, αλλά ήταν ανεπαρκές για να καλύψει ολόκληρο το σταγονίδιο. Έτσι, μπορεί να λειτουργήσει ως γέφυρα για να αλληλεπιδράσουν μόρια πρωτεΐνης μεταξύ των επιφανειών των σταγονιδίων κουρκουμίνης μέσω ελκυστικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Όταν η συγκέντρωση του MCC αυξηθεί, θα ήταν αρκετό να καλυφθούν τα σωματίδια και να σχηματιστεί ένα παχύ διπλό στρώμα στα σταγονίδια κουρκουμίνης. Επομένως, η κροκίδωση θα παρεμποδιζόταν από την ισχυρή ηλεκτροστατική απόθεση και τον στερεοειδικό αποκλεισμό μεταξύ των σταγονιδίων. Το αυξημένο μέγεθος σταγονιδίων στην περίπτωση υψηλότερης συγκέντρωσης γαλακτωμάτων κουρκουμίνης MCC έδειξε επίσης την περίσσεια MCC που υπάρχει στην υδατική φάση και το σχηματισμό πηκτώματος. [51]

**Μικρορολογικές ιδιότητες:** Το μικροροόμετρο Rheolaser Lab βασίζεται στη Φασματοσκοπία Διάχυσης Κυμάτων (DWS). Αντιστοιχεί σε δυναμική σκέδαση φωτός σε συγκεντρωμένα μέσα και μετρά την κίνηση Brown των σωματιδίων που εξαρτάται από την ιξωδοελαστική δομή του γαλακτώματος. Πραγματοποιήθηκε μια μικρορολογική δοκιμή 2 ωρών σε κάθε δείγμα γαλακτωμάτων κουρκουμίνης, που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις MCC. Το όργανο μετρά την κίνηση Brown των σωματιδίων ως τη Μέση Τετραγωνική Μετατόπιση (Mean Square Displacement, MSD) των σωματιδίων σε σχέση με το χρόνο. Αυτή κυμαινόταν από μη εμφανείς αλληλεπιδράσεις που ανιχνεύονταν σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση MCC, έως

αλληλεπιδράσεις μεγάλης εμβέλειας σε υψηλή συγκέντρωση MCC που επηρέασαν τη χωρική διάταξη των σταγονιδίων. Οι παράμετροι Elasticity Index (EI) και Macroscopic Viscosity Index (MVI) των δειγμάτων ελήφθησαν από το λογισμικό Rheosoft Master 1.4.0.0. Υπήρξε αξιοσημείωτη αύξηση στα EI και MVI με την αύξηση της συγκέντρωσης MCC ( $>8\text{g kg}^{-1}$ ), το οποίο αποδόθηκε σε υψηλότερη δύναμη αντίστασης μεταξύ σταγονιδίων. Θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι η παρουσία MCC είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό πυκνού δικτύου γέλης και τη χωρική αναδιάταξη των σταγονιδίων κουρκουμίνης. Αποδείχθηκε ότι η προσθήκη MCC βοήθησε στη σταθεροποίηση του γαλακτώματος λόγω της αύξησης του ιξώδους της υδατικής φάσης και της αλλαγής της φύσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σταγονιδίων. [51]

