



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Παραλαβή φυτικών εκχυλισμάτων και συστατικών που
χρησιμοποιούνται στην Κοσμητολογία, με σκοπό τη μελέτη
της αντιοξειδωτικής τους δράσης**

POST GRADUATE THESIS

**Study of antioxidant activity in plant extracts and ingredients used in
Cosmetology**



Τσούλη Αναστασία
Tsouli Anastasia

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR
Γεώργιος Αλβέρτος Καρίκας
Georgios Alvertos Karikas

ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2022



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

**Study of antioxidant activity in plant extracts and ingredients used in
Cosmetology**

Anastasia Tsouli

20054

natassa1924@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

Georgios Alvertos Karikas

SECOND SUPERVISOR

Maria Trapali

AIGALEO 2022

Επιτροπή εξέτασης

Ημερομηνία εξέτασης: **03/10/2022**

Ονόματα εξεταστών

Υπογραφή

1^{ος} Εξεταστής Γεώργιος Αλβέρτος Καρίκας

2^{ος} Εξεταστής Μαρία Τράπαλη

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Τσούλη Αναστασία του Ιωάννη Τσούλη, με αριθμό μητρώου 20054, φοιτητήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση 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».

Η Δηλούσα

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, πρωτίστως την Κα Τράπαλη, καθηγήτρια του μεταπτυχιακού προγράμματος που συμμετείχα, η οποία με βοήθησε πάρα πολύ στο πειραματικό στάδιο της εργασίας, το οποίο λόγω έλλειψης χρόνου από πλευράς μου, χρειάστηκε να το τρέχουμε ακόμα και Σάββατα. Τον Κο Καρίκα, επιβλέποντα της διπλωματικής μου και επίσης καθηγητή στο πρόγραμμα του μεταπτυχιακού, γιατί παρ' όλες τις αμφιβολίες (και τα επακόλουθα άγχη μου), σχετικά με το κατά πόσο μπορεί να ολοκληρωθεί η εργασία παράλληλα με το απαιτητικό πρόγραμμα της καθημερινότητας στο επαγγελματικό επίπεδο, ήταν δίπλα μου να προσφέρει τις γνώσεις του και την αισιοδοξία του, στοιχεία που προσωπικά με συντόνιζαν και ηρεμούσαν πολύ. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρία που εργάζομαι (ΚΟΡΡΕΣ ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ), για την προμήθεια των πρώτων υλών που χρειάστηκα για την εργασία, όπως επίσης και 2 συναδέλφους οι οποίοι με βοήθησαν σε αρκετές πειραματικές διαδικασίες.

Περίληψη

Εισαγωγή: Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τη μελέτη των αντιοξειδωτικών μορίων. Η σημαντικότερη ικανότητα των διάφορων κατηγοριών αντιοξειδωτικών (πολυφαινολικές ενώσεις, καροτενοειδή κ.α.), είναι η εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών προστατεύοντας τον οργανισμό από τις συνέπειες του οξειδωτικού stress. Δρουν, συνεπώς, κυρίως ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες ενώ εμφανίζουν ακόμη και αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση. Όλα τα παραπάνω εκμεταλλεύεται η βιομηχανία καλλυντικών με σκοπό την παρασκευή φυσικών προϊόντων που λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης παρουσιάζουν τεράστια οφέλη για το δέρμα και την υγεία γενικότερα. Στην παρούσα εργασία, θα ασχοληθούμε με τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων και συστατικών που χρησιμοποιούνται στη σύγχρονη Κοσμητολογία.

Σκοπός: Η απόδειξη της ύπαρξης αντιοξειδωτικής δράσης σε φυτικά εκχυλίσματα και συστατικά φυτών, και οι ευεργετικές τους ικανότητες σε ό,τι αφορά το ανθρώπινο δέρμα.

Μέθοδος: Αρχικά θα γίνει η παραλαβή των συμπυκνωμένων εκχυλισμάτων που προέκυψαν από βιομηχανικής κλίμακας εκχυλίσεις. Στην συνέχεια θα εξεταστεί in vitro το ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο με τη μέθοδο Folin Ciocalteu, όπως επίσης και η αντιοξειδωτική ικανότητα τους με τις μεθόδους FRAP και DPPH.

Αποτελέσματα: Επιβεβαίωση ύπαρξης αντιοξειδωτικής δράσης στα προς μελέτη εκχυλίσματα. Πολύ ισχυρή αντιοξειδωση εμφάνισε το εκχύλισμα με δραστική ουσία τη Βιταμίνη Ε.

Συμπεράσματα: Τα φυτικά εκχυλίσματα πράγματι, είναι μια πηγή αντιοξειδωσης που δίκαια χρησιμοποιείται στη βιομηχανία καλλυντικών και χρήζουν παραπάνω ανάλυσης και έρευνας ώστε να τελειοποιηθούν οι μέθοδοι εκμετάλλευσης τους. Πρόκειται για μία κατεύθυνση που στηρίζεται στη φύση και μπορεί να δώσει πολλές λύσεις στη σύγχρονη υγεία και ομορφιά.

Λέξεις κλειδιά: Οξειδωτικό stress, Αντιοξειδωτικά, Ελεύθερες ρίζες, Πολυφαινόλες, Φωτογήρανση, Φυτικά εκχυλίσματα, Κοσμητολογία

Abstract

Introduction: In recent years, there has been increasing interest in the study of antioxidants. The most important ability of the various classes of antioxidants (polyphenolic compounds, carotenoids, etc.), is the neutralization of free radicals protecting the body from the effects of oxidative stress. They, therefore, act mainly as chemoprotectives while they also present, anti-inflammatory, and antimicrobial activity. The cosmetics industry exploits all the above to prepare natural products that, due to their antioxidant action, present huge benefits for the skin and health in general. In this paper, we will study the antioxidant activity of plant extracts and ingredients, used in modern Cosmetology.

Purpose: Evidence of antioxidant activity in plant extracts and ingredients and their beneficial impact on human skin.

Method: Initially, the concentrated extracts resulting from industrial-scale extractions, will be received. Then, their total polyphenolic content will be examined, in vitro, with the Folin Ciocalteu method, as well as their antioxidant capacity with the FRAP and DPPH methods

Results: Confirmation of antioxidant activity in the studied extracts. The extract with the active substance Vitamin E showed the strongest antioxidant activity.

Discussion: Plant extracts are, indeed, a really good antioxidant source fairly used in cosmetics and there is a need for more analysis and research, to optimize their exploitation methods. It is a scientific direction, based on nature and can provide many solutions to modern health and beauty.

Key words: Oxidative stress, Antioxidants, Free radicals, Polyphenols, Photoaging, Plant extracts, Cosmetics

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	1
1. Εισαγωγή.....	4
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	4
1.1.1 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών.....	4
1.1.2 Δημιουργία ελευθέρων ριζών σε βιολογικά συστήματα	4
1.1.3 Μορφές ελευθέρων ριζών	6
1.2 Οξειδωτικό stress.....	11
1.2.1 Το οξειδωτικό stress ως φυσιολογικός βιοδείκτης.....	11
1.2.2 Οξειδωτικό stress και παθογένεση	12
1.3 Αντιοξειδωτικά	14
1.3.1 Ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	15
1.3.2 Ενδογενή μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά	15
1.3.3 Εξωγενή μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά και μόρια μικρού μοριακού βάρους .	16
1.3.4 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης	17
2. Γήρανση δέρματος και αντιοξειδωτικά.....	19
2.1 Γήρανση του δέρματος.....	19
2.2 Παράγοντες που εμπλέκονται στη γήρανση του δέρματος.....	19
2.3 Φυσικά αντιοξειδωτικά και Κοσμητολογία	22
2.3.1 Φυτικές πολυφαινόλες	23
2.3.2 Δράση πολυφαινολών στα καλλυντικά	28
2.3.3 Βιταμίνες στα καλλυντικά.....	29
3. Πειραματικό Μέρος.....	34
3.1 Μέθοδος Folin-Ciocalteu- Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών.....	34
3.1.1 Αρχή μεθόδου.....	34
3.1.2 Υλικά και Αντιδραστήρια	35
3.1.3 Πειραματική διαδικασία.....	36
3.2 Μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	38
3.2.1 Αρχή μεθόδου.....	38
3.2.2 Υλικά και αντιδραστήρια	38

3.2.3 Πειραματική διαδικασία	39
3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλιο)	42
3.3.1 Αρχή μεθόδου	42
3.3.2 Υλικά και αντιδραστήρια	42
3.3.3 Πειραματική διαδικασία	43
4. Συμπεράσματα – Συζήτηση	51
Βιβλιογραφία.....	53

Περιεχόμενες Εικόνες

Εικόνα 1. Δημιουργία ελευθέρων ριζών από εξωγενείς παράγοντες.....	6
Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των Halliwell & Gutteridge: Λιπιδική υπεροξειδωση του αραχιδονικού οξέος προς μηλονοδιαλδεΐδη	11
Εικόνα 3. Κατάσταση οξειδωτικού stress	12
Εικόνα 4. Μονοπάτια τοξικότητας ελευθέρων ριζών.....	14
Εικόνα 5. Απεικόνιση των αλλαγών της μορφολογίας του δέρματος μετά από έκθεση σε UV (γήρανση-καρκίνος).....	22
Εικόνα 6. Βασική δομή φαινόλης	24
Εικόνα 7. Χαρακτηριστικές δομές φλαβονοειδών	25
Εικόνα 8. Χαρακτηριστικές δομές φαινολικών οξέων.....	26
Εικόνα 9. Δομή ρεσβερατρόλης.....	27
Εικόνα 10. Δομές Λιγνάνιων	28
Εικόνα 11. Δομή βιταμίνης A	30
Εικόνα 12. Δομή β-καροτίνης	30
Εικόνα 13. Δομή πανθενόλης	32
Εικόνα 14. Δομή νιασίνης	32
Εικόνα 15. Δομή βιταμίνης C	33
Εικόνα 16. Δομής της α-τοκοφερόλης.....	34
Εικόνα 17. Αντίδραση μεταξύ των φαινολικών ενώσεων και των παραγώγων του φωσφοβολφραμικού και του φωσφομολυβδικού οξέος σε αλκαλικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μπλε χρώματος με τη μέθοδο Folin–Ciocalteu (α). Διακύμανση χρώματος που παρατηρήθηκε στον προσδιορισμό	35
Εικόνα 18. Αναγωγή τρισθενούς συμπλόκου Fe^{3+} -TPTZ σε δισθενές Fe^{2+} -TPZT.....	38
Εικόνα 19. Εξουδετέρωση ρίζας DPPH από αντιοξειδωτικό και μετατροπή της σε DPPH:H	42

Περιεχόμενοι Πίνακες

Πίνακας 1. Δραστικές μορφές Οξυγόνου	8
Πίνακας 2. Δραστικές μορφές Αζώτου	10
Πίνακας 3. Βιταμίνη Α και παράγωγά της-Δράσεις/Χρήσεις	31
Πίνακας 4. Εκχυλίσματα εργασίας	34
Πίνακας 5. Απορροφήσεις σε διαδοχικές συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος, για κατασκευή πρότυπης καμπύλης στη μέθοδο Folin–Ciocalteu	36
Πίνακας 6. Συγκεντρώσεις φαινολικών των διάφορων εκχυλισμάτων με μέθοδο Folin–Ciocalteu	37
Πίνακας 7. Απορροφήσεις σε διαδοχικές συγκεντρώσεις του $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ για παρασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς	39
Πίνακας 8. Αποτελέσματα μελέτης κινητικής των εκχυλισμάτων με μέθοδο FRAP	40
Πίνακας 9. Συγκέντρωση εκχυλισμάτων στα 8min με μέθοδο FRAP	41
Πίνακας 10. Ποσοστό % σάρωσης DPPH σε διαδοχικές συγκεντρώσεις του Trolox για παρασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς	43
Πίνακας 11. Αναλογίες αντιδραστηρίων για μέθοδο DPPH χωρίς την προσθήκη ρίζας ...	44
Πίνακας 12. Αναλογίες αντιδραστηρίων για μέθοδο DPPH με την προσθήκη ρίζας	45
Πίνακας 13. Απορροφήσεις στα 517 nm χωρίς την προσθήκη ρίζας DPPH.....	45
Πίνακας 14. Αποτελέσματα Innovent με μέθοδο σάρωσης DPPH	45
Πίνακας 15. Αποτελέσματα Lupeol με μέθοδο σάρωσης DPPH	46
Πίνακας 16. Αποτελέσματα Saffron με μέθοδο σάρωσης DPPH	47
Πίνακας 17. Αποτελέσματα Dermofeel με μέθοδο σάρωσης DPPH	47
Πίνακας 18. Αποτελέσματα Κουρκουμά με μέθοδο σάρωσης DPPH	48

Περιεχόμενα Διαγράμματα

Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος	36
Διάγραμμα 2. Διάγραμμα σύγκρισης συνολικού φαινολικού περιεχομένου στα διάφορα εκχυλίσματα με μέθοδο Folin–Ciocalteu	37
Διάγραμμα 3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ για μέθοδο FRAP	40
Διάγραμμα 4. Συγκεντρωτικό διάγραμμα κινητικής όλων των εκχυλισμάτων με μέθοδο FRAP.....	41
Διάγραμμα 5. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox συγκέντρωσης - % σάρωσης, με μέθοδο σάρωσης ρίζας DPPH	44
Διάγραμμα 6. Καμπύλη συγκέντρωσης - ποσοστό σάρωσης ρίζας DPPH για Innoveol....	46
Διάγραμμα 7. Καμπύλη συγκέντρωσης - ποσοστό σάρωσης ρίζας DPPH για Lupeol.....	46
Διάγραμμα 8. Καμπύλη συγκέντρωσης - ποσοστό σάρωσης ρίζας DPPH για Saffron	47
Διάγραμμα 9. Καμπύλη συγκέντρωσης - ποσοστό σάρωσης ρίζας DPPH για Dermofeel. 48	
Διάγραμμα 10. Καμπύλη συγκέντρωσης - ποσοστό σάρωσης ρίζας DPPH για Κουρκουμά	49
Διάγραμμα 11. Συγκεντρωτικό διάγραμμα εκχυλισμάτων συγκέντρωση – ποσοστό σάρωσης ρίζας DPPH.....	49

Πρόλογος

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα για τη μελέτη των διαθέσιμων φυσικών αντιοξειδωτικών και τη χρήση αυτών προς όφελος της Υγείας. Ως αντιοξειδωτικά ορίζονται οι ουσίες, οι οποίες όταν συνυπάρχουν, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με διάφορα ευαίσθητα σε οξείδωση υποστρώματα, καθυστερούν σημαντικά ή και ακόμα αποτρέπουν, την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων (Halliwell B. , 1995). Στην περίπτωση που υπάρξει κάποια ανισορροπία μεταξύ αυτών των δύο υπέρ του δεύτερου, δημιουργείται μια κατάσταση ονομαζόμενη ως «οξειδωτικό stress» (Sies, 2000). Στην κατάσταση αυτή, δημιουργούνται διαφορετικές ελεύθερες ρίζες η επίδραση των οποίων ποικίλει, με σημαντικό μέρος αυτών να προκαλούν σοβαρές βλάβες σε βιολογικά μόρια όπως είναι το DNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες (Halliwell B. , 1996).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δημιουργηθούν ως προϊόντα ομολυτικών, ετερολυτικών ή οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, παράγοντας είτε φορτισμένα είτε μη φορτισμένα είδη ριζών. Να σημειωθεί, ότι ο γενικός όρος ROS, αναφέρεται όχι μόνο σε οξυγονοκεντρικές ρίζες, αλλά περιλαμβάνει επίσης και μη ριζικά αλλά πολύ δραστικά παράγωγα οξυγόνου (π.χ. υπεροξειδίου του υδρογόνου) (W.Lim & A. Soter, 1993). Οι κύριες ελεύθερες ρίζες που παράγονται στα κύτταρα είναι το **υπεροξειδίου (O_2^*)** και το **μονοξειδίου του αζώτου (NO^*)**. Το υπεροξειδίου παράγεται είτε μέσω ατελούς αναγωγής του οξυγόνου στα συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων, είτε ως συγκεκριμένο προϊόν ενζυματικών συστημάτων, ενώ το μονοξειδίου του αζώτου παράγεται από μια σειρά ειδικών ενζύμων (οι συνθάσες νιτρικού οξειδίου). Τόσο το υπεροξειδίου όσο και το μονοξειδίου του αζώτου, είναι πολύ δραστικά και μπορούν εύκολα να αντιδράσουν για να σχηματίσουν μια σειρά άλλων ROS και RNS (Patwell, McArdle, Morgan, Patridge, & Jackson, 2004). Έτσι, οδηγούμαστε στις επόμενες σημαντικότερες κατηγορίες ριζών μία εκ των οποίων είναι το **υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)**. Πρόκειται για μία δραστική ένωση, που μπορεί εύκολα να δημιουργήσει ελεύθερες ρίζες (πχ ρίζα υδροξυλίου), σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Είναι σταθερό, διαπερατό στις μεμβράνες και έχει σχετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής εντός του κυττάρου (Salvador, Sousa, & Pinto, 2001). Μία εξαιρετικά δραστική ρίζα είναι αυτή του **υδροξυλίου (*OH)**. Οι ρίζες υδροξυλίου καταστρέφουν μόρια κοντά στη θέση παραγωγής τους και λόγω της υψηλής

δραστηκότητάς τους, δεν είναι διαπερατά από τη μεμβράνη. Θεωρούνται από τις πιο επιβλαβείς, δυνητικά, ρίζες ROS, που υπάρχουν σε βιολογικά υλικά (Halliwell B. , 1995). Μια άλλη δραστική μορφή οξυγόνου, το **μονήρες οξυγόνο (O₂)**, μπορεί επίσης να δημιουργηθεί σε ορισμένα βιολογικά υλικά. Το μονήρες οξυγόνο έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής αλλά είναι ικανό να διαχέεται και να διαπερνά τις μεμβράνες (Halliwell B. , 1991).

Οι αμυντικοί μηχανισμοί απέναντι στις παραπάνω ρίζες είναι τα αντιοξειδωτικά, τα οποία ανάλογα με την προέλευση τους, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα **ενδογενή** (ενυπάρχουν φυσιολογικά στον οργανισμό) και τα **εξωγενή** (προσλαμβάνονται από την τροφή). Ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους χωρίζονται σε επίσης δύο κατηγορίες: τα **ενζυμικά** και τα **μη ενζυμικά**. (Lobo V, A Patil, A Phatak, & N Chandra, 2010) (Nimse & Pal, 2015). Στα ενδογενή ενζυμικά περιλαμβάνονται τα εξής:

- υπεροξειδική δισμουτάση,
- καταλάση,
- υπεροξειδάση της γλουταθειόνης,
- γλουταθειόνη.

Στην κατηγορία των εξωγενών αντιοξειδωτικών ανήκουν τα φυτοχημικά, ενώσεις που προέρχονται από φυτά και παίζουν ουσιαστικό ρόλο στις λειτουργίες του σώματος. Τα τρόφιμα περιέχουν μια σειρά από φυσικές ενώσεις που έχουν αναφερθεί ότι έχουν αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά λόγω της παρουσίας υδροξυλομάδων στη δομή τους. Τα συνθετικά και φυσικά αντιοξειδωτικά αποτρέπουν την οξειδωτική βλάβη στα πιο σημαντικά μακρομόρια όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα που βρίσκονται στο ανθρώπινο σώμα μέσω της δέσμευσης των ελεύθερων ριζών που σχηματίζονται σε διαφορετικές βιοχημικές διεργασίες (Shui & Leong, 2004). Ανήκουν στα μη ενζυμικά, και τα σημαντικότερα είναι τα παρακάτω:

- βιταμίνη E
- βιταμίνη C
- βιταμίνη A
- καροτενοειδή
- λιποϊκό οξύ

- φυτικές πολυφαινόλες: περιλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τις τανίνες και τα λιγότερο κοινά στιλβένια και λιγνάνες. Τα φλαβονοειδή είναι οι πιο άφθονες πολυφαινόλες στη διατροφή μας (Dai & Mumpfer, 2010).