Διαδικασία ψύξης-απόψυξης: Για την ψύξη, δείγματα γαλακτώματος κουρκουμίνης μεταφέρθηκαν σε κρυογονικούς δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι επώαστηκαν σε καταψύκτη στους  $-18^{\circ}\text{C}$  για 22 ώρες. Στη συνέχεια αποψύχθηκαν τοποθετώντας τα σε λουτρό νερού με  $40^{\circ}\text{C}$  για 2 ώρες. Ο κύκλος ψύξης-απόψυξης σχεδιάστηκε από 0 έως 3 φορές και η επίδρασή του στο μέγεθος των σταγονιδίων και η σταθερότητα του γαλακτώματος αξιολογήθηκαν μετά από κάθε κύκλο. Το μέσο μέγεθος σταγονιδίων των γαλακτωμάτων κουρκουμίνης προσδιορίστηκε με δυναμική σκέδαση φωτός και η σταθερότητά τους αξιολογήθηκε με Turbiscan. Έδειξε ότι σημειώθηκαν αισθητές αυξήσεις στο μέγεθος των σταγονιδίων μετά από κύκλους κατάψυξης-απόψυξης. Υπήρξε μια εξάρτηση του μεγέθους σταγονιδίων του γαλακτώματος κουρκουμίνης από τον αριθμό των κύκλων κατάψυξης-απόψυξης απουσία MCC. Σύμφωνα και με άλλες αναφορές η διαδικασία κατάψυξης-απόψυξης έχει ως αποτέλεσμα μια αισθητή αύξηση στο μέγεθος σταγονιδίων των δειγμάτων που σταθεροποιήθηκαν μόνο με πρωτεΐνη, κάτι που ήταν ενδεικτικό εκτεταμένης κροκίδωσης ή συνένωσης σταγονιδίων. Οφείλονταν κυρίως στο ότι τα διεπιφανειακά στρώματα που περιέβαλλαν τα σταγονίδια κουρκουμίνης ήταν σχετικά λεπτά, οι κρύσταλλοι κουρκουμίνης θα μπορούσαν πιθανώς να διεισδύσουν εύκολα από το ένα σταγονίδιο στο άλλο, προάγοντας έτσι τη μερική συνένωση. Η επαγόμενη μετουσίωση των πρωτεϊνών μπορεί να συνέβη σε χαμηλές θερμοκρασίες που θα μπορούσε να οδηγήσει σε απώλεια της ιδιότητας γαλακτωματοποίησης πρωτεΐνης όταν το γαλάκτωμα αποψύχθηκε. Αναφέρθηκε ότι μόνο το προϊόν υδρόλυσης πρωτεΐνης δεν μπορούσε να αντισταθεί στην αστάθεια του γαλακτώματος της επεξεργασίας κατάψυξης-απόψυξης. Επίσης, έδειξε ότι η συσσωμάτωση σταγονιδίων συνέβη σε γαλακτώματα κατά τη διάρκεια της

επεξεργασίας κατάψυξης-απόψυξης. Αυτή η αποσταθεροποίηση οφειλόταν στα σχετικά λεπτά στρώματα του σταγονιδίου. Αναφέρθηκε ότι οι υδρόφοβες επιφανειακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων οδήγησαν σε πιο εντατική συσσώρευση πρωτεϊνών και σχηματισμό κροκίδωσης σταγονιδίων κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας κατάψυξης-απόψυξης. [51]

#### **5.5.4. Γαλακτώματα- πηκτώματα (Emulgels)**

Τα Emulgels είναι εύκολα στη προετοιμασία και παρέχουν αποτελεσματική χορήγηση υδρόφιλων και υδρόφοβων ουσιών. Εξετάστηκαν συστήματα Emulgel που περιέχουν poloxamer407, Carbopol974P®/polycarbophil, σησαμέλαιο/μυριστικό ισοπροπυλεστέρα (isopropyl myristate) παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας Quality by Design και οι φυσικοχημικές βλάβες διερευνήθηκαν σχετικά με τις προκαταρκτικές μελέτες σταθερότητας. Το Quality by Design ή αλλιώς Ποιότητα βάσει Σχεδιασμού είναι μια προσέγγιση που στοχεύει στη διασφάλιση της ποιότητας των φαρμάκων χρησιμοποιώντας στατιστική, αναλυτική μεθοδολογία και μεθοδολογία διαχείρισης κινδύνου στο σχεδιασμό. Στην έρευνα αξιολογήθηκε η φυσικοχημική σταθερότητα των Emulgels με έξι κύκλους ψύξης-απόψυξης (ψύξης:  $-5\pm 2^{\circ}\text{C}$ , απόψυξης:  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ , με διάρκεια κύκλου 24 ώρες, για 12 ημέρες), όπου τα σκευάσματα αξιολογήθηκαν οργανοληπτικά (χρώμα και όψη), μορφολογικά, κοκκομετρικά (μέση διάμετρος και δείκτης πολυδιασποράς σταγονιδίων ελαίου) και ανάλυση καθίζησης με φυγοκέντρηση, στην αρχή και στο τέλος κάθε κύκλου. Οι σταθερές συνθέσεις χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω από θερμοκρασία μετάπτωσης κolloειδούς-πηκτώματος (sol-gel transition temperature). Οι κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης και η αναλυτική φυγοκέντρηση έδειξαν συνεπή αποτελέσματα τα οποία αποδεικνύουν ότι η χαμηλότερη συγκέντρωση βιοσυγκολλητικών πολυμερών ενίσχυσε το διαχωρισμό φάσεων. Οι συνθέσεις φάνηκε να είναι συστήματα πολυδιασποράς, με το μέγεθος των σταγονιδίων να εξαρτάται από τους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης. Τα σταθερά συστήματα επιλέχθηκαν με την προσέγγιση Quality by Design και έδειξαν κατάλληλη θερμοκρασία πηκτωματοποίησης για μελλοντικές φαρμακευτικές και βιοϊατρικές εφαρμογές. [42]

## Επίλογος

Συμπερασματικά, όταν σχεδιάζεται μια μελέτη για την ενσωμάτωση αντιοξειδωτικών ουσιών σε καλλυντικά προϊόντα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πολλοί παράγοντες οι οποίοι θα χρειαστούν την ανάλογη ρύθμιση και κατάλληλη επιλογή για την επίτευξη του στόχου, δηλαδή ενός σταθερού και αποτελεσματικού προϊόντος. Δεδομένης της φύσης των αντιοξειδωτικών σε κάθε μεμονωμένη περίπτωση καλούμαστε να επιλέξουμε την καταλληλότερη μέθοδο ανάλυσης της αποτελεσματικότητάς τους, καθώς οι περισσότερες μέθοδοι, όπως αναλύσαμε στο κύριο μέρος αυτής της εργασίας, αφορούν συγκεκριμένες κατηγορίες αντιοξειδωτικών, π.χ. η μέθοδος ανάλυσης DPPH απευθύνεται ιδανικά σε φαινολικά αντιοξειδωτικά. Κάποιοι σημαντικοί παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη επίσης είναι το κόστος της μεθόδου, η ταχύτητα του αποτελέσματος, η επαναληψιμότητά του και η ευκολία της εκτέλεσης. Όλοι οι προαναφερόμενοι παράγοντες είναι σημαντικοί για το σχεδιασμό της βέλτιστης μελέτης και κατά συνέπεια σύνθεσης στο εργαστήριο. Αυτό το οποίο αποτελεί μεγαλύτερο εμπόδιο όμως είναι η σταθερότητα του αντιοξειδωτικού στο καλλυντικό προϊόν, καθώς παρουσιάζουν συχνά μεγάλη αστάθεια και γρήγορη αποδόμηση σε συνθήκες περιβάλλοντος, π.χ. η βιταμίνη C καταστρέφεται γρήγορα σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα. Οι τρόποι που χρησιμοποιούνται για να αντιμετωπιστούν προβλήματα αστάθειας των αντιοξειδωτικών αφορούν ως επί το πλείστον τον εγκλεισμό των ουσιών σε προστατευτικές δομές, όπως είναι τα λιποσώματα και τα νανοσωματίδια. Σε αυτά τα συστήματα χορήγησης η δραστική ουσία ενθυλακώνεται σε σταγονίδια ή κυστικές δομές μέσα στη σύνθεση, τα οποία την αποκλείουν από λοιπές αλληλεπιδράσεις με τα υπόλοιπα περιεχόμενα συστατικά της σύνθεσης και έτσι επιτυγχάνουν τη σταθερότητά της και τη μεταφορά της με αποτελεσματικότητα στον ιστό στόχο. Οι μελέτες σταθερότητας περιλαμβάνουν δοκιμασίες με αλλαγές θερμοκρασίας, φυγοκέντρησης, αποθήκευσης μηνών, έκθεσης σε φως και άλλους παρόμοιους παράγοντες, και στη συνέχεια ελέγχουν τη χημική, μικροβιολογική και φυσική σταθερότητα της σύνθεσης.