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που ενισχύουν το οξειδωτικό stress στη σημερινή εποχή, με πρωταγωνιστές να είναι το κάπνισμα, η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, η μόλυνση της ατμόσφαιρας, και φυσικά, το stress. Υπάρχει πληθώρα βιβλιογραφίας-για τις επιπτώσεις που έχουν όλα τα παραπάνω στον άνθρωπο, τόσο σε επίπεδο ασθενειών (Alzheimer, Νόσος Parkinson, καρκίνος, κ.α.) (Lobo V, A Patil, A Phatak, & N Chandra, 2010), όσο και σε επίπεδο εξωτερικής εμφάνισης (πρόωρη γήρανση του δέρματος). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει μία ενίσχυση της οξειδωτικής βλάβης του δέρματος, όταν αυτό εκτίθεται τακτικά σε UVA και UVB ακτινοβολίες, σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς ρύπους (Burke, 2010).

Το γεγονός πως η φωτογήρανση έχει προκληθεί από οξειδωτική βλάβη, επιβεβαιώνεται από την απόδειξη ότι η θεραπεία με τοπικά αντιοξειδωτικά μπορεί να αποτρέψει ή/και εν μέρη να αναστρέψει αυτή τη φωτοφθορά (Burke, 2010). Αυτό εκμεταλλεύεται και η βιομηχανία καλλυντικών, μόνο που τελευταία το ενδιαφέρον έχει στραφεί σε σκευάσματα που παρασκευάζονται από φυσικούς πόρους και όχι από συνθετικές ουσίες. Αυτό συμβαίνει διότι έχει αποδειχθεί, πως τα φυτά λειτουργούν ως πηγή βιολογικών ενεργών συστατικών με καλλυντική και δερματολογική δράση (Cherubim, Martins, Fariña, & Aparecida da Silva de Lucca, 2019). Τέτοια συστατικά είναι οι κάποιες από τις ουσίες που αναφέρθηκαν παραπάνω (φαινολικές ενώσεις, ασκορβικό οξύ, καρτενοειδή, βιταμίνες κ.α.), τα οποία προέρχονται από διαφορετικά είδη φυτών και φρούτων και είναι ικανά να προστατεύουν το δέρμα, αποτρέποντας τη διείσδυση της υπεριώδους ακτινοβολίας, μειώνοντας τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες και επηρεάζοντας πολλές σηματοδοτικές οδούς επιβίωσης (Petruk, Del Giudice, Manuela Rigano, & Monti, 2018). Έχουν αποδεδειγμένη αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιγηραντική, αντιμικροβιακή δράση και συνδράμουν σημαντικά στη φωτοπροστασία (Cherubim, Martins, Fariña, & Aparecida da Silva de Lucca, 2019)

1. Εισαγωγή

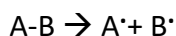
1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ένα άτομο αποτελείται από έναν κεντρικό πυρήνα και ζεύγη ηλεκτρονίων, τα οποία περιφέρονται γύρω του. Ως ελεύθερες ρίζες ορίζονται περιπτώσεις μορίων, που στην εξωτερική τους στιβάδα αντί του ζεύγους, περιέχουν ένα ή και περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. (Yoshikawa & Naito, 2002). Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς (με διάρκεια ζωής της τάξεως χιλιοστών του δευτερολέπτου (Κουρουνάκη, 2022) και εξαιρετικά δραστικές, αφού μπορούν να συμμετέχουν σε πλήθος αντιδράσεων λόγω της τάσης τους να κάνουν συζεύξεις με άλλα ηλεκτρόνια, δημιουργώντας είτε νέες ρίζες, είτε ουδέτερα μόρια (Cheeseman & Slater, 1993). Μπορούν να δημιουργηθούν ως προϊόντα ομολυτικών, ετερολυτικών ή οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, μέσα από φυσιολογικές διαδικασίες είτε λόγω εξωτερικών παραγόντων (W.Lim & A. Soter, 1993).

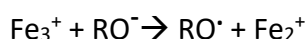
1.1.1 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται κυρίως με τους παρακάτω τρόπους (Klein , 2015)

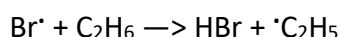
A. Ομολυτικές διασπάσεις:



B. Οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις με μεταφορά ηλεκτρονίου:



γ. Από την αντίδραση ριζών με άλλες οργανικές ενώσεις:



1.1.2 Δημιουργία ελευθέρων ριζών σε βιολογικά συστήματα

Στα βιολογικά συστήματα μπορεί να υπάρξει παραγωγή ελευθέρων ριζών, τόσο από φυσιολογικούς ενδογενείς μηχανισμούς, όσο και από εξωτερικούς δευτερογενείς παράγοντες (Σωτηρούδης , 2004).

1.1.2.1 Φυσιολογικοί ενδογενείς παράγοντες

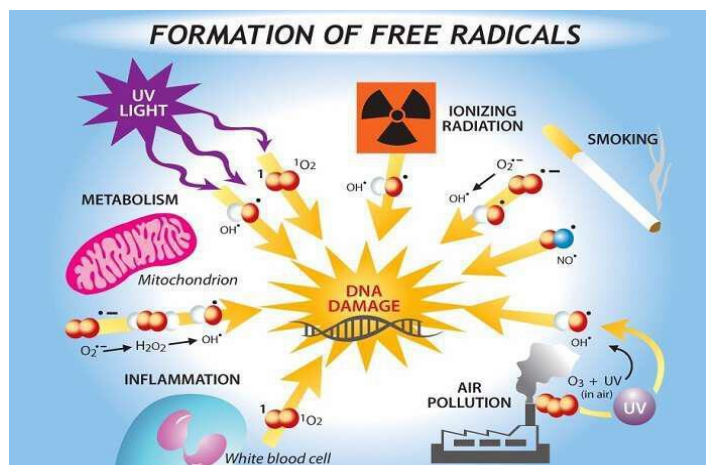
- a) Οξειδωτική φωσφορυλίωση κατά τη διαδικασία της αναπνοής. Κατά τη διαδικασία αυτή, ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από τα μόρια που μεταφέρουν

τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα και περνούν στο οξυγόνο, ανάγοντας το σε σουπεροξειδίο (Σωτηρούδης , 2004). Μερικά ένζυμα, που μεταφέρουν ένα ηλεκτρόνιο στο μοριακό οξυγόνο, είναι: NADH-οξειδάση, οξειδάση του CYT-P450, κυκλοξυγενάση και οξειδάση της ξανθίνης (Παπαγαλάνης, 2014).

- b) Φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως, οι λιποξυγονάσες, οι κυκλοοξυγονάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογονάσες κατά την οποία παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων.
- c) Χημικές αντιδράσεις αναγωγής μεταλλικών ιόντων. Ιόντα μετάλλων, όπως ο σίδηρος (Fe) και ο χαλκός (Cu), είναι ενζυμικοί συμπαράγοντες και όταν βρεθούν στην ελεύθερη μορφή τους μέσα στα βιολογικά συστήματα, μπορούν να προκαλέσουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων σε ευπαθή μακρομόρια, οδηγώντας σε καταστροφές βιομορίων (Barrera, 2012).
- d) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού αποτελούν πηγή ελευθέρων ριζών, καθώς παράγουν ρίζες προκειμένου να καταπολεμήσουν εξωγενείς παράγοντες, όπως βακτήρια (Knight , 2000).

1.1.2.2 Εξωγενείς Παράγοντες

Παράγοντες που βρίσκονται εκτός του οργανισμού μας, μπορούν να αποτελέσουν επίσης, σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών. (Σωτηρούδης , 2004). Τεράστια επίπεδα ελευθέρων ριζών παράγονται από έκθεση σε ρύπους, ή έκθεση σε εξωτοξίνες, όπως υδράργυρος και μόλυβδος (Adly, 2010), ενώ πολύ συχνή είναι και η παραγωγή τους από τη χρήση αντικαρκινικών και αναλγητικών φαρμάκων (Naito, Yoshikawa, Yoshida, & Kondo, 1998). Μεγάλες ποσότητες ελευθέρων ριζών παράγει, επίσης, η έκθεση σε ενδοτοξίνες (Adly, 2010). Αυτές μπορεί να προέρχονται από ραδιενέργεια και ηλεκτρομαγνητικά πεδία, αλκοόλ, κάπνισμα, εντομοκτόνα και φυσικά την κακή διατροφή (Elsayed, Omaye, Klain, & Korte Jr, 1992) (Jakubczyk, et al., 2020).



Εικόνα 1. Δημιουργία ελευθέρων ριζών από εξωγενείς παράγοντες

1.1.3 Μορφές ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μπορούν να δημιουργηθούν ως προϊόντα ομολυτικών, ετερολυτικών ή οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, παράγοντας είτε φορτισμένα είτε μη φορτισμένα είδη ριζών. Οι δύο πιο σημαντικές κατηγορίες είναι εκείνες που έχουν ως κεντρικό άτομο το οξυγόνο (ROS), και εκείνες με κεντρικό άτομο το άζωτο (RNS) (Hameister, Kaur, Thameem Dheen, Lohmann, & Singh, 2020).

1.1.3.1 Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS)

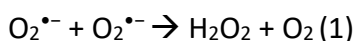
Όπως αναφέρει στο άρθρο του το 2014 ο Ν. Παπαγαλάνης, «ο όρος δραστικές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) είναι γενικός, και αφορά τα ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του οξυγόνου». Συνολικά όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ανήκουν σε αυτή την κατηγορία δραστικών ενώσεων. Για παράδειγμα, παρ'όλο που το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά, και ως εκ τούτου, μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Σωτηρούδης, 2004). Παρακάτω αναφέρονται οι σημαντικότερες δραστικές μορφές οξυγόνου.

A. Ρίζα του Σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$)

Σχηματίζεται κυρίως ως ενδιάμεσο σε διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις (Halliwell B. , 1995). Αν και πρόκειται για ανιόν, το οποίο είναι σχετικά αδιαπέραστο από τη μεμβράνη, σε σύγκριση με άλλες ελεύθερες ρίζες, έχει σχετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής, που επιτρέπει τη διάχυση του μέσα στο κύτταρο και, ως εκ τούτου, αυξάνει τον αριθμό των πιθανών στόχων. Ως οξειδοαναγωγικό δραστικό είδος, το σουπεροξειδίο μπορεί να μειώσει ορισμένα βιολογικά υλικά (π.χ. το κυτόχρωμα c) και να οξειδώσει άλλα όπως το ασκορβικό. (Powers & Jackson, 2008). Πρόκειται για μόριο το οποίο μπορεί να αλληλοεπιδρά περαιτέρω με άλλα μόρια, ώστε τελικά να παράγει "δευτερογενείς" ROS, είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω διαδικασιών που έχουν καταλυθεί από ένζυμα (Valko, et al., 2007).

B. Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂)

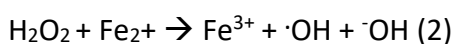
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το σουπεροξειδίο συμμετέχει σε αντιδράσεις που παράγουν δευτερογενείς ROS. Μία από αυτές είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου το οποίο δημιουργείται βάσει της παρακάτω αντίδρασης:



Εκτός από το σχηματισμό μέσω της αντίδρασης (1), μπορεί να παραχθεί και από άλλα ενζυμικά συστήματα. Πρόκειται για ένωση, που αν και κυτταροτοξική, θεωρείται ασθενής οξειδωτικός παράγοντας. Είναι σταθερή, διαπερατή στις μεμβράνες και έχει σχετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής εντός του κυττάρου. (Salvador, Sousa, & Pinto, 2001). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν μπορεί να οξειδώσει άμεσα το DNA ή τα λιπίδια, αλλά μπορεί να απενεργοποιήσει ορισμένα ένζυμα (Halliwell & Gutteridge, 2007). Αυτό που το καθιστά αρκετά σημαντικό είναι το γεγονός πως μπορεί εύκολα να δημιουργήσει ελεύθερες ρίζες (πχ ρίζα υδροξυλίου), σε συγκεκριμένες περιπτώσεις.

C. Ρίζα Υδροξυλίου (·OH)

Η αντίδραση παραγωγής της ρίζας υδροξυλίου, περιεγράφηκε πρώτη φορά από τον Fenton το 1984, [αντίδραση Fenton (2)] και αναγνωρίστηκε ως μία από τις πιο σημαντικές στην εξήγηση της οξειδωτικής βλάβης που εμφανίζεται στα βιολογικά περιβάλλοντα. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αφορά την συμμετοχή του υπεροξειδίου του υδρογόνου:



Οι ρίζες υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) είναι εξαιρετικά δραστικές με ισχυρό οξειδωτικό δυναμικό. Καταστρέφουν τα μόρια κοντά στη θέση παραγωγής τους και λόγω της υψηλής δραστηριότητάς τους, δεν είναι διαπερατά από τη μεμβράνη (Halliwell B. , 1995). Είναι δυνητικά τα πιο επιβλαβή ROS που υπάρχουν σε βιολογικά υλικά και η δραστηριότητά τους είναι τέτοια, που καθιστά αδύνατη την ύπαρξη τους ως αυτούσια μόρια σε ζωντανούς οργανισμούς, παρά μόνο μέσω των παραπροϊόντων των αντιδράσεων τους (Powers & Jackson, 2008).

D. Απλό Οξυγόνο (O_2)

Μια άλλη δραστική μορφή οξυγόνου, το απλό οξυγόνο, μπορεί επίσης να δημιουργηθεί σε ορισμένα βιολογικά υλικά. Το απλό οξυγόνο έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής, αλλά είναι ικανό να διαχέεται και να διαπερνά στις μεμβράνες. Πρόκειται για μια ηλεκτρονικά διεγερμένη μορφή οξυγόνου και δεν αποτελεί ρίζα, αφού κανένα ηλεκτρόνιο δεν είναι ασύζευκτο. Το απλό οξυγόνο μπορεί να υπάρξει σε δύο καταστάσεις, την πρώτη διεγερμένη και τη δεύτερη διεγερμένη, με την τελευταία να είναι πιο δραστική (Halliwell B. , 1995). Σχηματισμός απλού οξυγόνου στα βιολογικά συστήματα, μπορεί να δημιουργηθεί από την παραμόρφωση του ανιόντος υπεροξειδίου στο νερό (Powers & Jackson, 2008). Ακολουθεί συνοπτικός πίνακας με όλες τις δραστικές μορφές οξυγόνου:

Πίνακας 1. Δραστικές μορφές Οξυγόνου

Δραστικές μορφές οξυγόνου	Συμβολισμός
Ρίζα Υδροξυλίου (Hydroxyl Radical)	$\cdot\text{OH}$
Μονήρες Οξυγόνο (Singlet Oxygen)	O_2
Ρίζα Σουπεροξειδίου (Superoxide Radical)	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Ρίζα Αλκοξυλίου (Alkoxy Radical)	$\text{RO}\cdot$
Ρίζα Περοξυλίου (Peroxy Radical)	$\text{ROO}\cdot$
Όζον (Ozone)	O_3
Υπεροξείδιο του Υδρογόνου (Hydrogen Peroxide)	H_2O_2
Υδρουπεροξείδιο (Hydroperoxide)	ROOH

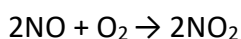
1.1.3.2 Δραστικές μορφές Αζώτου (Reactive Nitrogen Species-RNS)

A. Μονοξείδιο του Αζώτου ($\text{NO}\cdot$)

Το μονοξείδιο του αζώτου είναι ένα αέριο που παρουσιάζει ποικίλες βιολογικές δραστηριότητες και παράγεται από την L-αργινίνη και την L-κιτρουλίνη (Robbins & Grisham , June 1997). Η σύνθεση λαμβάνει χώρα μέσω συνθασών μονοξειδίου του αζώτου (NOS) τριών κύριων τύπων: νευρωνικό NOS (NOS1), ενδοθηλιακό NOS (NOS3) και επαγωγίμο NOS (NOS2), με το τελευταίο να εντοπίζεται κυρίως σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Η μετατροπή μέσω των παραπάνω συνθασών, γίνεται χρησιμοποιώντας NADPH. Οι κύριες δράσεις του στα κύτταρα σχετίζονται με την ικανότητά του να συνδέεται με το ιόν σιδήρου, γεγονός που οδηγεί τελικά στην αδρανοποίηση και απομάκρυνσή του, μέσω δέσμευσης με αιμοσφαιρίνη. Πρόκειται για έναν ασθενής αναγωγικό παράγοντα, ο οποίος αντιδρώντας με το οξυγόνο, σχηματίζει διοξείδιο του αζώτου, ενώ αντιδρώντας με το υπεροξείδιο (πολύ γρήγορα), παράγει υπεροξυνιτρώδη. (Powers & Jackson, 2008).

B. Διοξείδιο του Αζώτου (NO₂)

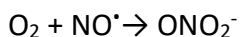
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αντίδραση του οξυγόνου με το μονοξείδιο του αζώτου παράγει το διοξείδιο του αζώτου, βάσει της παρακάτω αντίδρασης (Πνευματικάκης, Μητσοπούλου, & Μεθενίτης, 2006):



Πρόκειται για ένα ισχυρό οξειδωτικό το οποίο εισέρχεται κυρίως στον αέρα από την καύση καυσίμων, κάτι που το καθιστά πολύ επιβλαβές στα βιολογικά συστήματα και δει στον άνθρωπο, ο οποίος το εισπνέει σε καθημερινή βάση (EPA, 2021).

C. Υπεροξυνιτρώδη (NO₃⁻)

Η αντίδραση του υπεροξειδίου με το NO για την παραγωγή υπεροξυνιτρώδους άλατος, όπως αναφέρθηκε, γίνεται πάρα πολύ γρήγορα(τρεις φορές ταχύτερα από τη μετάλλαξη του υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου), βάσει της παρακάτω αντίδρασης:



Το υπεροξυνιτρώδες (ή η πρωτονιωμένη μορφή του ONOOH) είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας και μπορεί να οδηγήσει σε εξάντληση των ομάδων θειόλης, βλάβη στο DNA και σε νίτρωση των πρωτεϊνών. Ένα περαιτέρω αποτέλεσμα του

σηματισμού υπεροξυνιτρώδους, είναι η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα υπεροξειδίου και NO. Ακολουθεί συνοπτικός πίνακας με όλες τις δραστικές μορφές αζώτου.