## Βιβλιογραφία

- [1] R. Ganceviciene, A. I. Liakou, A. Theodoridis, E. Makrantonaki, and C. C. Zouboulis, “Skin anti-aging strategies,” *Dermatoendocrinol*, vol. 4, no. 3, pp. 308–319, Jul. 2012, doi: 10.4161/derm.22804.
- [2] S. Huma, H. M. S. Khan, S. Ijaz, M. Sarfraz, H. S. Zaka, and A. Ahmad, “Development of Niacinamide/Ferulic Acid-Loaded Multiple Emulsion and Its *In Vitro/In Vivo* Investigation as a Cosmeceutical Product,” *Biomed Res Int*, vol. 2022, p. 1725053, 2022, doi: 10.1155/2022/1725053.
- [3] M. Yaar and B. A. Gilchrest, “Photoageing: mechanism, prevention and therapy,” *Br J Dermatol*, vol. 157, no. 5, pp. 874–887, 2007, doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08108.x.
- [4] J. Morry, W. Ngamcherdtrakul, and W. Yantasee, “Oxidative stress in cancer and fibrosis: Opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles,” *Redox Biol*, vol. 11, pp. 240–253, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.011>.
- [5] V. Fuchs-Tarlovsky, “Role of antioxidants in cancer therapy,” *Nutrition*, vol. 29, no. 1, pp. 15–21, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.02.014>.
- [6] F. Tomasina, C. Carabio, L. Celano, and L. Thomson, “Analysis of two methods to evaluate antioxidants,” *Biochemistry and Molecular Biology Education*, vol. 40, no. 4, pp. 266–270, Jul. 2012, doi: <https://doi.org/10.1002/bmb.20617>.
- [7] A. Y. Coulibaly, R. Hashim, S. F. Sulaiman, O. Sulaiman, L. Z. P. Ang, and K. L. Ooi, “Bioprospecting medicinal plants for antioxidant components,” *Asian Pac J Trop Med*, vol. 7, pp. S553–S559, 2014, doi: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60289-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60289-3).
- [8] K. Mishra, H. Ojha, and N. K. Chaudhury, “Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results,” *Food Chem*, vol. 130, no. 4, pp. 1036–1043, 2012, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>.
- [9] N. M. Al-Abd, Z. Mohamed Nor, M. Mansor, F. Azhar, M. S. Hasan, and M. Kassim, “Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization



- of *Melaleuca cajuputi* extract,” *BMC Complement Altern Med*, vol. 15, no. 1, p. 385, 2015, doi: 10.1186/s12906-015-0914-y.
- [10] W. Liu *et al.*, “Antioxidation and active constituents analysis of flower residue of *Rosa damascena*,” *Chin Herb Med*, vol. 12, no. 3, pp. 336–341, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2020.05.005>.
- [11] R. H. Liu, “Health-Promoting Components of Fruits and Vegetables in the Diet,” *Advances in Nutrition*, vol. 4, no. 3, pp. 384S–392S, May 2013, doi: 10.3945/an.112.003517.
- [12] E. Kim *et al.*, “Skin Protective Effect of Epigallocatechin Gallate,” *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 1, p. 173, Jan. 2018, doi: 10.3390/ijms19010173.
- [13] Δ. Παπαγιάννης and Δ. Δημοτικάλη, “N-Μεθυλο-9,10-Δωδροακρινιδίνη: Ένας Νέος Φθορισμομετρικός Δείκτης για τον Προσδιορισμό της Αντιοξειδωτικής Ικανότητας Φυσικών Προϊόντων,” Τομέας Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα, 2015.
- [14] S. H. Nile and S. W. Park, “Edible berries: Bioactive components and their effect on human health,” *Nutrition*, vol. 30, no. 2, pp. 134–144, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007>.
- [15] P. Rattanawiwatpong, R. Wanitphakdeedecha, A. Bumrungpert, and M. Maiprasert, “Anti-aging and brightening effects of a topical treatment containing vitamin C, vitamin E, and raspberry leaf cell culture extract: A split-face, randomized controlled trial,” *J Cosmet Dermatol*, vol. 19, no. 3, pp. 671–676, 2020, doi: 10.1111/jocd.13305.
- [16] V. M. Tadić *et al.*, “Enhanced Skin Performance of Emulgel vs. Cream as Systems for Topical Delivery of Herbal Actives (Immortelle Extract and Hemp Oil),” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 11, p. 1919, Nov. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13111919.
- [17] N. Kumar and V. Pruthi, “Potential applications of ferulic acid from natural sources,” *Biotechnology Reports*, vol. 4, pp. 86–93, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.btre.2014.09.002.