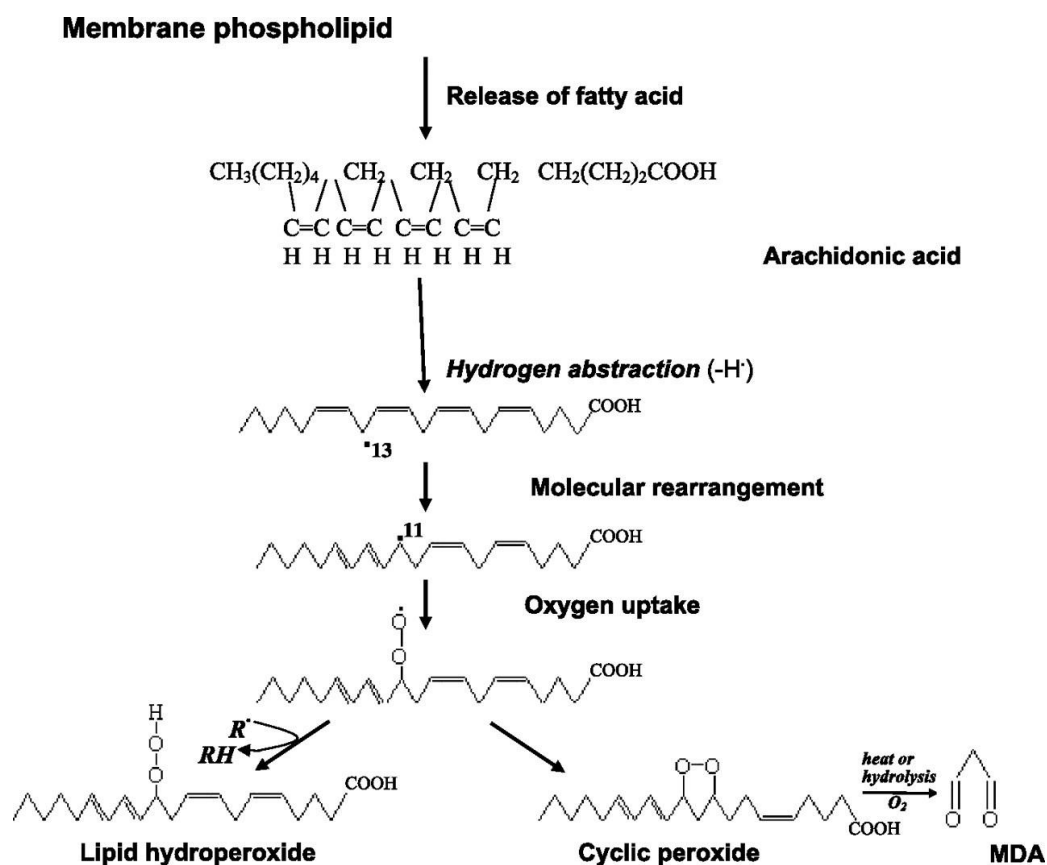
Πίνακας 2. Δραστικές μορφές Αζώτου

Δραστικές μορφές αζώτου	Συμβολισμός
Μονοξείδιο του Αζώτου (Nitric Oxide)	NO [·]
Διοξείδιο του Αζώτου (Nitric Dioxide)	NO ₂
Περοξυνιτρίτης (Peroxyinitrite)	ON ₂ [·]
Περοξυνιτρώδες Οξύ (Peroxyinitrous Acid)	ONOOH

1.1.3.3. Δευτερογενή είδη ριζών

Δεδομένου ότι οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να ξεκινήσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις ριζών, σε ορισμένα βιολογικά μόρια, μια σειρά από άλλα είδη ελεύθερων ριζών εμφανίζονται στα κύτταρα ως μέρος αυτών των διεργασιών. Ένα πρωταρχικό παράδειγμα αυτών των δευτερογενών ριζικών ειδών είναι οι ενδιάμεσες ρίζες που σχηματίζονται, κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Το γεγονός αυτό είναι απόλυτα λογικό, εάν σκεφτεί κανείς ότι οι βιολογικές μεμβράνες έχουν σαν βασική δομή τη λιπιδική διπλοστιβάδα, η οποία αποτελείται κατά βάση από λιπίδια και πρωτεΐνες (Halliwell & Chirico, May 1993).

Παρακάτω παρουσιάζεται η σειρά αντιδράσεων του μεταβολισμού της μηλονοδιαλδεΐδης (MDA) η οποία αποτελεί τον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη εκτίμησης της υπεροξειδωσης των βιολογικών υλικών (Yin, Xu, & Porter, 2011). Προκύπτει ως προϊόν υπεροξειδωσης λιπιδίων στη διατροφή και στους ιστούς. Αντιδρά με λειτουργικές ομάδες βάσεων νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων και έχει φανεί πως εμφανίζει μεταλλαξιγόνο δράση στα βακτήρια, ενώ παράλληλα προκαλεί καρκινογένεση του δέρματος και του ήπατος σε ζώα (Draper, McGirr, & Hadley, 1986).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των Halliwell & Gutteridge: Λιπιδική υπεροξειδωση του αραχιδονικού οξέος προς μηλονοδιαλδεΐδη.

1.2 Οξειδωτικό stress

Όπως όρισε ο Helmut Sies στο βιβλίο του «What is Oxidative Stress» το 1985, ως οξειδωτικό stress, θεωρούμε «την ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων, προς όφελος των οξειδωτικών». Ο λόγος που αναφερόμαστε σε αυτή την ανισορροπία και όχι στην καθαυτή ύπαρξη οξειδωτικών παραγόντων, είναι διότι, σε συγκεκριμένες συνθήκες και συγκεντρώσεις, αυτοί οι οξειδωτικοί παράγοντες είναι κάθε άλλο παρά επιβλαβείς.

1.2.1 Το οξειδωτικό stress ως φυσιολογικός βιοδείκτης

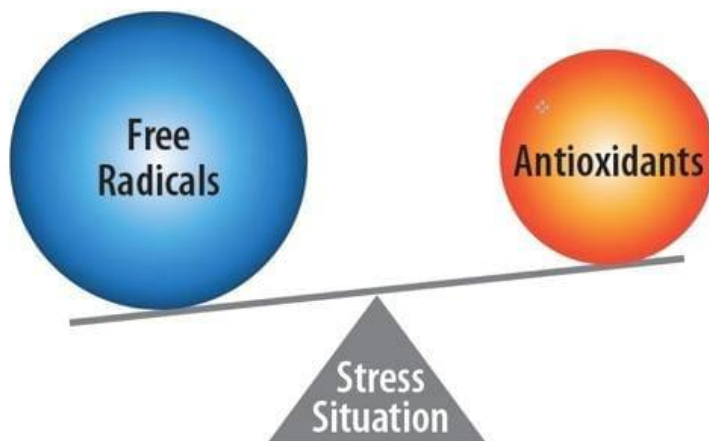
Το οξειδωτικό stress παίζει χρήσιμο ρόλο στη φυσιολογική προσαρμογή και στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής επικοινωνίας. Τροποποιεί τους αγγελιοφόρους που ρυθμίζουν τις βασικές λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίες είναι ζωτικής σημασίας για επιβίωση. Για παράδειγμα προκαλώντας απόπτωση προετοιμάζει το κανάλι διανομής σήματος. Επηρεάζει την ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση, που οδηγεί στην

ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών, συμπεριλαμβανομένης μιας σειράς υποδοχέων κινασών τυροσίνης, και ως εκ τούτου προκαλεί διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις (ενεργοποίηση, πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση). Επίσης, βιολογικοί αμυντικοί μηχανισμοί ενισχύονται από το οξειδωτικό στρες, κατά τη διάρκεια κατάλληλης σωματικής άσκησης και ισχαιμίας (Yoshikawa & Naito, 2002).

1.2.2 Οξειδωτικό stress και παθογένεση

Παρ'όλο, που όπως προείπαμε, το οξειδωτικό stress συμμετέχει και σε φυσιολογικές διεργασίες, είναι γνωστό ότι εμπλέκεται σημαντικά στην παθογένεση ασθενειών, που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής, και αυτό αποτελεί και τον βασικό λόγο που μελετάται τόσο έντονα από την επιστημονική κοινότητα (Yoshikawa & Naito, 2002). Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται στις παρακάτω περιπτώσεις:

- ύπαρξη κυτταροτοξικών ουσιών, που κατά τον μεταβολισμό τους και παράγουν ROS/RNS,
- υπερβολική ενεργοποίηση των συστημάτων παραγωγής ROS/RNS,
- σχετική ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών παραγόντων.



Εικόνα 3. Κατάσταση οξειδωτικού stress.

Το γεγονός, που το καθιστά επιβλαβές, σχετίζεται με επίθεση των ελευθέρων ριζών σε βιολογικά μόρια όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA (Halliwell B. , 1996).

1.2.2.1 Οξειδωτική βλάβη λιπιδίων

Τα λιπίδια, είναι ένας από τους κύριους στόχους των ROS, καθώς αποτελούν τα σημαντικότερα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων μπορεί να περιγραφεί γενικά ως μια διαδικασία κατά την οποία τα οξειδωτικά, επιτίθενται σε λιπίδια που περιέχουν διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα [ειδικά σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs)], αφαιρώντας ένα υδρογόνο και εισάγοντας οξυγόνο, σε λιπιδικές υπεροξυλικές ρίζες (LOO•) και υδροϋπεροξειδία (LOOH) (Ayala, Muñoz, & Argüelles, 2014). Τα LOOH μπορούν στη συνέχεια να διασπαστούν σε αλδεΐδες, οι οποίες αποτελούν και τα τελικά προϊόντα της υπεροξειδωσης λιπιδίων. (Yin, Xu, & Porter, 2011). Η πιο σημαντική είναι η μηλονική διαλδεΐδη (MDA) την οποία αναφέραμε και παραπάνω.

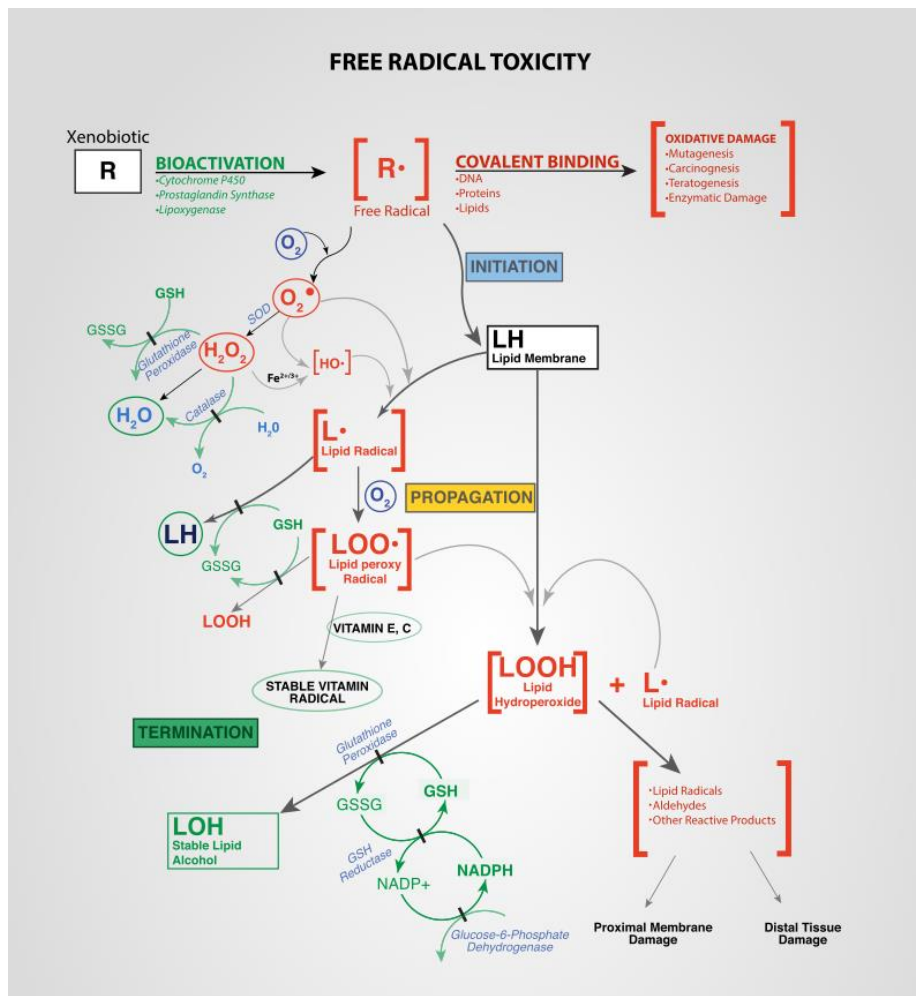
1.2.2.2 Οξειδωτική βλάβη πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες, όπως είναι γνωστό, αποτελούνται από αμινοξέα. Οι πλευρικές ομάδες όλων των αμινοξέων, ιδιαίτερα της μεθειονίνης και της κυστεΐνης, είναι ευαίσθητες στην οξείδωση από τη δράση των ROS/RNS (Stadtman, 2004). Αποτέλεσμα της οξείδωσής τους είναι η δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων, που συχνά χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες (Dalle-Donne, Rossi, Giustarini, Miltzani, & Colombo, 2003). Γενικά, οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσοσώματα. Τα καρβονύλια μεγάλου μοριακού βάρους, όμως, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα (Levine, 2002).

1.2.2.3 Οξειδωτική βλάβη νουκλεϊκών οξέων

Το DNA είναι κατά κανόνα ένα σταθερό μόριο αλλά οι ROS μπορούν, υπό συνθήκες, να προκαλέσουν την οξειδωτική καταστροφή του. Οι βλάβες, που συνήθως προκαλούνται, είναι τροποποιήσεις στις βάσεις του, θραύσεις στις έλικές του, βλάβες στις πουρίνες, στην εξόζη και στο σύστημα επιδιόρθωσής του (Radak, et al., 1996) Όλα τα αυτά, συνδυαστικά με την υδρόλυση και τη μεθυλίωση, συνεισφέρουν σημαντικά στην αστάθεια και φθορά του γονιδιώματος και, τελικά, στην μεταλλαξιγένεση. Η αυθόρμητη μεταλλαξιγένεση υπό αερόβιες συνθήκες, είναι μεγαλύτερη από ότι υπό

αναερόβιες συνθήκες. Εκτός του DNA, μπορεί και το RNA να υποστεί οξείδωση, με επιπτώσεις που οδηγούν σε ασθένειες (Sies, Berndt, & Jones, 2017).



Εικόνα 4. Μονοπάτια τοξικότητας ελευθέρων ριζών.

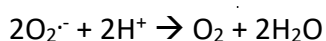
1.3 Αντιοξειδωτικά

Ο όρος «αντιοξειδωτικό» αναφέρεται σε οποιοδήποτε μόριο ικανό να σταθεροποιεί ή να απενεργοποιεί τις ελεύθερες ρίζες, πριν προλάβουν να επιτεθούν στα κύτταρα. Οι άνθρωποι έχουν αναπτύξει εξαιρετικά πολύπλοκα αντιοξειδωτικά συστήματα, τα οποία λειτουργούν σε συνδυασμό μεταξύ τους για να προστατεύουν τα κύτταρα και τα συστήματα οργάνων του σώματος από τις επικείμενες βλάβες των ελευθέρων ριζών (Rahman, 2007). Ένα ιδανικό αντιοξειδωτικό θα πρέπει να απορροφάται εύκολα, να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες και να μετατρέπει τα μέταλλα οξειδοαναγωγής σε χηλικά,, σε σχετικά φυσιολογικά επίπεδα. Θα πρέπει επίσης να λειτουργεί τόσο σε

υδατικές όσο και σε μεμβρανικές περιοχές και να επηρεάζει την έκφραση γονιδίων με θετικό τρόπο (Núñez de Castro, Pérez-Gómez, & Matés, 1999). Τα αντιοξειδωτικά, ανάλογα με την προέλευση τους, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα *ενδογενή* (ενυπάρχουν φυσιολογικά στον οργανισμό) και τα *εξωγενή* (προσλαμβάνονται από την τροφή). Ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους χωρίζονται στα: *ενζυμικά, μη ενζυμικά* και *μικρού μοριακού βάρους μόρια χωρίς ενζυμική δράση*. (Lobo V, A Patil, A Phatak, & N Chandra, 2010) (Nimse & Pal, 2015). Ακολουθεί ανάλυση των παραπάνω κατηγοριοποιήσεων.

1.3.1 Ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά

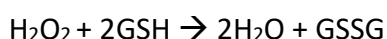
- Υπεροξειδική δισμουτάση: Επιδρά και ελαττώνει τον χρόνο ημίσειας ζωής των δραστικών ριζών οξυγόνου ενισχύοντας έτσι την αναζωογόνηση και την κυτταρική αναδόμηση (Manal, Abdylkareem , & Abeer, 2019). Καταλύει την παρακάτω αντίδραση:



- Καταλάση: Είναι ένα ένζυμο υπεύθυνο για την αποδόμηση του H_2O_2 , που παράγεται από οξειδάσες που εμπλέκονται στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, στην αναπνοή και στον καταβολισμό πουρίνης (Krishnamurthy & Wadhvani, 2012). Ενεργοποιείται όταν υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 2015), καταλύοντας την παρακάτω αντίδραση:



- Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης: Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια των κυττάρων (Van Kuijk et al., 1987). Μειώνει τα οργανικά υπεροξείδια, που απελευθερώνονται από τη δράση φωσφολιπασών καθώς και το H_2O_2 (Esworthy, Ho, & Chu, 1997). Σε αντίθεση με την καταλάση, η GPx ενεργοποιείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, 2007), δίνοντας την παρακάτω αντίδραση:



1.3.2 Ενδογενή μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

- Γλουταθειόνη: Η γλουταθειόνη είναι ενδογενές αντιοξειδωτικό, αλλά λειτουργεί ως μη ενζυματικό, δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες στα κύτταρα. Πρόκειται για ένα

τριπεπτίδιο, το οποίο υπάρχει σε τεράστια αφθονία ενδοκυτταρικά (πυρήνα, κυτταρόπλασμα, μιτοχόνδρια). Είναι κυρίως παρούσα στην ανηγμένη της μορφή και χρησιμεύει ως συμπαράγοντας για πολλά ένζυμα, όπως το GPx, αναγωγή γλουταθειόνης (GR) και τη μεταφορά γλουταθειόνης (GST) (Masella, Di Benedetto, Vari, Filesi, & Giovannini, 2005) (Sun, 2010).

- Τρανσφερίνη - Φερριτίνη: Η τρανσφερίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που συντίθεται στο ήπαρ, ενώ η φερριτίνη είναι η πιο σημαντική πρωτεΐνη ενδοκυτταρικά (Arosio & Harrison, 1996). Ο σίδηρος λειτουργεί ως συνένζυμο οξειδωτικών αντιδράσεων (αντιδράσεις Fenton) με αποτέλεσμα, σε ελεύθερη κατάσταση, να προάγει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Τόσο η τρανσφερίνη, όσο και η φερριτίνη συγκρατούν σφιχτά άτομα τρισθενούς σιδήρου, λειτουργώντας έτσι ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες.
- Σερουλοπλασμίνη. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται πρωτίστως στη δέσμευση χαλκού στο ήπαρ, καθώς επίσης και στο μεταβολισμό του σιδήρου. Ο χαλκός συμμετέχει, όπως και ο σίδηρος, ως οξειδωτικό μέσο σε πληθώρα αντιδράσεων (Gutteridge, 1978) (Roeser, Lee, Nacht, & Cartwright, 1970).
- Αλβουμίνη: Είναι η πλέον διαδεδομένη πρωτεΐνη στο πλάσμα και κατέχει σημαντική θέση μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενώσεων. Ο χαλκός όταν εισέρχεται στο σώμα, είναι δεσμευμένος με αλβουμίνη και συγκεκριμένα την λευκωματίνη, και μέσω αυτής μεταφέρεται στο ήπαρ. Η γενική χρησιμότητα των αλβουμινών είναι, πως προμηθεύουν σχεδόν όλο το σύνολο των θειολοενώσεων στο πλάσμα του αίματος (Hurst, Bao, & Williamson, 1999) (Halliwell B., 1988).
- Ουρικό οξύ: Πρόκειται για έναν ισχυρό δεσμευτή ελευθέρων ριζών, ο οποίος εκτιμάται, ότι είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση του 60% των ελευθέρων ριζών στο πλάσμα (Ames, Cathcart, Schwiers, & Hochstein, 1981).

1.3.3 Εξωγενή μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά και μόρια μικρού μοριακού βάρους

- Βιταμίνη E: Ένα από τα κύρια λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά. Λειτουργεί ως το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό που συνδέεται με τη μεμβράνη, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες και αποτρέποντας την οξείδωση των λιπιδίων μέσα στις μεμβράνες (Arredondo M., 2016).