- [18] J. Pueknang and N. Saewan, “Stability and Anti-Aging of Encapsulated Ferulic Acid in Phosphorylated Rice Starch,” *Molecules*, vol. 27, no. 11, p. 3463, May 2022, doi: 10.3390/molecules27113463.
- [19] A. M. Muddathir, K. Yamauchi, I. Batubara, E. A. M. Mohieldin, and T. Mitsunaga, “Anti-tyrosinase, total phenolic content and antioxidant activity of selected Sudanese medicinal plants,” *South African Journal of Botany*, vol. 109, pp. 9–15, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.12.013>.
- [20] Z. Li *et al.*, “Antioxidant Activity and Mechanism of Resveratrol and Polydatin Isolated from Mulberry (*Morus alba* L.),” *Molecules*, vol. 26, no. 24, 2021, doi: 10.3390/molecules26247574.
- [21] C. Lourenço-Lopes *et al.*, “Scientific Approaches on Extraction, Purification and Stability for the Commercialization of Fucoxanthin Recovered from Brown Algae,” *Foods*, vol. 9, no. 8, 2020, doi: 10.3390/foods9081113.
- [22] M. Matsui *et al.*, “Protective and therapeutic effects of fucoxanthin against sunburn caused by UV irradiation,” *J Pharmacol Sci*, vol. 132, no. 1, pp. 55–64, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2016.08.004>.
- [23] A. Pappas, “Epidermal surface lipids,” *Dermatoendocrinol*, vol. 1, no. 2, pp. 72–76, 2009, doi: 10.4161/derm.1.2.7811.
- [24] Φ. Μέλλου, “Κλινικές μελέτες Ασφάλεια και Αποτελεσματικότητα καλλυντικών προϊόντων, Μέθοδοι για την αποτελεσματικότητα των καλλυντικών προϊόντων,” ΠΜΣ «Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία : Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια Νέων Καλλυντικών Προϊόντων», vol. Ενότητα 3Α, Β1. Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Κατεύθυνση Αισθητικής και Κοσμητολογίας, Αθήνα, 2022.
- [25] F. Xiao, T. Xu, B. Lu, and R. Liu, “Guidelines for antioxidant assays for food components,” *Food Front*, vol. 1, no. 1, pp. 60–69, 2020, doi: <https://doi.org/10.1002/fft2.10>.
- [26] Α. Βαρβαρέσου, “Κλινικές μελέτες Ασφάλεια και Αποτελεσματικότητα καλλυντικών προϊόντων, Μέθοδοι για την αποτελεσματικότητα των καλλυντικών προϊόντων,” ΠΜΣ «Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία : Ανάπτυξη,

*Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια Νέων Καλλυντικών Προϊόντων»,* vol. Ενότητα 3Γ, Β2. Τομέας Αισθητικής και Κοσμητολογίας, Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών ΠΑΔΑ, Αθήνα, 2022.

- [27] E. and Imaging. Bruker BioSpin - NMR, “Monitoring Photodegradation with EPR Spectroscopy.,” *News-Medical.*, Mar. 2022.
- [28] R. Guo, X. Guo, T. Li, X. Fu, and R. H. Liu, “Comparative assessment of phytochemical profiles, antioxidant and antiproliferative activities of Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries,” *Food Chem*, vol. 221, pp. 997–1003, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.063>.
- [29] M. Özyürek *et al.*, “A comprehensive review of CUPRAC methodology,” *Analytical Methods*, vol. 3, pp. 2439–2453, Aug. 2011, doi: [10.1039/C1AY05320E](https://doi.org/10.1039/C1AY05320E).
- [30] A. E. Trofin, L. C. Trincă, E. Ungureanu, and A. M. Arton, “CUPRAC Voltammetric Determination of Antioxidant Capacity in Tea Samples by Using Screen-Printed Microelectrodes,” *J Anal Methods Chem*, vol. 2019, p. 8012758, 2019, doi: [10.1155/2019/8012758](https://doi.org/10.1155/2019/8012758).
- [31] A. G. Darwish *et al.*, “Untargeted Metabolomics and Antioxidant Capacities of Muscadine Grape Genotypes during Berry Development,” *Antioxidants (Basel)*, vol. 10, no. 6, 2021, doi: [10.3390/antiox10060914](https://doi.org/10.3390/antiox10060914).
- [32] A. T. Ludlow, D. Shelton, W. E. Wright, and J. W. Shay, “ddTRAP: A Method for Sensitive and Precise Quantification of Telomerase Activity,” *Methods Mol Biol*, vol. 1768, pp. 513–529, 2018, doi: [10.1007/978-1-4939-7778-9\\_29](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7778-9_29).
- [33] R. Wang, J. Li, R. Jin, Q. Ye, L. Cheng, and R. Liu, “Nonradioactive direct telomerase activity detection using biotin-labeled primers,” *J Clin Lab Anal*, vol. 35, no. 6, p. e23800, 2021, doi: [10.1002/jcla.23800](https://doi.org/10.1002/jcla.23800).
- [34] I. Mender and J. W. Shay, “Telomerase Repeated Amplification Protocol (TRAP),” *Bio Protoc*, vol. 5, no. 22, 2015, doi: [10.21769/bioprotoc.1657](https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1657).
- [35] S. Biswas, S. Samui, A. K. Das, S. Pasadi, K. Muniyappa, and J. Naskar, “Targeting G-quadruplex DNA with synthetic dendritic peptide: modulation of