- Βιταμίνη C: Υδατοδιαλυτή βιταμίνη και ίσως το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό. Μπορεί να προστατεύσει τις βιομεμβράνες από τον τραυματισμό της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, μέσω της εξάλειψης των ριζών υπεροξυλίου στην υδατική φάση, πριν την έναρξη της υπεροξειδωσής (Manal, Abdylkareem , & Abeer, 2019).
- Βιταμίνη A: Η βιταμίνη A για την προστασία πολλών χρόνιων ασθενειών όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος (Palacea, Kharera , Qina, & Singala, 1999). Η μητρική της ένωση και η πιο άφθονη διατροφική μορφή βιταμίνης A είναι η τρανσρετινόλη, η μητρική ένωση, είναι η πιο άφθονη διατροφική μορφή βιταμίνης A, ενώ ο αμφιβληστροειδής και το ρετινοϊκό οξύ είναι τα δευτερεύοντα φυσικά διατροφικά συστατικά της βιταμίνης A (Arredondo M. , 2016).
- Καροτενοειδή: Τα καροτενοειδή είναι δομικά και λειτουργικά διαφορετικές φυσικές χρωστικές, που βρίσκονται σε πολλά φρούτα και λαχανικά. Συνδιαστικά με τις τοκοφερόλες στη λιπιδική φάση των βιολογικών μεμβρανών, έχουν μεγάλη ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών (Rahman, Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors, 2007).
- Λιποϊκό οξύ: Το λιποϊκό οξύ είναι ένα λιπαρό οξύ βραχείας αλυσίδας, που αποτελείται από θείο, στοιχείο που είναι γνωστό για τη συμβολή του στην αντίδραση που καταλύει την οξειδωσής των α-κετοοξέων (El Barky , Hussein, & Mohamed, 2017).
- Φυτικές πολυφαινόλες: Είναι μια ευρεία κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Αποτελούν τα ενεργά συστατικά που υπάρχουν σε πολλά φαρμακευτικά φυτά και ρυθμίζουν τη δραστηριότητα πολλών ενζύμων και κυτταρικών υποδοχέων (Middleton Jr, Kandaswami, & Theoharides, 2000). Πρόκειται για ενώσεις που περιέχουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, στους οποίους συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες και περιλαμβάνουν τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή, τις τανίνες και τα λιγότερο κοινά στιλβένια και λιγνάνες. Τα φλαβονοειδή είναι οι πιο άφθονες πολυφαινόλες στη διατροφή μας (Dai & Mumper, 2010).

1.3.4 Μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί, που στοχεύουν στα συστήματα που αναλύθηκαν παραπάνω, και στόχο έχουν την προστασία του εκάστοτε οργανισμού και την εύρυθμη

λειτουργία του βιολογικού περιβάλλοντος. Σε αυτούς τους μηχανισμούς, μεταξύ των άλλων ανήκουν τα παρακάτω:

1.3.4.1 Ενεργοποίηση/Απενεργοποίηση ενζύμων

Σε αυτή την κατηγορία, περιλαμβάνεται η δέσμευση των ελευθέρων ριζών μέσω της δράσης καταλυτικών ενζύμων. Κάποια από αυτά τα ένζυμα, όπως και ο μηχανισμός δράσης τους, αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 1.3.1 . Βασική λειτουργία των ενζύμων αυτών είναι, να δεσμεύουν δραστικές μορφές οξυγόνου και να τις μετατρέπουν σε μορφές λιγότερο δραστικές (πχ νερό).

1.3.4.2 Χηλική δέσμευση μεταβατικών μετάλλων

Κάποια τρόφιμα περιέχουν ποσότητες μεταβατικών μετάλλων, όπως είναι ο σίδηρος ή ο χαλκός, τα οποία αυξάνουν τον ρυθμό της λιπιδικής οξειδωσης, μέσω μείωσης της ενέργειας ενεργοποίησης του σταδίου έναρξης της αυτοοξειδωσης. Αντιδρούν κατευθείαν με τα λιπίδια και παράγουν ρίζες αλκυλίων, όπως επίσης και δραστικά είδη οξυγόνου που επιταχύνουν την αντίδραση διάσπασης των υδροϋπεροξειδίων (Choe & Min, 2006). Τα μέταλλα αυτά, συνεπώς, δρουν ως προοξειδωτικά, και η χηλική δέσμευσή τους συντελεί στη μείωση της προοξειδωτικής τους δράσης.

1.3.4.3 Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης

Όπως αναλύθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, οι ρίζες στοχεύουν πολύ τις βιολογικές μεμβράνες, οι οποίες αποτελούνται, κατά κύριο λόγο, από λιπίδια. Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι μία αλληλουχία οξειδωτικών διεργασιών που ξεκινάει από οξειδωτικές τροποποιήσεις που υφίστανται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα από ελεύθερες ρίζες (Παπαγεωργίου, 2005). Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να καθυστερήσουν την οξειδωση των λιπιδίων μέσω ανταγωνιστικής δέσμευσης οξυγόνου, επιβράδυνσης του σταδίου έναρξης, παρεμπόδιση του σταδίου διάδοσης και σταθεροποίηση των υδροϋπεροξειδίων (Basu, Temple, & Garg, 1999). Υπάρχουν διαιτητικά στοιχεία όπως το σελήνιο, το γερμάνιο και άλλα, τα οποία έχουν αντιοξειδωτική δράση και συμμετέχουν στην επιδιόρθωση αυτής της οξειδωτικής καταστροφής (Ρέρη, 2010).

1.3.4.4 Εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών

Ορισμένες ενώσεις ανάγουν τις ελεύθερες ρίζες προσφέροντας ένα ηλεκτρόνιο. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν πολλά φυτοχημικά (βιταμίνες, φλαβονοειδή, τοκοφερόλες κ.α.), με κάποια από τα οποία θα ασχοληθούμε στη συνέχεια με περισσότερη λεπτομέρεια. Αυτή αντίδραση οδηγεί στο σχηματισμό περισσότερο ή λιγότερο σταθερών τελικών προϊόντων, αποτρέποντας έτσι την οξειδωτική βλάβη (Kochlar & Russell, 1999).

2. Γήρανση δέρματος και αντιοξειδωτικά

2.1 Γήρανση του δέρματος

Η γήρανση είναι μια πολύπλοκη βιολογική διαδικασία, καθώς προκαλεί προοδευτική επιδείνωση των ανατομικών δομών και των φυσιολογικών λειτουργιών των οργάνων (Lephart, 2016). Η γήρανση του δέρματος είναι μόνο ένα ορατό μέρος αυτής της διαδικασίας (Serror, et al., 2020). Με τη γήρανση, το δέρμα χάνει κάποιες από τις ιδιότητές του, όπως η ελαστικότητα, το πάχος και το χρώμα, γεγονότα που προκύπτουν από την αλλοίωση των βιομηχανικών ιδιοτήτων των δερματικών κυττάρων και κυρίως, των δερματικών ινοβλαστών (Friedman, 2005).

2.2 Παράγοντες που εμπλέκονται στη γήρανση του δέρματος

Ο φυσιολογικός κυτταρικός οξειδωτικός μεταβολισμός, μπορεί να δημιουργήσει διαφορετικά παραπροϊόντα υπεύθυνα για μοριακή βλάβη, συμβάλλοντας έτσι στη γήρανση του δέρματος, η οποία, υπό αυτές τις συνθήκες, ονομάζεται *εγγενής*. Στην *εγγενή γήρανση*, παρατηρείται μειωμένη σύνθεση κολλαγόνου και ελαστίνης, λόγω της μειωμένης πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας των δερματικών κυττάρων (Edwin D., 2018) (Lephart, 2016).

Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι έως και το 80-90% της γήρανσης του δέρματος οφείλεται σε περιβαλλοντικούς και ξενοβιοτικούς παράγοντες (Lephart, 2016). Μεταξύ αυτών των εξωτερικών παραγόντων, αξίζει να αναφερθούν οι ρύποι του αέρα και του νερού, ο καπνός του τσιγάρου, οι διάφοροι οργανικοί διαλύτες, πολλά φάρμακα (όπως η μπλεομυκίνη και η γενταμυκίνη), τα υπολείμματα κουζίνας (δηλαδή χρησιμοποιημένο λάδι και λίπος) και βαρέα ή μεταβατικά μέταλλα (όπως ο μόλυβδος, κάδμιο, υδράργυρο και σίδηρο) (Petruk, Del Giudice, Rigano, & Monti, 2018).

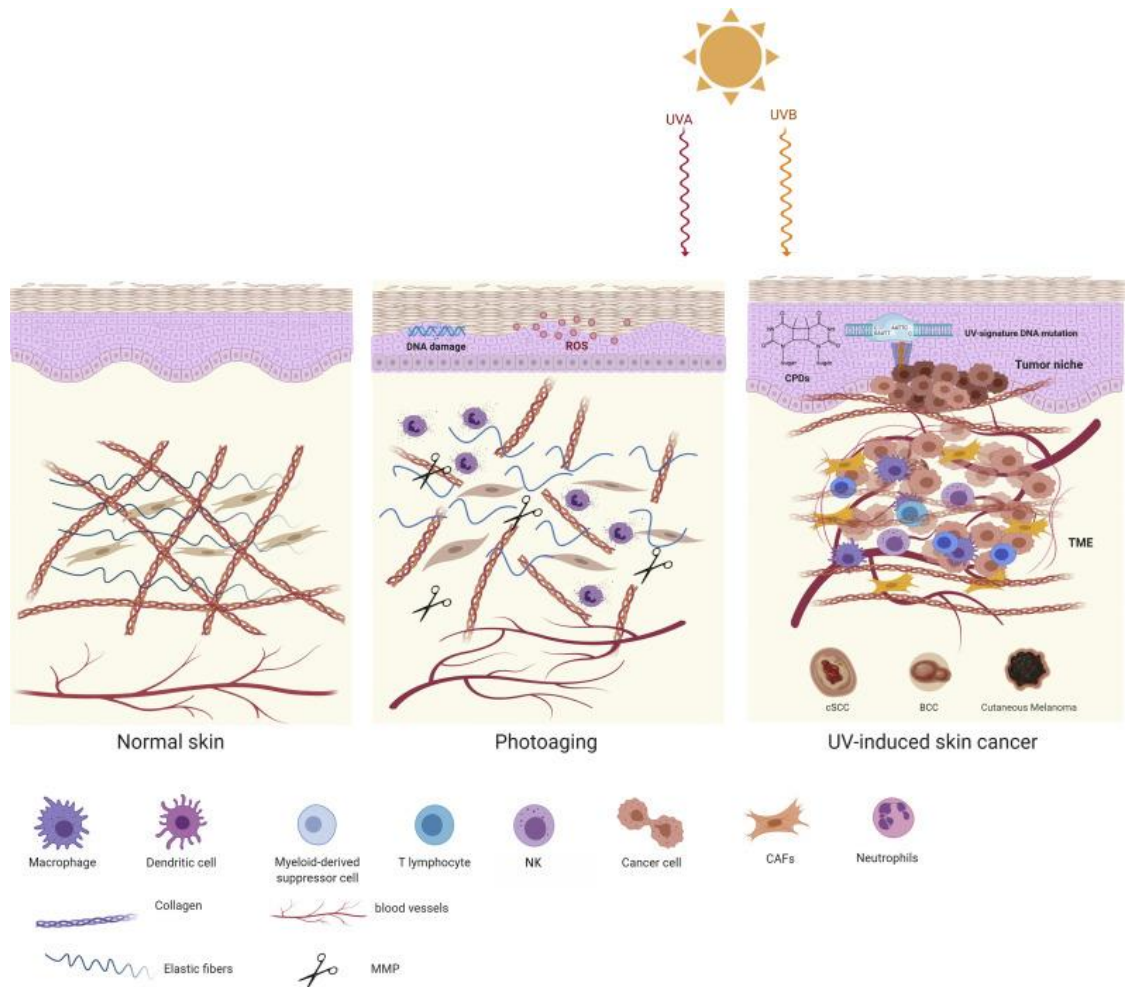
Πολύ σημαντική επιρροή στο δέρμα δείχνει να έχει, εκ των παραπάνω, η **ατμοσφαιρική ρύπανση**, στην οποία συμπεριλαμβάνονται οι βιολογικοί και αέριοι ρύποι, όπως επίσης και κάποια μικροσωματίδια. Έχει αναφερθεί ότι η ρύπανση ασκεί επιβλαβείς επιπτώσεις στο δέρμα με τους παρακάτω 4 τρόπους (Mancebo & Wang, 2015):

- A. Διείσδυση μικροσωματιδίων στους ιστούς και εναποθέτησή τους στα μιτοχόνδρια, όπου προκαλούν τη δημιουργία ROS (Cho, Park, & Kim, 2016).
- B. Ενεργοποίηση φλεγμονώδους καταρράκτη στα κερατινοκύτταρα από τα μικροσωματίδια καυσαερίων (κυρίως βενζίνης) (Hiroko , Nohara, & Fujimaki, 1999).
- C. Ενεργοποίηση του υποδοχέα υδρογονάνθρακα αρυλίου (AhR), ενός μεταγραφικού παράγοντα ενεργοποιημένου από κυτταροζολικό συνδέτη που ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη φλεγμονή και τη μελανογένεση (Agostinis, Garmynand, & Laethem, 2007).
- D. Μεταλλαγή μικροχλωρίδας του δέρματος (Petruk, Del Giudice, Manuela Rigano, & Monti, 2018).

Όσον αφορά στο **κάπνισμα**, είναι γνωστό και επιστημονικά τεκμηριωμένο, πως πρόκειται για την πιο αποτρέψιμη αιτία νοσηρότητας τα τελευταία χρόνια, με περισσότερους από τρία εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως, να προέρχονται από αυτό. (Sasco, Secretan, & Straif, 2004). Εκτός από την ισχυρή συσχέτιση με μια σειρά ασθενειών, το κάπνισμα σχετίζεται επίσης και με πολλές δερματολογικές παθήσεις, όπως η κακή επούλωση τραυμάτων, η πρόωρη γήρανση του δέρματος, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, το μελάνωμα, ο καρκίνος του στόματος, η ακμή, η ψωρίαση και η τριχόπτωση. Σε επίπεδο δέρματος, έχει διαπιστωθεί εδώ και καιρό, ότι το κάπνισμα έχει επιβλαβείς επιπτώσεις και επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι προκαλεί πρόωρη γήρανση. Μελέτες *in vitro* υποδεικνύουν ότι το εκχύλισμα καπνού τσιγάρου μειώνει την παραγωγή κολλαγόνου και αυξάνει την παραγωγή τροποελαστίνης και μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας (MMP), οι οποίες αποδομούν τις πρωτεΐνες της μήτρας και προκαλούν ανώμαλη παραγωγή ελαστικού υλικού. Το κάπνισμα αυξάνει τα επίπεδα MMP, γεγονός που οδηγεί στην αποικοδόμηση του κολλαγόνου, των ελαστικών ινών και των πρωτεογλυκανών, υποδηλώνοντας μια ανισορροπία μεταξύ βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης στον μεταβολισμό του δερματικού συνδετικού ιστού. Ο καπνός του

τσιγάρου εμπλέκεται και στην πρόωρη γήρανση του δέρματος λόγω των ενεργών ριζών που παράγει. Οι σαρωτές των ενεργών μορφών οξυγόνου έχει φανεί πως προκαλούν επαγωγή της MMP (Morita, 2007).

Σήμερα, η **ηλιακή ακτινοβολία** είναι, ίσως, ο πιο επιβλαβής εξωγενής παράγοντας, που μπορεί να προκαλέσει σχηματισμό ROS και να επιδράσει στο δέρμα. Το φάσμα του ηλιακού φωτός περιλαμβάνει την υπέρυθη ακτινοβολία (πάνω από 760 nm), το φάσμα του ορατού (400-760 nm) και την υπεριώδη ακτινοβολία (UV) (κάτω από 400 nm) (Brennan & Fedor, 1988). Η υπεριώδης ακτινοβολία UV, βάσει μήκους κύματος, αποτελείται από τις UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) και UVC (190-280 nm) ζώνες. Οι δύο ακτινοβολίες μακρού κύματος (UVA,UVB) διεισδύουν μέσα από το παχύ στρώμα του όζοντος και φτάνουν στη βιόσφαιρα. Οι εξαιρετικά επιβλαβείς ακτίνες UVC μπλοκάρονται από το στρώμα του όζοντος της στρατόσφαιρας και, ως εκ τούτου, δεν φτάνουν στην επιφάνεια της Γης (Dunaway, et al., 2018). Η UVA, που περιλαμβάνει περίπου το 95% της ηλιακής χερσαίας υπεριώδους ακτινοβολίας, διεισδύει βαθιά στο δερματικό στρώμα και φτάνει ακόμη και στο υποδόριο στρώμα του δέρματος (Wang, Charareh, Lei, & Zhong, 2019). Προκαλεί οξειδωτική βλάβη, αφού παράγει απλό οξυγόνο, με έναν έμμεσο μηχανισμό που περιλαμβάνει αντιδράσεις φωτοευαισθητοποίησης με εσωτερικά χρωμοφόρα, όπως η ριβοφλαβίνη και η πορφυρίνη. Επιπλέον παράγει και ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου μέσω της ενεργοποίησης της οξειδάσης NADPH (Dunaway, et al., 2018). Η UVA ακτινοβολία έχει θεωρηθεί η κύρια αιτία των εμφανών αλλαγών στη δερματική εξωκυτταρική μήτρα (ECM) του φωτογηρασμένου δέρματος. Η UVB, η οποία αντιπροσωπεύει περίπου το 5% της υπεριώδους ακτινοβολίας της γης, μπορεί να φτάσει μέχρι την επιδερμίδα, καθώς και στο άνω χόριο προκαλώντας δερματικές αλλαγές (Runger & Takeuchi, 2013). Διεγείρει την παραγωγή ριζών ανιόντων υπεροξειδίου μέσω της ενεργοποίησης της οξειδάσης NADPH και των αναπνευστικών αλυσιδωτών αντιδράσεων (Masaki, Okano, & Sakurai, 1999). Οι διαφορετικές βιολογικές επιδράσεις των UVA και UVB σχετίζονται με τον τύπο των βιομορίων με τα οποία αλληλεπιδρούν (Wang, Charareh, Lei, & Zhong, 2019).



Εικόνα 5. Απεικόνιση των αλλαγών της μορφολογίας του δέρματος μετά από έκθεση σε UV (γήρανση-καρκίνος).

2.3 Φυσικά αντιοξειδωτικά και Κοσμητολογία

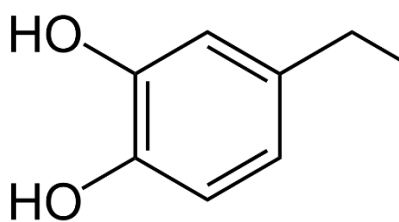
Σχεδόν όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για την καταπολέμηση των επιπτώσεων της UVR. Το δέρμα με τη σειρά του, ως μια ανάγκη αυτοσυντήρησης, ανέπτυξε πολλούς φωτοπροσαρμοστικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής αντιοξειδωτικών και μεταβολιτών, που απορροφούν τις υπεριώδεις ακτίνες (Saewan & Jimtaisong, 2015). Για το λόγο αυτό, οι ερευνητές για την αναζήτηση προϊόντων με ιδιότητες προστασίας, στράφηκαν σε δερματικές ενώσεις οι οποίες παρουσιάζουν τέτοια συμπεριφορά. Για παράδειγμα, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2007 στο Sydney, βρέθηκε πως η βιταμίνη D και οι μεταβολίτες, βελτιώνουν την επιβίωση των κερατινοκυττάρων μετά από ακτινοβολία UVB (Gupta, et al., 2007).

Η αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης δερματικών διαταραχών, που προκύπτουν από όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, έχει οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα στην αναζήτηση εναλλακτικών λύσεων, εκτός των δερματικών συστατικών, που θα στοχεύουν στην φωτοπροστασία και στην καταπολέμηση της γήρνας του δέρματος (Saewan & Jimtaisong, 2015). Μια από αυτές τις εναλλακτικές κατευθύνσεις είναι η εκμετάλλευση των ενεργών συστατικών των φυσικών προϊόντων. Τα φυτά έχουν αναπτύξει μοναδικούς και αποτελεσματικούς μηχανισμούς αντιμετώπισης της υπεριώδους ακτινοβολίας. Προσφέρουν μια πηγή ενώσεων προστασίας από την υπεριώδη ακτινοβολία, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να υποκαταστήσουν ή να μειώσουν την ποσότητα των συνθετικών παραγόντων (TiO₂, ZnO) στα καλλυντικά προϊόντα (Dunaway, et al., 2018). Ο κατάλογος των μορίων με αντιγηραντικό δυναμικό, που εξάγονται από διαφορετικά μέρη ενός αριθμού φυτικών ειδών, αυξάνεται συνεχώς με πρωταγωνιστικές ενώσεις τα αντιοξειδωτικά, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να ενισχύσουν την ενδογενή ικανότητα του δέρματος και να βοηθήσουν στην εξουδετέρωση των ROS (Cătană, Atanasov, & Berindan-Neagoe, 2018). Τέτοια αντιοξειδωτικά είναι οι πολυφαινόλες, η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, το συνένζυμο Q10, το λυκοπένιο, τα καροτενοειδή, η τρετινοΐνη, η GSH, ο ψευδάργυρος, η ρεσβερατρόλη, η γενιστεΐνη, το κακάο και άλλα (Baek & Lee, 2016). Ακολουθεί ανάλυση των βασικών κατηγοριών αντιοξειδωτικών που χρησιμοποιούνται στην Κοσμητολογία.

2.3.1 Φυτικές πολυφαινόλες

Πρόκειται για την βασική κατηγορία φυτικών αντιοξειδωτικών, η οποία περιλαμβάνει πλήθος χημικών ουσιών με ευεργετικές ιδιότητες, τόσο για τα ίδια τα φυτά (άμυνα ενάντια στην ακτινοβολία και συνεισφορά τους στη διατήρηση του χρώματος), όσο και για τον άνθρωπο (Bravo, 1998) (Dai & Mumper, 2010). Παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες στα φυτά, μέσω 2 κύριων βιοσυνθετικών μονοπατιών: το μονοπάτι του σικιμικού οξέος και το μονοπάτι του οξικού οξέος (Scalbert & Williamson, 2000), ενώ έως σήμερα, είναι γνωστές πάνω από 8000 φαινολικές ενώσεις στο φυτικό βασίλειο (Dai & Mumper, 2010). Όσον αφορά στη δομή τους, πρόκειται για ενώσεις με έναν αρωματικό δακτύλιο με έναν ή περισσότερους υποκαταστάτες υδροξυλομάδων. Στην ουσία χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών δομικών μονάδων φαινόλης και πρόκειται για χημικές ενώσεις με πολυλειτουργικό χαρακτήρα, ο οποίος διαμορφώνεται ανάλογα

με τη δομή, το βαθμό ακυλίωσης και/ή γλυκοσυλίωσης, τη σύνδεση με άλλες πολυφαινόλες και το βαθμό πολυμερισμού τους (Ferguson , 2001).



Εικόνα 6. Βασική δομή φαινόλης

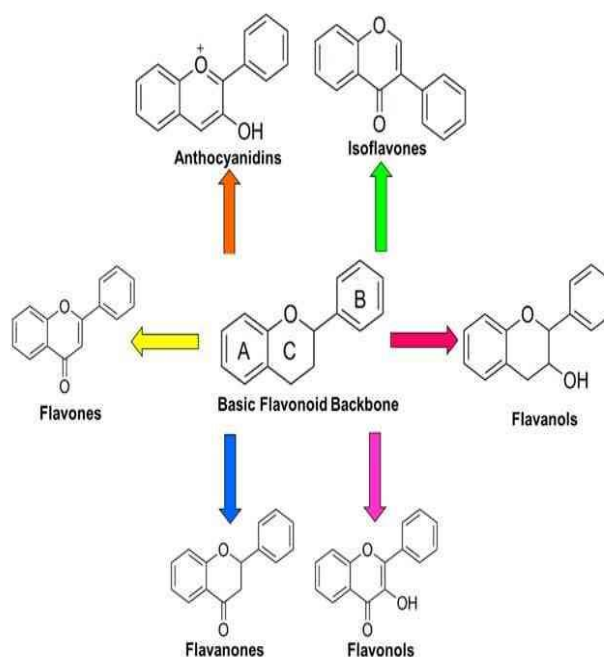
Τα φυτικά φαινολικά περιλαμβάνουν τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και τα λιγότερο κοινά στυλβένια και λιγνάνες (D'Archivio, et al., 2007).

2.3.1.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι οι πιο άφθονες πολυφαινόλες στη διατροφή μας. Η βασική δομή των φλαβονοειδών είναι ο πυρήνας φλαβάνης, που περιέχει 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε τρεις δακτυλίους (C6-C3-C6). Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε έξι υποομάδες: φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόλες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες και ανθοκυανίνες, ανάλογα με την κατάσταση οξείδωσης του κεντρικού δακτυλίου. Η δομική τους διακύμανση σε κάθε υποομάδα οφείλεται κυρίως στον βαθμό και στον τρόπο με τον οποίο πραγματοποιείται η υδροξυλίωση, μεθοξυλίωση, πρενυλίωση ή γλυκοζυλίωση (Dai & Mumper, 2010). Συναντώνται ως μονομερή, διμερή και ολιγομερή. Παράδειγμα μονομερών αποτελούν οι ανθοκυανίνες, των οποίων το μοριακό βάρος είναι οχταπλάσιο από αυτό των φλαβονών. Οι πολυμερείς ενώσεις των φλαβονοειδών ονομάζονται τανίνες και διακρίνονται σε συμπυκνωμένες και σε ικανές να υδρολυθούν (Cook & Samman, 1996). Οι συμπυκνωμένες τανίνες είναι ολιγομερή ή πολυμερή της 3-φλαβανόλης, που συνδέονται μέσω δεσμού άνθρακα ιντερφλαβάνης. Αναφέρονται επίσης ως προανθοκυανιδίνες, επειδή αποσυντίθενται σε ανθοκυανιδίνες, μέσω αντίδρασης οξείδωσης καταλυόμενης από οξύ, κατά τη θέρμανση σε όξινα διαλύματα αλκοόλης (Kolechar, et al., 2008). Οι υδρολυόμενες τανίνες είναι ενώσεις που περιέχουν έναν κεντρικό πυρήνα γλυκόζης ή άλλης πολυόλης εστεροποιημένης με γαλλικό οξύ (γαλλοτανίνη), ή με εξαϋδροξυδιφαινικό οξύ (ελλαγιτανίνη). Η μεγάλη ποικιλία στη δομή

αυτών των ενώσεων οφείλεται στις πολλές δυνατότητες σχηματισμού οξειδωτικού δεσμού (Dai & Mumper, 2010). Μερικά από τα πιο κοινά φλαβονοειδή περιλαμβάνουν:

- την κερσετίνη, μια φλαβονόλη που είναι άφθονη στο κρεμμύδι, το μπρόκολο και το μήλο (Ulusoy & Sanlier , 2020),
- την κατεχίνη, μια φλαβανόλη που βρίσκεται στο τσάι και πολλά φρούτα τύπου fig (Khan & Mukhtar, 2018),
- την κουρκουμίνη, φλαβονόλη που βρίσκεται στον κουρκουμά της οικογένειας τζιντζερ (Rao, Rivenson, Simi, & Reddy, 1995),
- την αριγενίνη, η κύρια φλαβανόνη στο γκρέιπφρουτ και σε εσπεριδοειδή,
- την κυανιδίνη-γλυκοσίδη, μια ανθοκυανίνη άφθονη σε φρούτα μούρων (μαύρη σταφίδα, βατόμουρο, βατόμουρο κ.λπ.) (D'Archivio, et al., 2007),
- δαϊδζεΐνη, γενιστεΐνη και γλυκίτινη που είναι οι κύριες ισοφλαβόνες της σόγιας (Heinonen , Hoikkala, Wähälä, & Adlercreutz , 2003).

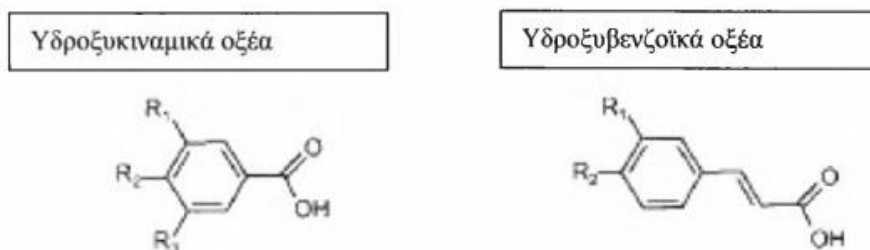


Εικόνα 7. Χαρακτηριστικές δομές φλαβονοειδών

2.3.1.2 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν τη δεύτερη πιο διαδεδομένη κατηγορία φαινολικών ενώσεων και βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα φυτικά τρόφιμα. Ανήκουν στις μη

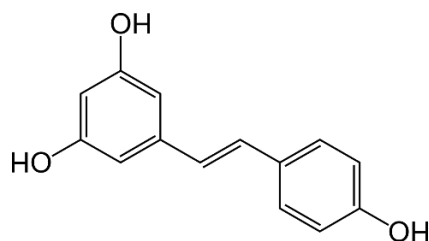
φλαβονοειδείς φαινόλες και χαρακτηρίζονται από τον C6-C3 σκελετό (Xue , et al., 2021). Τα φαινολικά οξέα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, όπως το γαλλικό οξύ, και παράγωγα του κινναμωμικού οξέος όπως το κουμαρικό, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ (D'Archivio, et al., 2007). Αυτά τα οξέα σπάνια βρίσκονται στην ελεύθερη μορφή τους (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiméne, 2004). Το καφεϊκό οξύ είναι το περισσότερο άφθονο φαινολικό οξύ σε πολλά φρούτα και λαχανικά, πιο συχνά εστεροποιημένο με κινικό οξύ όπως χλωρογενικό οξύ, το οποίο είναι η κύρια φαινολική ένωση του καφέ. Ένα άλλο κοινό φαινολικό οξύ είναι το φερουλικό οξύ, το οποίο υπάρχει στα δημητριακά και είναι εστεροποιημένο σε ημικυτταρίνες στο κυτταρικό τοίχωμα.



Εικόνα 8. Χαρακτηριστικές δομές φαινολικών οξέων.

2.3.1.3 Στιλβένια

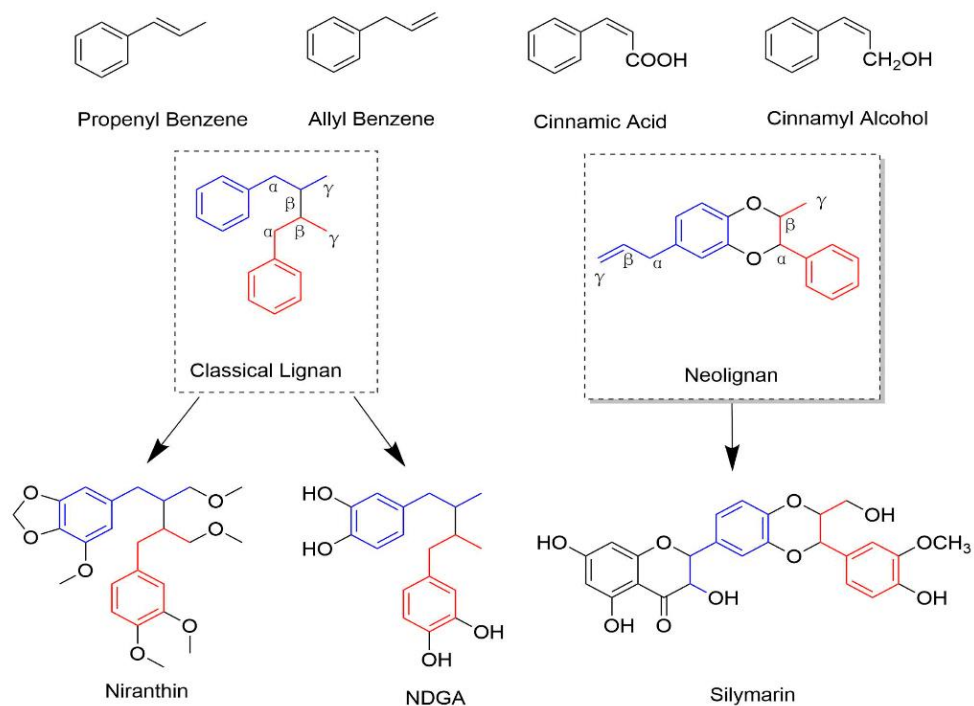
Τα στιλβένια συναντώνται σε μικρά ποσοστά στο καθημερινό διαιτολόγιο του ανθρώπου. Το πιο σημαντικό μέλος αυτής της κατηγορίας είναι η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριυδροξυ-trans-στιλβένιο) και απαντάται σε μια ποικιλία φυτικών ειδών (κυρίως στα φυστίκια) όπως επίσης στο κόκκινο κρασί. (Evers, Wang, Huong, Huang, & Huang, 2004). Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ρεσβερατρόλη έχει προστατευτικές επιδράσεις σε διάφορα μοντέλα ασθενειών. Οι μηχανισμοί δράσης της είναι πολύπλοκοι, ενώ αυτό που έχει φανεί πως παίζει τον πιο ουσιαστικό ρόλο στη συμβολή της στην ανθρώπινη υγεία, είναι, μεταξύ άλλων, η αντιοξειδωτική της δράση (Xia, Daiber, Förstermann, & Li, 2017).



Εικόνα 9. Δομή ρεσβερατρόλης

2.3.1.4 Λιγνάνια

Τα λιγνάνια είναι μια μεγάλη ομάδα φυσικών ενώσεων που προέρχονται από τη βιοσυνθετική οδό σικιμικού οξέος. Δομικά, οι λιγνάνες, περιέχουν ένα βασικό κριώμα δύο ή περισσότερων φαινυλοπροπανοειδικών μονάδων, και τα μονομερή που τις σχηματίζουν είναι το κινναμικό οξύ, η κινναμυλική αλκοόλη, το προπενυλοβενζόλιο και το αλλυλοβενζόλιο. Όταν η μοριακή σύνδεση των μονομερών συμβαίνει μεταξύ των θέσεων β-β' (αναφέρεται επίσης ως 8-8'), αυτές οι ενώσεις χαρακτηρίζονται ως «κλασικές λιγνάνες». Αντίθετα, εάν οι κύριες δομικές μονάδες συζευχθούν με οποιονδήποτε άλλο τρόπο (μη β-β' σύνδεση) οι ενώσεις ονομάζονται «νεολιγνάνες» (Cui, Du, Liu, & Rong, 2020). Τα κύρια τρόφιμα, τα οποία περιέχουν σημαντικές ποσότητες από λιγνάνια, είναι ο λιναρόσπορος καθώς και το λάδι του. Μερικά δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν ίχνη από λιγνάνια (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004). Οι λιγνάνες δρουν ως αντιοξειδωτικά και μπορούν να συνδεθούν με τους υποδοχείς οιστρογόνων στον ιστό του μαστού (Wcislo & Szarlej-Wcislo, 2014).



Εικόνα 10. Δομές Λιγνάνιων

2.3.2 Δράση πολυφαινολών στα καλλυντικά

Οι ευεργετικές ιδιότητες των πολυφαινολών έχουν υποστηριχθεί, από διάφορες μελέτες που έχουν γίνει σε κύτταρα του δέρματος. Για το λόγο αυτό, οι ενώσεις αυτές ενσωματώνονται όλο και περισσότερο σε καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα (Wijeratane, Abou-Zaid, & Shahidi, 2005). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι κατεχίνες. Στο πράσινο τσάι, οι κύριες πολυφαινόλες είναι οι κατεχίνες και συγκεκριμένα, η γαλλοκατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη και η επιγαλλοκατεχίνη-3-γαλλική (EGCG). Έρευνες έχουν δείξει, ότι η EGCG αναστέλλει την επαγόμενη, από την UVB, απελευθέρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου από καλλιεργημένα φυσιολογικά επιδερμικά κερατινοκύτταρα και καταστέλλει τη φωσφορυλίωση της κινάσης MAPK. Επιπλέον, μειώνει τη φλεγμονή, ενεργοποιώντας το σύστημα NFκB. Οι πολυφαινόλες του τσαγιού μπορούν επίσης να αποτρέψουν την επαγόμενη από την UVB ενεργοποίηση της 3-κινάσης της φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (IP3K) (Katiyar, Afak, Azizuddin, & Mukhtar, 2001). Παράλληλα, οι φλαβίνες του τσαγιού, και συγκεκριμένα οι θεαφλαβίνες, οι οποίες βρίσκονται στο μαύρο τσάι, έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την επαγόμενη από την UVB επαγωγή AP-1, καταστέλλοντας τη δράση της εξωκυτταρικά ρυθμισμένης κινάσης (ERK) και της N-τερματικής κινάσης c-jun (JNK) (Nichols & Katiyar, 2009).

Όπως αναφέρθηκε στην κατηγορία των σιλβενίων, η ρεσβερατρόλη είναι μία πολύ σημαντική ένωση και οι αντιοξειδωτικές της ιδιότητες είναι αυτές που την καθιστούν εξαιρετικά προστατευτική (Laine, 2004). Τα προστατευτικά αποτελέσματα της ρεσβερατρόλης ανακαλύφθηκαν σε μοριακό επίπεδο μέσω της αναστολής του μεσολαβητή της φλεγμονής COX-2, της αναστολής της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης, της μείωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της μειωμένης υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Η ρεσβερατρόλη μειώνει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, ρυθμίζοντας προς τα κάτω την πρωτεΐνη Keap-1 που συνδέεται με το Nrf2 και σηματοδοτεί την αποικοδόμησή του. Επιπλέον, η πρωτεΐνη SIRT1, προστατεύει από τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία UVB και τις ROS, διαμορφώνοντας την p53 και την c-N-τερματική κινάση του c-Jun, πολύ σημαντικά πρωτεϊνικά συμπλέγματα με σηματοδοτικό χαρακτήρα (Afak, Adhami, & Ahmad, 2003).

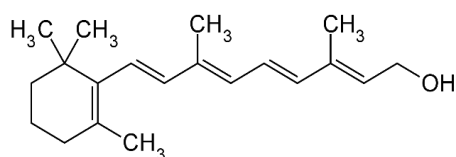
Πολύ σημαντική θέση στον κόσμο της Κοσμητολογίας, φαίνεται να έχουν και οι κουρκουμίνες, συστατικά των φυτών της οικογένειας Τζίντζερ. Οι κουρκουμίνες μειώνουν τη φλεγμονή αναστέλλοντας τις οδούς σηματοδότησης NFκB και MAPK και μειώνοντας την έκφραση του επαγωγίμου μονοξειδίου του αζώτου και του COX-2. Επιπλέον, αναστέλλουν την επαγόμενη από την UVB έκφραση του TNF mRNA και μειώνουν την έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης-1 (MMP-1) σε κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες (Sandur, et al., 2007).

2.3.3 Βιταμίνες στα καλλυντικά

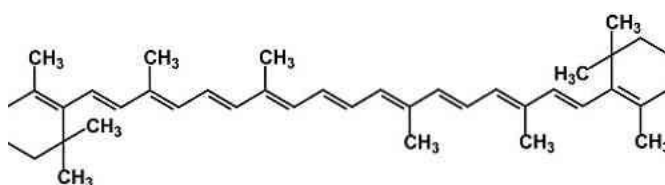
Εκτός των πολυφαινολών, πολύ σημαντική κατηγορία αντιοξειδωτικών, που έχει απασχολήσει την Κοσμητολογία, είναι οι βιταμίνες. Πιστεύεται πως η χρήση βιταμινών μπορεί να βοηθήσει στην προστασία ή και ακόμα στην αποκατάσταση της δερματικής βλάβης που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Αυτό δεν περιορίζεται μόνο στη γήρανση του δέρματος. Έχει φανεί πως ορισμένες βιταμίνες βοηθούν στη μείωση της μελάγχρωσης και των μωλωπών, βελτιώνουν την κερατινοποίηση και συχνά παρουσιάζουν και αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010).