- the proliferation of human cancer cells,” *RSC Adv*, vol. 10, no. 44, pp. 26388–26396, 2020, doi: 10.1039/D0RA04780E.
- [36] Vitthal S. Kulkarni, *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, 1st ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Inc.: Amsterdam, William Andrew Publishing, 2010.
- [37] W.-F. Lai and A. L. Rogach, “Hydrogel-Based Materials for Delivery of Herbal Medicines,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 9, no. 13, pp. 11309–11320, Apr. 2017, doi: 10.1021/acsami.6b16120.
- [38] L. M. B. de Francisco, H. C. Rosseto, L. de Alcântara Sica de Toledo, R. S. dos Santos, S. B. de Souza Ferreira, and M. L. Bruschi, “Organogel composed of poloxamer 188 and passion fruit oil: Sol-gel transition, rheology, and mechanical properties,” *J Mol Liq*, vol. 289, p. 111170, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111170>.
- [39] P. Morganti, “Chapter 1 - Nanocosmetics: an introduction,” in *Nanocosmetics*, A. Nanda, S. Nanda, T. A. Nguyen, S. Rajendran, and Y. Slimani, Eds. Elsevier, 2020, pp. 3–16. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822286-7.00001-2>.
- [40] Φ. Μέλλου, “Βιοτεχνολογικά Καλλυντικά-Καλλυντικά από Ανανεώσιμες Πηγές Ενέργειας,” ΠΜΣ «Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία : Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια Νέων Καλλυντικών Προϊόντων». Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Κατεύθυνση Αισθητικής και Κοσμητολογίας, Αθήνα, 2021.
- [41] Ajazuddin *et al.*, “Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel,” *Journal of Controlled Release*, vol. 171, no. 2, pp. 122–132, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.06.030>.
- [42] S. B. de Souza Ferreira and M. L. Bruschi, “Investigation of the physicochemical stability of emulgels composed of poloxamer 407 and different oil phases using the Quality by Design approach,” *J Mol Liq*, vol. 332, p. 115856, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115856>.
- [43] M. Kakran and M. N. Antipina, “Emulsion-based techniques for encapsulation in biomedicine, food and personal care,” *Curr Opin Pharmacol*, vol. 18, pp. 47–55, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.09.003>.

- [44] Α. Βαρβαρέσου, “Κοσμητολογία ΙΙ (Θ),” no. Ενότητα 8: Λιπосώματα. Τμήμα Αισθητικής και Κοσμητολογίας, 2014.
- [45] S. B. de Souza Ferreira and M. L. Bruschi, “Investigation of the physicochemical stability of emulgels composed of poloxamer 407 and different oil phases using the Quality by Design approach,” *J Mol Liq*, vol. 332, p. 115856, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115856>.
- [46] Σ. Παπαγεωργίου, “Έρευνα & Ανάπτυξη (R&D I) Καλλυντικών Προϊόντων,” ΠΜΣ «Προχωρημένη Αισθητική και Κοσμητολογία : Ανάπτυξη, Ποιοτικός Έλεγχος και Ασφάλεια Νέων Καλλυντικών Προϊόντων». Αθήνα, 2020.
- [47] European Medicines Agency, *ICH Topic Q1A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products (CPMP/ICH/2736/99)*. European Medicines Agency, 2003.
- [48] S. G. M. Lima, M. C. L. C. Freire, V. da S. Oliveira, C. Solisio, A. Converti, and Á. A. N. de Lima, “Astaxanthin Delivery Systems for Skin Application: A Review,” *Mar Drugs*, vol. 19, no. 9, 2021, doi: 10.3390/md19090511.
- [49] R. Ambati, S.-M. Phang, S. Ravi, and R. Aswathanarayana, “Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review,” *Mar Drugs*, vol. 12, no. 1, pp. 128–152, Jan. 2014, doi: 10.3390/md12010128.
- [50] J. Pueknang and N. Saewan, “Stability and Anti-Aging of Encapsulated Ferulic Acid in Phosphorylated Rice Starch,” *Molecules*, vol. 27, no. 11, p. 3463, May 2022, doi: 10.3390/molecules27113463.
- [51] D. Xu, J. Zhang, Y. Cao, J. Wang, and J. Xiao, “Influence of microcrystalline cellulose on the microrheological property and freeze-thaw stability of soybean protein hydrolysate stabilized curcumin emulsion,” *LWT - Food Science and Technology*, vol. 66, pp. 590–597, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.002>.