2.3.3.1 Βιταμίνη Α

Η βιταμίνη Α ήταν η πρώτη βιταμίνη που εγκρίθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων ως αντιρυτιδικός παράγοντας, που βελτιώνει την όψη της επιφάνειας του δέρματος και έχει αντιγηραντικές ιδιότητες. Πρόκειται για μία λιποδιαλυτή ουσία, που ανήκει στην οικογένεια των ρετινοειδών (Hoang, Moon, & Lee, 2021). Αυτή η οικογένεια, εκτός από τη ρετινόλη, περιλαμβάνει κι άλλες ουσίες με δομικές ομοιότητες και βιολογικές ιδιότητες παρόμοιες με τη ρετινόλη. Επειδή οι βιολογικές δραστηριότητες των ουσιών αυτών ποικίλλουν, δίνονται, χάριν ευκολίας τυποποίησης, σε ισοδύναμα ρετινόλης (Tozer, et al., 2019). Η βιταμίνη Α βρίσκεται κυρίως σε ζωικές τροφές, όπως ο κρόκος αυγού και το συκώτι, όμως επίσης καλή πηγή, κυρίως β-καροτίνης, είναι τα καρότα, οι ντομάτες και άλλα κίτρινα λαχανικά (Duester, 2008). Ως πρόδρομος της βιταμίνης Α, η βήτα-καροτίνη είναι ένα ισχυρό λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό ικανό να σβήνει το ατομικό οξυγόνο, ενώ έχει αποδειχθεί ότι έχει φωτοπροστατευτική δράση στο δέρμα, παρέχοντας προστασία από τις UV ακτινοβολίες. Ωστόσο, επειδή η βήτα-καροτίνη είναι ασταθής, συνήθως στα καλλυντικά σκευάσματα χρησιμοποιούνται άλλες μορφές βιταμίνης Α (Körcke & Krutmann, 2008).



Εικόνα 11. Δομή βιταμίνης Α



Εικόνα 12. Δομή β-καροτίνης

Ακολουθεί συνοπτικός πίνακας με τα βασικά παράγωγα της Βιταμίνης Α και της δράσης τους στην Κοσμητολογία (Hoang, Moon, & Lee, 2021).

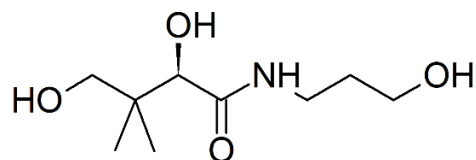
Πίνακας 3. Βιταμίνη Α και παράγωγά της-Δράσεις/Χρήσεις

Βιταμίνη Α και παράγωγα	Δράση	Χρήση
Ρετινόλη	Αναστέλλει την κολλαγενάση και την έκφραση της MMP, διεγείρει τη σύνθεση GAGS και το κολλαγόνο τύπου 1	Θεραπεία δυσχρωμιών, ξηρότητας, αντιρυτιδικής θεραπείας
Ρετινοϊκό οξύ	Μειώνει τη φλεγμονή στους σμηγματογόνους αδένες, αναστέλλει την κεράτωση, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των επιδερμικών κυττάρων	Θεραπεία της ψωρίασης, χρόνιας φλεγμονής των μαλλιών
Οξεικός και παλμιτικός ρετινυλεστέρας	Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των επιδερμικών κυττάρων, τη ρύθμιση του σμήγματος	Σταθεροποιεί τις ιδιότητες στη θεραπεία των ρυτίδων, δρα ως αντιοξειδωτικό
Ρετιναλδεΰδη	Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των επιδερμικών κυττάρων, οξειδώνεται σε ρετινοϊκό οξύ	Σταθεροποιεί τις ιδιότητες στη θεραπεία των ρυτίδων
Ναφθαλινοκαρβοξυλικό οξύ	Δρα ως ισχυρός ρυθμιστής για την κερατινοποίηση στους θύλακες των τριχών, αυξάνει τον πολλαπλασιασμό, αλλάζει την έκφραση των γονιδίων και τη σύνθεση του mRNA	Μειώνει τη φλεγμονή, την ακμή, την υπερβολική κεράτωση
Ταζαροτένιο	Ρυθμίζει τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη φλεγμονή των κερατινοκυττάρων	Θεραπεία της ψωρίασης και της ακμής, λειτουργεί ως φωτοπροστατευτικό για την ηλιακή ακτινοβολία

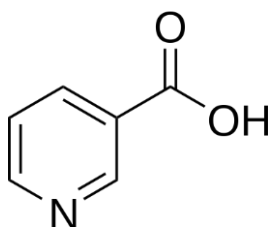
2.2.3.2. Βιταμίνη Β

Η βιταμίνη Β είναι ένα υδατοδιαλυτό θρεπτικό συστατικό, που βρίσκεται σε μια ποικιλία τροφών, ιδιαίτερα στα δημητριακά ολικής αλέσεως και στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά. Η πανθενόλη είναι η αλκοολική εκδοχή του παντοθενικού οξέος, το οποίο είναι γνωστό ως βιταμίνη Β5. Χρησιμοποιείται σε προϊόντα περιποίησης μαλλιών εδώ και πολλά χρόνια επειδή δρα ως υγραντικό, αυξάνοντας την περιεκτικότητα σε νερό και βελτιώνοντας την ελαστικότητα των μαλλιών. Η πανθενόλη είναι μια αποτελεσματική ενυδατική κρέμα στα καλλυντικά, λόγω της ικανότητάς της να προσελκύει νερό στην κεράτινη στιβάδα και να μαλακώνει το δέρμα (Kim, Kim, & Kim, 2013). Ακόμα μία σημαντική ένωση που ανήκει στην οικογένεια των βιταμινών Β, είναι η νιασιναμίδη (νιασίνη), οργανικό μόριο το οποίο αποτελεί μορφή της βιταμίνης Β3. Παράγεται στον οργανισμό με τη μετατροπή του νικοτινικού οξέος, το οποίο έχει την ίδια βιταμινική

δράση με το αμίδιο του. Εμπλέκεται σε πολλές βιολογικές διεργασίες (μεταβολισμό της κυτταρικής ενέργειας, ρύθμιση της σύνθεσης του DNA, μεταγραφή) (Tanno, Ota, Kitamura, Katsube, & Inoue, 2000) και οι αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της βασίζονται κυρίως στην αναστολή της χημειοταξίας των λευκοκυττάρων, στην απελευθέρωση λυσοσωμικών ενζύμων και στον μετασχηματισμό των λεμφοκυττάρων. Με την αναστολή των παραγόντων κερατινοκυττάρων, η νιασίνη αποτρέπει την αναστρέψιμη μεταφορά μελανοσωμάτων από τα μελανοκύτταρα στα κερατινοκύτταρα. Η φωτοπροστατευτική δράση της βασίζεται, τόσο στην αναστολή της φωτοκαρκινογένεσης, όσο και στην προστασία από την επαγόμενη, από την υπεριώδη ακτινοβολία, ανοσοκαταστολή (Bains, Kaur, Kaur, & Sharma, 2018).



Εικόνα 13. Δομή πανθενόλης

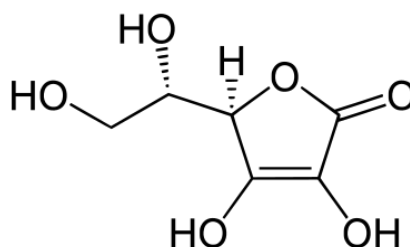


Εικόνα 14. Δομή νιασίνης

2.2.3.3. Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C (ή το L-ασκορβικό οξύ) είναι ένα υδρόφιλο μόριο, παρόμοιο με τη γλυκόζη, που αποτελείται από έξι άνθρακες. Στους οργανισμούς, η Βιταμίνη C μπορεί να βρεθεί, είτε στην ανηγμένη της μορφή (ασκορβικό οξύ ή ασκορβικό), είτε στην οξειδωμένη της μορφή [δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA)], η οποία είναι προϊόν οξείδωσης του ασκορβικού οξέος με δύο ηλεκτρόνια. Η βιταμίνη C είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, που μπορεί να εξουδετερώσει το οξειδωτικό stress, μέσω μιας διαδικασίας μεταφοράς ηλεκτρονίων, μειώνοντας τις ποσότητες ασταθών ειδών ριζών οξυγόνου, αζώτου και θείου (Caritá, et

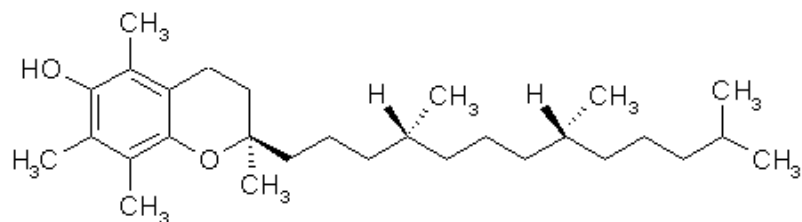
al., 2020) (Sunil Kumar, Singh, & Verma, 2017). Επιπλέον, έρευνα σε ανθρώπινο πλάσμα έχει δείξει ότι η βιταμίνη C είναι αποτελεσματική για την πρόληψη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, που προκαλείται από τις ρίζες υπεροξειδίου. Όταν εφαρμόζεται τοπικά, η βιταμίνη C μπορεί να εξουδετερώσει τις ROS, που προκαλούνται από την ηλιακή ακτινοβολία και περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως ο καπνός και η ρύπανση, και έχει αποδειχθεί αποτελεσματική, για τη θεραπεία της υπερμελάγχρωσης, του μελάσματος και των ηλιακών κηλίδων. Αυτό φαίνεται να σχετίζεται με την ικανότητά της να εμποδίζει την ενεργό θέση της τυροσινάσης, του ενζύμου που περιορίζει τη μελανογένεση. Επιπλέον, η βιταμίνη C προάγει τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων και βελτιώνει τη δερματοεπιδερμική συνοχή (Pullar, Carr, & Vissers, 2017) (Hoang, Moon, & Lee, 2021).



Εικόνα 15. Δομή βιταμίνης C

2.2.3.4 Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που βρίσκεται σε διάφορα τρόφιμα, ιδιαίτερα στη σόγια, τους ξηρούς καρπούς, το αλεύρι ολικής αλέσεως και τα έλαια. Τοπική εφαρμογή προϊόντων πλούσιων σε βιταμίνη E έχει φανεί, πως παρουσιάζει πολυάριθμα δερματικά οφέλη. Η πιο σημαντική ιδιότητα της βιταμίνης E είναι η ισχυρή αντιοξειδωτική της ικανότητα ιδιαίτερα εξουδετερώνοντας τις λιπιδικές υπεροξυλικές ρίζες (Barbosa, et al., 2009) (Keen & Hassan, 2016). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να μειώσει το ερύθημα και το οίδημα που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία. Η κλινική βελτίωση στα ορατά σημάδια γήρανσης του δέρματος έχει συνδεθεί με μειώσεις, τόσο της ρυτίδωσης του δέρματος, όσο και του σχηματισμού όγκων του δέρματος (Shimizu, Kondo, Sakai, Takeda, & Nagahat, 2001). Η τοκοφερόλη είναι η πιο δραστική μορφή βιταμίνης E, ενώ οι εστέρες της βιταμίνης E (με βασικότερο το παράγωγο ακετυλεστέρα της, την οξική τοκοφερόλη), έχουν επίσης αποδειχθεί ότι διεισδύουν στην επιδερμίδα (Keen & Hassan, 2016) (Brigelius-Flohé, et al., 2002).



Εικόνα 16. Δομής της α-τοκοφερόλης

3. Πειραματικό Μέρος

Για τις αναλύσεις που ακολουθούν, με αρχική ποσότητα 20 g σε 150 mL διαλύτη, δημιουργήθηκε η συγκέντρωση 130 mg/mL για κάθε εκχύλισμα, η οποία ήταν και η αρχική συγκέντρωση για όλες τις μεθόδους που θα αναλυθούν παρακάτω. Οι εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν σε βιομηχανικό επίπεδο στην εταιρία Κορρες Φυσικά προϊόντα κι εμείς λάβαμε τα εκχυλίσματα υπό την μορφή πρώτων υλών. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 3 φορές για απόδειξη επαναληψιμότητας και τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται, είναι ο μέσος όρος των τιμών. Επιπλέον βάσει των τριών τιμών υπολογίστηκε και η τυπική απόκλιση και ο συντελεστής επαναληψιμότητας CV.

Πίνακας 4. Εκχυλίσματα εργασίας

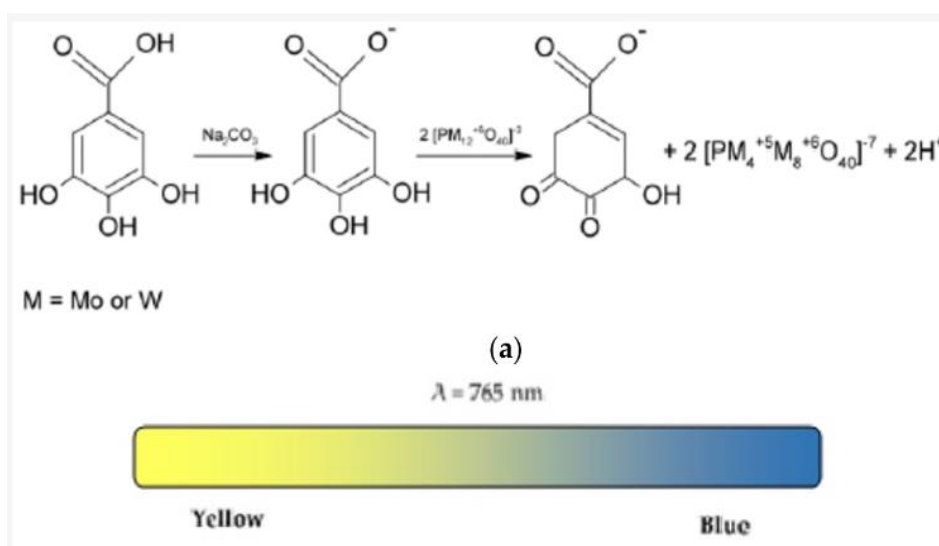
A/A	Όνομασία εκχυλίσματος	Δραστική
1	Innoveol EGCG(VO00005021)	Epigallocatechin
2	Lupeol	Lupeol
3	Saffron	Crocin
4	Dermofeel Toco(LT21301632)	Vitamin E
6	Κουρκουμάς	Curcumin

3.1 Μέθοδος Folin-Ciocalteu- Ποσοτικοποίηση του ολικού περιεχομένου πολυφαινολών

3.1.1 Αρχή μεθόδου

Η δοκιμή Folin–Ciocalteu είναι μια πολύ γνωστή μέθοδος που στοχεύει στον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά (TPC). Το τεστ Folin-Ciocalteu χρησιμοποιήθηκε ευρέως σε κλινικές και διατροφικές μελέτες για τη μέτρηση της συνολικής πολυφαινολικής περιεκτικότητας σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης και βιολογικά δείγματα. Αυτή η μέθοδος σχεδιάστηκε αρχικά για την ανάλυση πρωτεϊνών,

αλλά αργότερα υιοθετήθηκε από τους Singleton, Orthofer και Lamuela-Raventos (1999) για την ανάλυση των φαινολικών συστατικών στο κρασί, μετά την οποία έγινε μια δοκιμασία ρουτίνας για την αντιοξειδωτική αξιολόγηση των τροφίμων και των φυτών (Munteanu & Constantin, 2021). Η δοκιμή Folin–Ciocalteu βασίζεται στην αναγωγή του αντιδραστηρίου Folin–Ciocalteu με φαινολικές ενώσεις σε αλκαλική κατάσταση. Η ακριβής χημική φύση του αντιδραστηρίου Folin–Ciocalteu δεν είναι σαφώς καθορισμένη, αλλά πιστεύεται ότι μπορεί να περιέχει ένα σύμπλοκο φωσφομολυβδικού/φωσφοβολφραμικού οξέος που ανάγεται για να ληφθεί ένα μπλε χρωμοφόρο με μέγιστη απορρόφηση στα 765 nm. Το κεντρικό ιόν μολυβδαινίου στο σύμπλεγμα γίνεται αποδεκτό ως αναγωγική θέση, όπου το ιόν Mo^{6+} ανάγεται σε Mo^{5+} με την αποδοχή ενός ηλεκτρονίου που δίνεται από το φαινολικό αντιοξειδωτικό (Magalhães, Segundo, Reis, & Lima, 2008).



Εικόνα 17. Αντίδραση μεταξύ των φαινολικών ενώσεων και των παραγώγων του φωσφοβολφραμικού και του φωσφομολυβδικού οξέος σε αλκαλικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μπλε χρώματος με τη μέθοδο Folin–Ciocalteu (α). Διακύμανση χρώματος που παρατηρήθηκε στον προσδιορισμό.

3.1.2 Υλικά και Αντιδραστήρια

- I. Na_2CO_3 7%
- II. Αντιδραστήριο Folin–Ciocalteu
- III. Αποστειρωμένο απιονισμένο νερό, χωρίς πυρετογόνα
- IV. Γαλλικό οξύ (3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ)

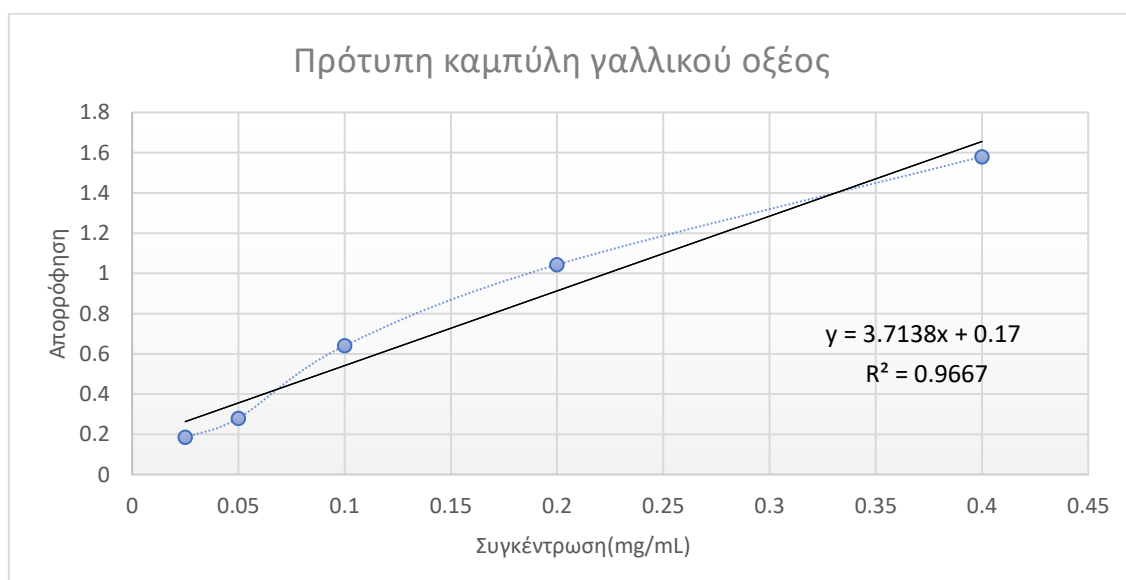
3.1.3 Πειραματική διαδικασία

Σε 100 µL αντιδραστηρίου Folin–Ciocalteu, προσθέσαμε 100 µL εκχυλίσματος και στη συνέχεια 500 µL απιονισμένο H₂O. Αφήσαμε το μίγμα σε ηρεμία στο σκοτάδι για 6 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέσαμε 1 mL Na₂CO₃ 7% και επιπλέον 500 µL απιονισμένο H₂O. Μεταφέραμε το νέο μίγμα στο σκοτάδι και το αφήσαμε σε ηρεμία για 90 λεπτά. Φωτομετρήσαμε σε 767 nm.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήσαμε γαλλικό οξύ σε συγκεντρώσεις (mg/mL) που φαίνονται παρακάτω. Η αρχική ζύγιση ήταν 0,4 g γαλλικού διαλυμένα σε 100 mL μεθανόλης, με τελική συγκέντρωση 0,4 mg/mL.

Πίνακας 5. Απορροφήσεις σε διαδοχικές συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος, για κατασκευή πρότυπης καμπύλης στη μέθοδο Folin–Ciocalteu.

Συγκέντρωση (mg/mL)	Μέση Απορρόφηση	Τυπική απόκλιση SD	Τελική Απορρόφηση με $\pm 2SD$	CV(%)
0.025	0.185	0.001	0.185 \pm 0.002	0.4
0.050	0.280	0.008	0.280 \pm 0.016	3.1
0.100	0.640	0.008	0.640 \pm 0.016	1.3
0.200	1.043	0.002	1.043 \pm 0.004	0.2
0.400	1.580	0.043	1.580 \pm 0.086	2.7



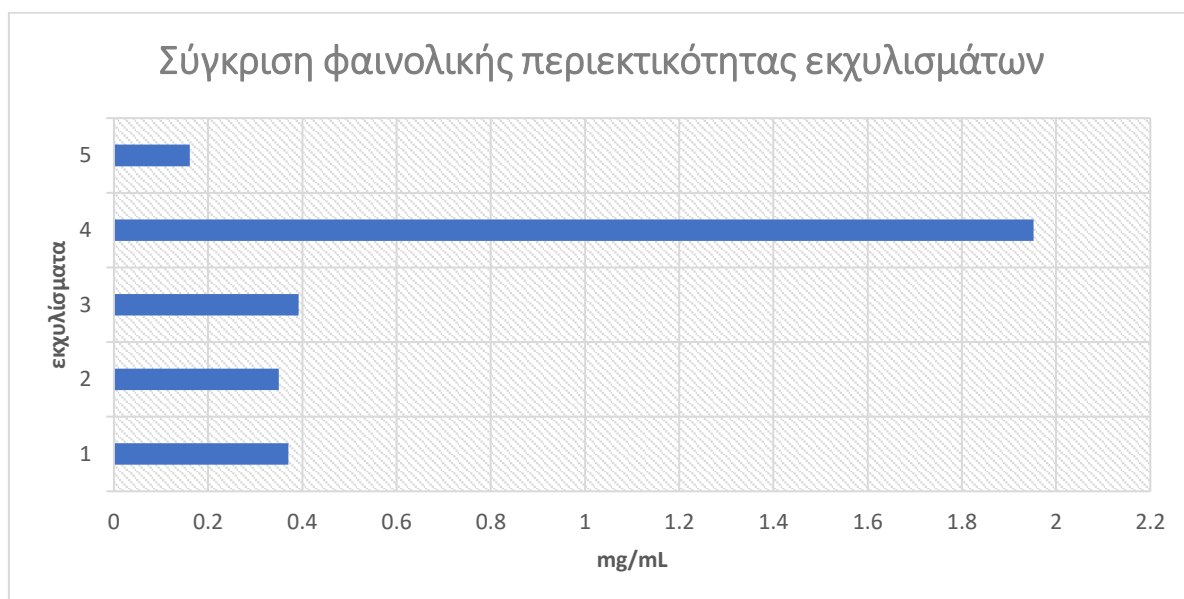
Διάγραμμα 1. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος.

Βάσει της εξίσωσης $y = 3.7138x + 0.17$, υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις φαινολικών, σε mg/mL, οι οποίες φαίνονται παρακάτω. Στην περίπτωση του εκχυλίσματος 4, επειδή ήταν πολύ πυκνό αραιώσαμε επιπλέον σε αναλογία 1:10, οπότε η συγκέντρωση έχει πολλαπλασιαστεί επί 10.

Πίνακας 6. Συγκεντρώσεις φαινολικών των διάφορων εκχυλισμάτων με μέθοδο Folin–Ciocalteu

δείγματα	Απορρόφηση	Μέση συγκέντρωση (mg/mL)	Τυπική απόκλιση SD	Τελική συγκέντρωση με ± 2 SD	CV(%)
1-innoveol	1.546	0.371	0.008	0.371 \pm 0.016	2.6
2-lupeol	1.47	0.35	0.008	0.350 \pm 0.016	2.3
3-saffron	1.245	0.392	0.004	0.392 \pm 0.008	1
4-dermofeel	0.895	1.952	0.005	1.952 \pm 0.010	0.3
5-κουρκουμάς	0.769	0.161	0.004	0.161 \pm 0.008	2.5

Ακολουθεί συγκριτικό διάγραμμα με τα παραπάνω αποτελέσματα



Διάγραμμα 2. Διάγραμμα σύγκρισης συνολικού φαινολικού περιεχομένου στα διάφορα εκχυλίσματα με μέθοδο Folin–Ciocalteu.

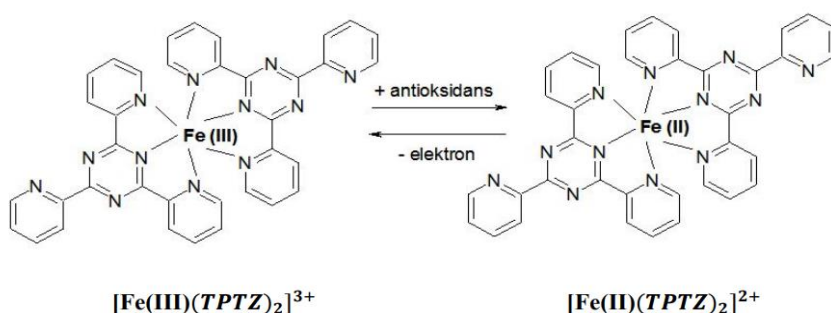
Βάσει των αποτελεσμάτων που πήραμε από την μέθοδο Folin–Ciocalteu, συμπεραίνουμε πως, πράγματι, τα προς εξέταση δείγματα εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα. Συγκεκριμένα, τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση φαίνεται

να εμφανίζει το εκχύλισμα *dermofeel toco*, το οποίο έχει σαν δραστική ουσία την βιταμίνη E.

3.2 Μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

3.2.1 Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Benzie & Strain, με σκοπό να μετρήσουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Αργότερα τροποποιήθηκε, ώστε να γίνει πιο γενική, και να αφορά μέθοδο προσδιορισμού αντιοξειδωτικής ικανότητας και άλλων κατηγοριών, κυρίως φυτικών εκχυλισμάτων. Στηρίζεται στην ικανότητα αναγωγής του άχρωμου συμπλόκου Fe^{3+} -TPTZ σε Fe^{2+} -TPZT, που έχει έντονο μπλε-μωβ χρώμα. Όσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του προς εξέταση δείγματος, τόσο περισσότερο θα αναχθεί και το σύμπλοκο σιδήρου, μπορεί να μετρηθεί την αλλαγή της απορρόφησης, σε μήκος κύματος 593 nm (De Graft-Johnson, et al., 2007). Ο προσδιορισμός FRAP είναι φθηνός, τα αντιδραστήρια είναι απλά στην προετοιμασία, τα αποτελέσματα είναι εξαιρετικά αναπαραγόμενα και η διαδικασία είναι απλή και γρήγορη. Η ανάλυση FRAP προσφέρει έναν δείκτη αντιοξειδωτικών ή μειωτικών δυνατοτήτων βιολογικών υγρών εντός της τεχνολογικής εμβέλειας κάθε εργαστηρίου και ερευνητή, που ενδιαφέρεται για το οξειδωτικό στρες και τις επιπτώσεις του (Benzie & Strain, 1996).



Εικόνα 18. Αναγωγή τρισθενούς συμπλόκου Fe^{3+} -TPTZ σε δισθενές Fe^{2+} -TPZT.

3.2.2 Υλικά και αντιδραστήρια

1. Διάλυμα οξικού 300 mM, pH 3,6

- II. Διάλυμα TPTZ (10x)(2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 100 mM – Διάλυμα HCL 400 mM σε αραιώση 1:10
- III. Διάλυμα FeCl₃ · 6H₂O 200 mM σε αραιώση 1:10.
- IV. Αντιδραστήριο FRAP: Ανάμιξη των I, II, III σε αναλογία 10:1:1 αντίστοιχα.
- V. Σε όλη τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό, χωρίς πυρετογόνα.

Η ανάμιξη για την παρασκευή του αντιδραστηρίου FRAP έγινε αυθημερόν, τις ημέρες του πειράματος, καθώς είναι ευαίσθητο.

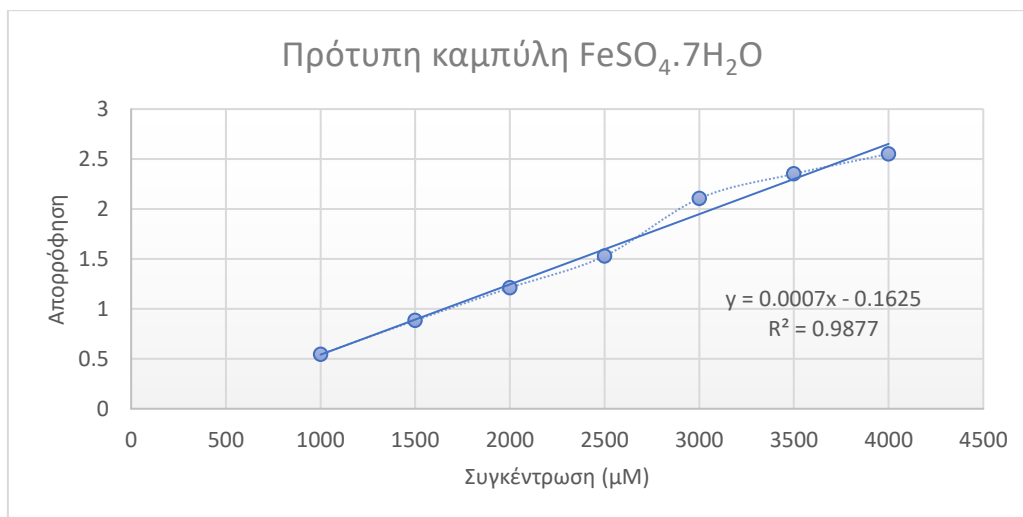
3.2.3 Πειραματική διαδικασία

Σε 1,2 mL αντιδραστηρίου FRAP προστέθηκαν 40 μL δείγματος. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση για 8min στους 37°C, αφού πρώτα έγινε ανάδευση vortex. Τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 593 nm.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δείγματος εκχυλίσματος, φτιάχτηκε μια πρότυπη καμπύλη FeSO₄·7H₂O σε διάφορες συγκεντρώσεις μM, η οποία φαίνεται παρακάτω:

Πίνακας 7. Απορροφήσεις σε διαδοχικές συγκεντρώσεις του FeSO₄·7H₂O για παρασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Συγκέντρωση (μM)	Μέση Απορρόφηση	Τυπική απόκλιση SD	Τελική Απορρόφηση με ± 2 SD	CV(%)
1000	0.544	0.003	0.544±0.006	0.6
1500	0.884	0.001	0.884±0.002	0.1
2000	1.211	0.008	1.211±0.016	0.7
2500	1.528	0.002	1.528±0.004	0.1
3000	2.105	0.004	2.105±0.008	0.2
3500	2.351	0.006	2.351±0.012	0.3
4000	2.551	0.001	2.551±0.002	0.04



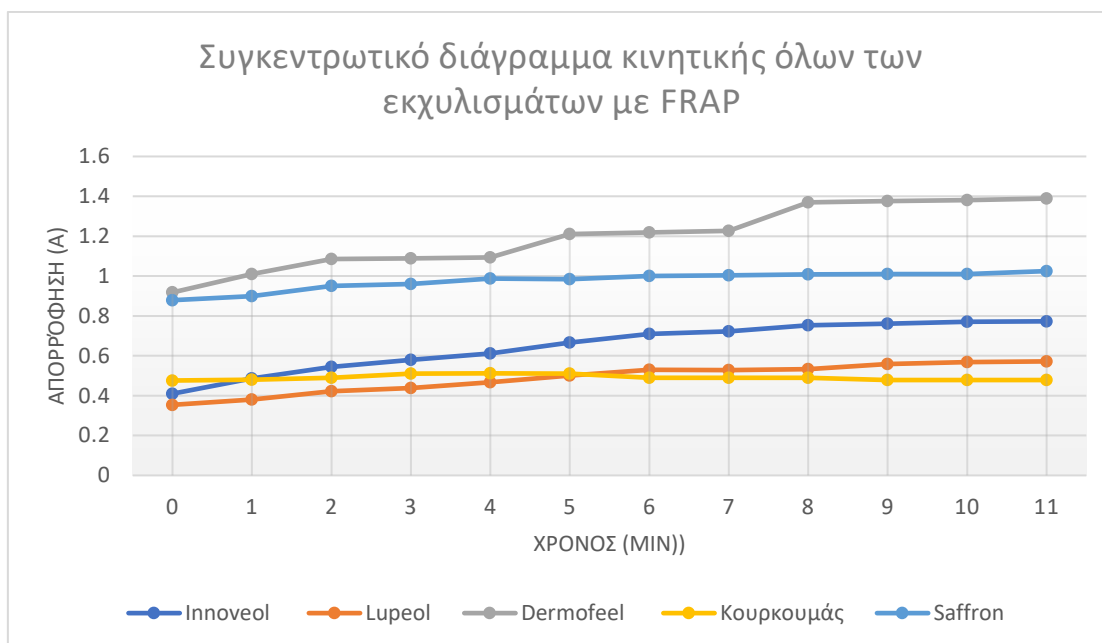
Διάγραμμα 3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ για μέθοδο FRAP.

Για τη μέτρηση απορρόφησης των προς εξέταση εκχυλισμάτων, πραγματοποιήσαμε τη μελέτη της κινητικής τους. Συγκεκριμένα μετρήσαμε ταυτόχρονα, όλα τα δείγματα από $t=0$ έως $t=11$ min, χρόνο, που βάσει βιβλιογραφίας, φαίνεται πως παύει πια να γίνεται η αναγωγή. Αυτό που περιμένουμε είναι να αυξάνεται η απορρόφηση, με το πέρας του των λεπτών έως ότου φτάσει σε μία ενδεικτική κορύφωση, οπότε και δημιουργείται ένα πλατό και παύει πια το αντιδραστήριο να ανάγεται παραπάνω. Τα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω, όπως επίσης και το διάγραμμα αυτών. Με κίτρινο είναι ο χρόνος, στον οποίο φαίνεται πως λίγο πολύ, όλα τα εκχυλίσματα έχουν πιάσει τη μέγιστη απορρόφησή τους.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα μελέτης κινητικής των εκχυλισμάτων με μέθοδο FRAP.

	Innoevol	Lupeol	Dermofeel	Κουρκουμάς	Saffron
t(min)	A1	A2	A3	A5	A6
0	0.410	0.354	0.918	0.476	0.879
1	0.486	0.380	1.010	0.480	0.899
2	0.544	0.423	1.085	0.490	0.95
3	0.580	0.439	1.089	0.510	0.96
4	0.611	0.468	1.093	0.512	0.988
5	0.667	0.501	1.211	0.510	0.985
6	0.710	0.530	1.218	0.490	1.000
7	0.723	0.529	1.227	0.489	1.004
8	0.753	0.533	1.370	0.489	1.009
9	0.761	0.559	1.376	0.478	1.010

10	0.770	0.569	1.381	0.478	1.010
11	0.773	0.572	1.389	0.478	1.025



Διάγραμμα 4. Συγκεντρωτικό διάγραμμα κινητικής όλων των εκχυλισμάτων με μέθοδο FRAP

Έπειτα, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των προς εξέταση εκχυλισμάτων στο χρόνο της μέγιστης απορρόφησης, δηλαδή στα 8min. Η συγκέντρωση υπολογίστηκε, βάσει της εξίσωσης που προέκυψε από την πρότυπη καμπύλης αναφοράς ($y = 0.0007x - 0.1625$).

Πίνακας 9. Συγκέντρωση εκχυλισμάτων στα 8 min με μέθοδο FRAP

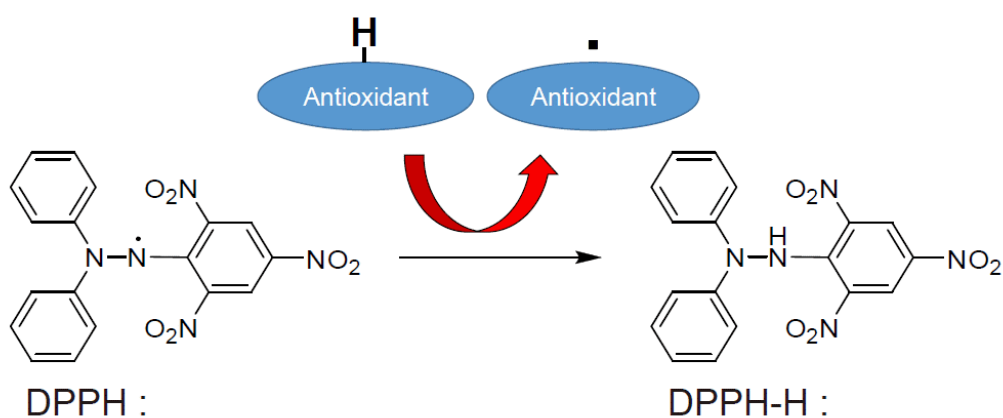
Εκχύλισμα	Μέση συγκέντρωση (μM)	Τυπική απόκλιση SD	Τελική συγκέντρωση με $\pm 2 SD$	CV(%)
innoveol	1098.9	0.008	1098.9 \pm 0.016	0.1
lupeol	993.6	0.009	993.6 \pm 0.018	0.1
dermofeel	2189.3	0.004	2189.3 \pm 0.008	0.1
κουρκουμάς	930.7	0.003	930.7 \pm 0.006	0.1
saffron	1673.6	0.199	1673.6 \pm 0.400	1

Τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση φαίνεται να εμφανίζει, και εδώ, το εκχύλισμα dermofeel toco.

3.3 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλιο)

3.3.1 Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand- Williams et al. Η DPPH[•] είναι μια σταθερή αζωτούχα π-ρίζα, που υπάρχει στη μορφή του μονομερούς της, τόσο σε στερεή κατάσταση όσο και σε διάλυμα. Είναι διαλυτή σε διάφορους οργανικούς διαλύτες, όπως είναι η μεθανόλη, η αιθανόλη, το εξάνιο καθώς επίσης και σε υδατικά μίγματα αυτών. Σε αυτή την τελική περίπτωση των μιγμάτων, η περιεκτικότητα σε νερό δε πρέπει να υπερβαίνει το 60% (Staško, Brezová, Biskurič, & Mišík, 2007). Η μέθοδος αυτή αρχικά θεωρήθηκε ότι περιλάμβανε αντίδραση μεταφοράς ατόμου υδρογόνου. Νεότερες επιστημονικές έρευνες που βασίστηκαν στην κινητική ανάλυση μεταξύ φαινολών και DPPH απέδειξαν ότι η αντίδραση βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων, από τα αντιοξειδωτικά, στη ρίζα DPPH, με σκοπό την εξουδετέρωση της (Huang, Ou, & Prior, 2005). Συγκεκριμένα η ρίζα DPPH[•] (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλιο), η οποία έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm, όταν έρθει σε επαφή με αντιοξειδωτικό, μετατρέπεται σε DPPH:H 2,2-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο. Ο αποχρωματισμός αυτός λειτουργεί ως δείκτης αντιοξειδωτικής δράσης (Foti, 2015).



Εικόνα 19. Εξουδετέρωση ρίζας DPPH από αντιοξειδωτικό και μετατροπή της σε DPPH:H.

3.3.2 Υλικά και αντιδραστήρια

- I. Ρίζα DPPH
- II. Μεθανόλη

III. Trolox

IV. Αποστειρωμένο απιονισμένο νερό, χωρίς πυρετογόνα

3.3.3 Πειραματική διαδικασία

Για την Παρασκευή του αντιδραστηρίου της ρίζας DPPH ζυγίσαμε 0,0023 g στερεής ρίζας DPPH τα οποία και διαλύσαμε σε 100mL μεθανόλης, ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 50 μΜ. Το διάλυμα παρέμεινε στο σκοτάδι σε ηρεμία για μισή ώρα.

Η παρασκευή του αντιδραστηρίου DPPH έγινε αυθημερόν, τις ημέρες του πειράματος, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

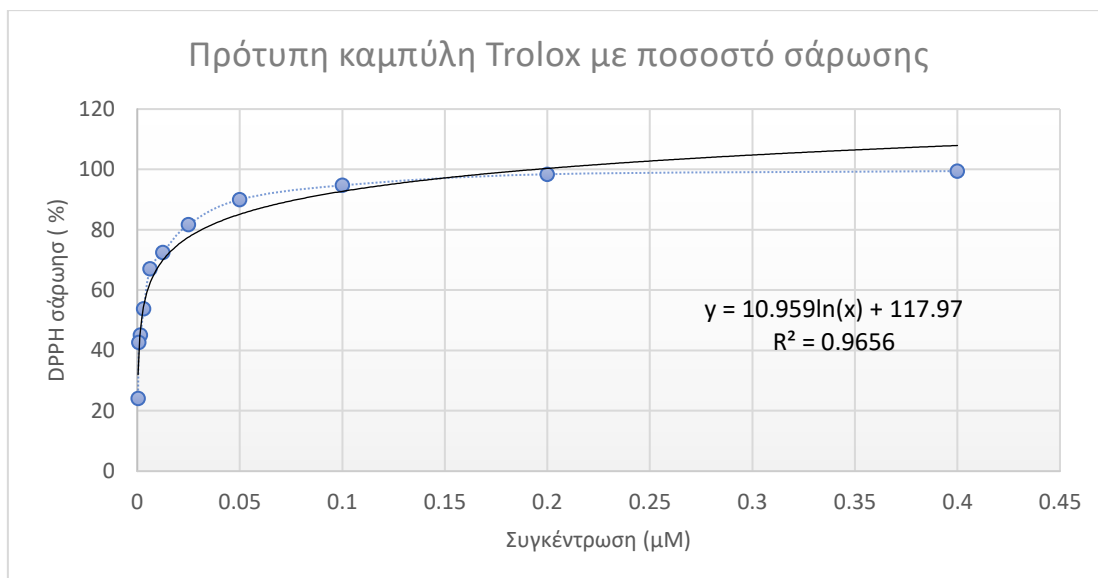
Στη συνέχεια έγινε η προετοιμασία του διαλύματος Trolox (1 mM) για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Παρασκευάστηκε διαλύοντας 0,0250 g Trolox σε 100 mL μεθανόλης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της απορρόφησης σε διάφορες συγκεντρώσεις τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mM (mmol/L) Ισοδύναμα Trolox (TE). Η διαφορά απορρόφησης (ΔΑ) υπολογίζεται βάση της εξίσωσης:

$$\text{DPPH σάρωση (\%)} = ((A_0 - A_A) / A_0) \times 100$$

Όπου: A₀ τιμή απορρόφησης τυφλού, A_A τιμή απορρόφησης δείγματος.

Πίνακας 10. Ποσοστό % σάρωσης DPPH σε διαδοχικές συγκεντρώσεις του Trolox για παρασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Συγκέντρωση (μΜ)	Μέση Απορρόφηση	Μέση τιμή της DPPH σάρωσης(%)	Τυπική απόκλιση SD	Μέση τιμής της DPPH σάρωσης(%)±2 SD	CV(%)
1	0.005	99.44	0.2	99.44±0.4	0.2
0.5	0.014	98.40	0.2	98.40±0.4	0.2
0.25	0.048	94.71	0.5	94.71±1	0.5
0.125	0.09	90.00	0.4	90.00±0.8	0.4
0.063	0.166	81.73	0.7	81.73±1.4	0.9
0.032	0.25	72.50	0.2	72.50±0.4	0.3
0.016	0.3	66.99	0.1	66.99±0.2	0.1
0.0078	0.42	53.79	0.1	53.79±0.2	0.2
0.0040	0.499	45.10	0.3	45.10±0.6	0.7
0.0020	0.521	42.68	0.3	42.68±0.6	0.7
0.0010	0.69	24.10	0.4	24.10±0.8	1.7



Διάγραμμα 5. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς Trolox συγκέντρωσης - % σάρωσης, με μέθοδο σάρωσης ρίζας DPPH.

Ακολούθησε η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα με αρχική συγκέντρωση την $C_0=130 \text{ mg/mL}$, προχωρήσαμε σε διαδοχικές διπλές αραιώσεις οι οποίες φαίνονται στον πίνακα 12. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1 mL. Πρώτα προσθέσαμε το διάλυμα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά τη μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας DPPH, σε αναλογίες που φαίνονται στον Πίνακα 10. Ακολούθησε σύντομη ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση μετρήσαμε την απορρόφηση στα 517nm. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου έγινε με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Επειδή υπάρχει πιθανότητα ίδια εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετρήθηκε και απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης ουσίας μόνο σε μεθανόλη, χωρίς τη ρίζα DPPH και αφαιρέθηκε από τις τελικές απορροφήσεις των δειγμάτων (Πίνακας 11, Πίνακας 13).

Πίνακας 11. Αναλογίες αντιδραστηρίων για μέθοδο DPPH χωρίς την προσθήκη ρίζας

	Τυφλό	Control	C0	C1(C0:2)	C2(C0:4)	C3(C0:8)	C4(C0:16)	C5(C0:32)	C6(C0:64)
Δείγμα			100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL
Μεθανόλη	1000μL	1000μL	900μL	900μL	900μL	900μL	900μL	900μL	900μL
Ντελικός	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

Πίνακας 12. Αναλογίες αντιδραστηρίων για μέθοδο DPPH με την προσθήκη ρίζας

	Τυφλό	Control	C0	C1(C0:2)	C2(C0:4)	C3(C0:8)	C4(C0:16)	C5(C0:32)	C6(C0:64)
Δείγμα			100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL	100μL
Μεθανόλη	1000μL	950μL	850μL	850μL	850μL	850μL	850μL	850μL	850μL
Ρίζα DPPH		50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL	50μL
Ντελικός	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL

Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας με όλες τις απορροφήσεις των προς εξέταση δειγμάτων, χωρίς την προσθήκη της ρίζας, στα 517 nm.

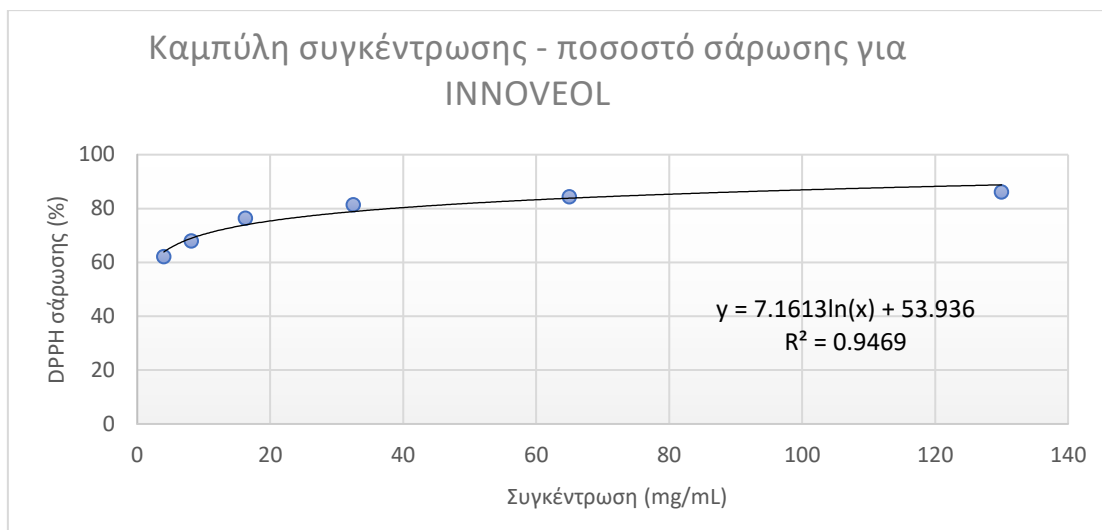
Πίνακας 13. Απορροφήσεις στα 517 nm χωρίς την προσθήκη ρίζας DPPH

C(mg/mL)	Innoveol A(χωρίς ρίζα)	Lupeol A(χωρίς ρίζα)	Saffron A(χωρίς ρίζα)	Dermofeel A(χωρίς ρίζα)	Κουρκουμάς A(χωρίς ρίζα)
130	0.002	0	0.003	0.004	0.002
65	0.002	0	0.002	0.004	0.001
32.5	0.001	0	0.001	0.003	0
16.25	0.001	0	0	0.002	0
8.13	0	0	0	0.001	0
4	0	0	0	0	0
130	0	0	0	0	0

Παρακάτω τα αποτελέσματα των 5 εκχυλισμάτων. Οι τιμές των απορροφήσεων έχουν υπολογιστεί με αφαίρεση των τιμών του πίνακα 13.

Πίνακας 14. Αποτελέσματα Innoveol με μέθοδο σάρωσης DPPH.

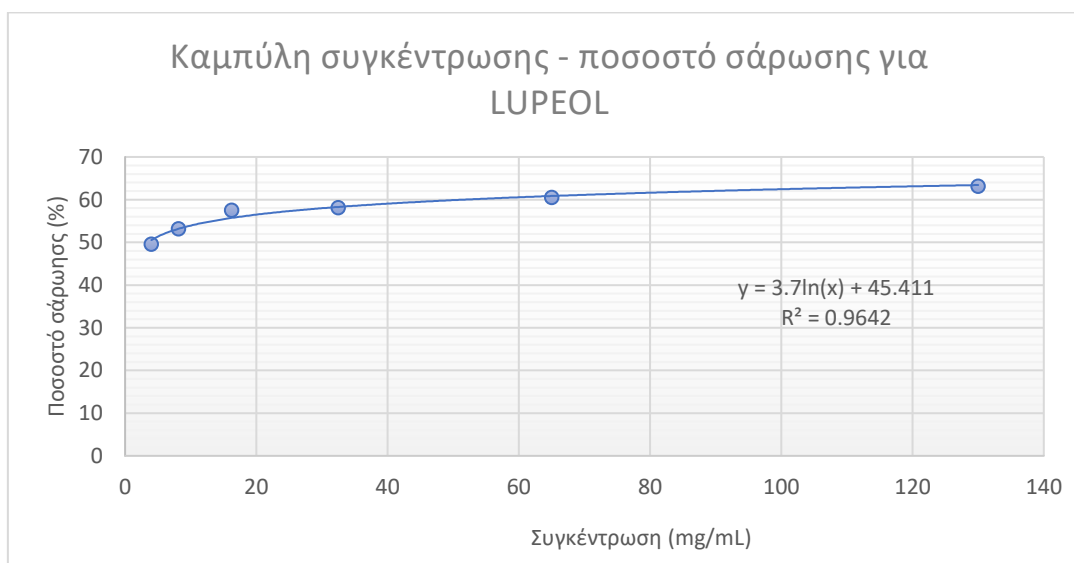
Συγκέντρωση (mg/mL)	Μέση Απορρόφηση	Μέση τιμή της DPPH σάρωσης(%)	Τυπική απόκλιση SD	Μέση τιμή της DPPH σάρωσης(%)± SD	CV(%)
130	0.266	86.1	0.1	86.1±0.2	0.1
65	0.3	84.3	0.2	84.3±0.4	0.2
32.5	0.356	81.4	0.2	81.4±0.4	0.2
16.25	0.45	76.4	0.2	76.4±0.4	0.3
8.13	0.612	67.9	0.3	67.9±0.6	0.4
4	0.725	62.1	0.1	62.1±0.2	0.2



Διάγραμμα 6. Καμπύλη συγκέντρωσης - ποσοστό σάρωσης ρίζας DPPH για Innoevol

Πίνακας 15. Αποτελέσματα Lupeol με μέθοδο σάρωσης DPPH.

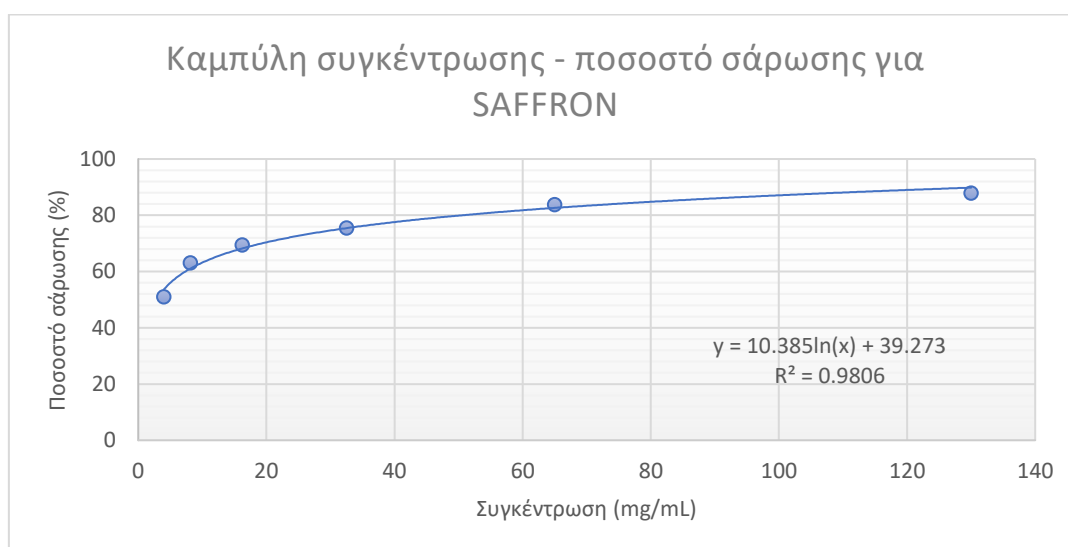
Συγκέντρωση (mg/mL)	Μέση Απορρόφηση	Μέση τιμή της DPPH σάρωσης(%)	Τυπική απόκλιση SD	Μέση τιμές της DPPH σάρωσης(%)±2 SD	CV(%)
130	0.705	63.1	0.2	63.1±0.2	0.3
65	0.755	60.5	0.2	30.5±0.4	0.3
32.5	0.8	58.1	0.2	58.1±0.4	0.3
16.25	0.811	57.5	0.2	57.5±0.4	0.3
8.13	0.889	53.2	0.3	53.2±0.6	0.5
4	0.963	49.6	0.3	49.6±0.2	0.6



Διάγραμμα 7. Καμπύλη συγκέντρωσης - ποσοστό σάρωσης ρίζας DPPH για Lupeol.

Πίνακας 16. Αποτελέσματα Saffron με μέθοδο σάρωσης DPPH.

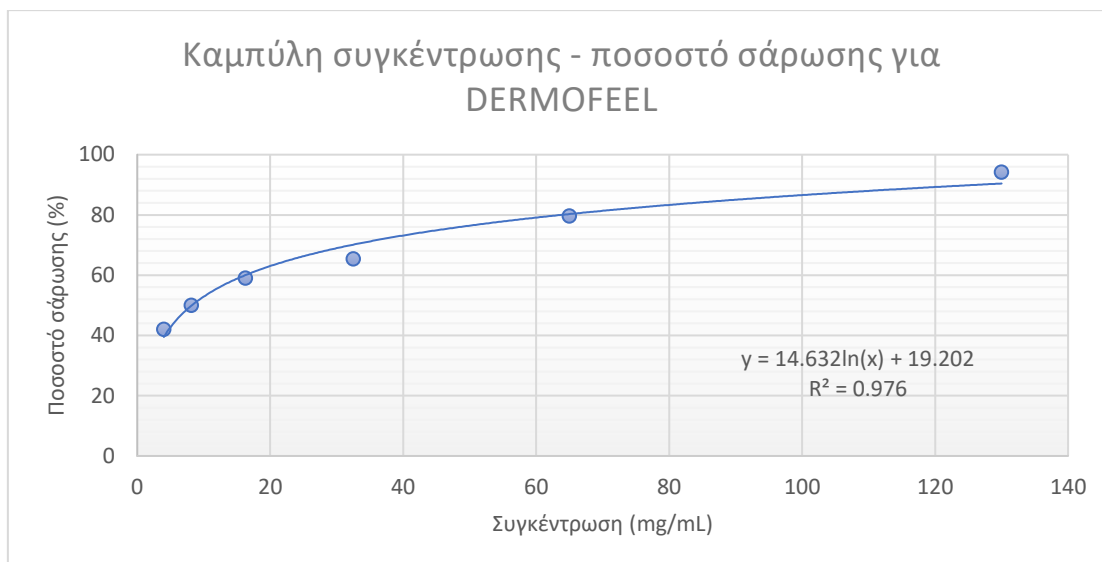
Συγκέντρωση (mg/mL)	Μέση Απορρόφηση	Μέση τιμή της DPPH σάρωσης(%)	Τυπική απόκλιση SD	Μέση τιμή της DPPH σάρωσης(%)±2 SD	CV(%)
130	0.231	87.9	0.1	87.9±0.2	0.1
65	0.31	83.8	0.2	83.8±0.4	0.2
32.5	0.41	75.5	0.2	75.5±0.4	0.3
16.25	0.512	69.5	0.2	69.5±0.4	0.3
8.13	0.599	63.1	0.3	63.1±0.6	0.5
4	0.685	51	0.1	59.8±0.2	0.2



Διάγραμμα 8. Καμπύλη συγκέντρωσης - ποσοστό σάρωσης ρίζας DPPH για Saffron.

Πίνακας 17. Αποτελέσματα Dermofeel με μέθοδο σάρωσης DPPH

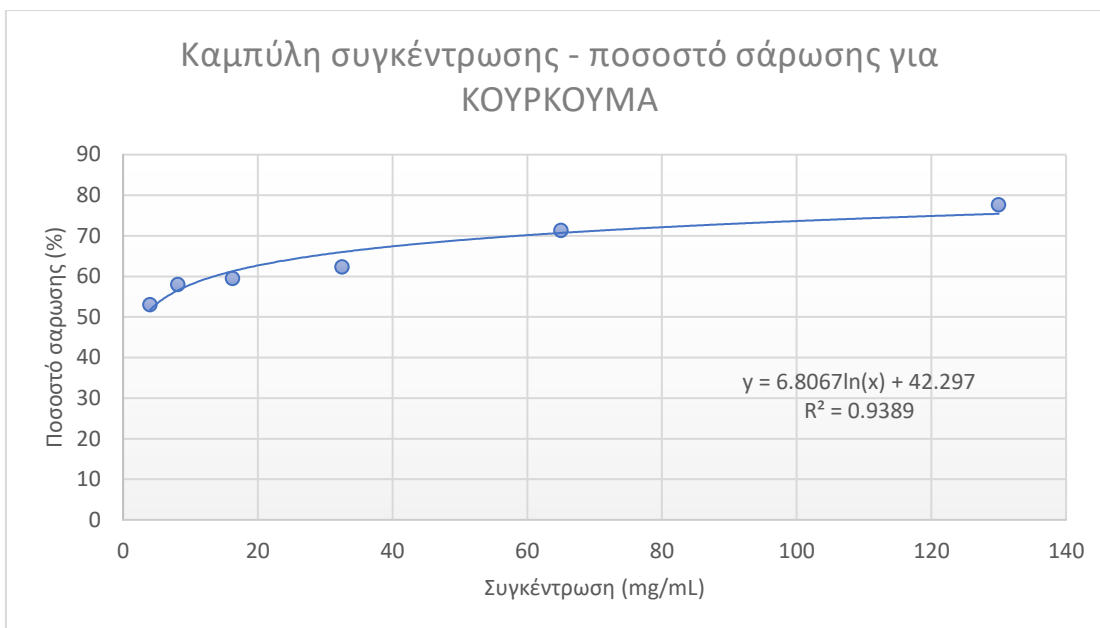
Συγκέντρωση (mg/mL)	Μέση Απορρόφηση	Μέση τιμή της DPPH σάρωσης(%)	Τυπική απόκλιση SD	Μέση τιμή της DPPH σάρωσης(%)±2 SD	CV(%)
130	0.11	94.2	0.2	94.2±0.2	0.2
65	0.39	79.6	0.1	79.6±0.4	0.1
32.5	0.661	65.4	0.1	65.4±0.4	0.2
16.25	0.74	59	0.1	61.2±0.4	0.2
8.13	0.798	50	0.08	58.2±0.6	0.2
4	0.899	42	0.3	50.9±0.2	0.7



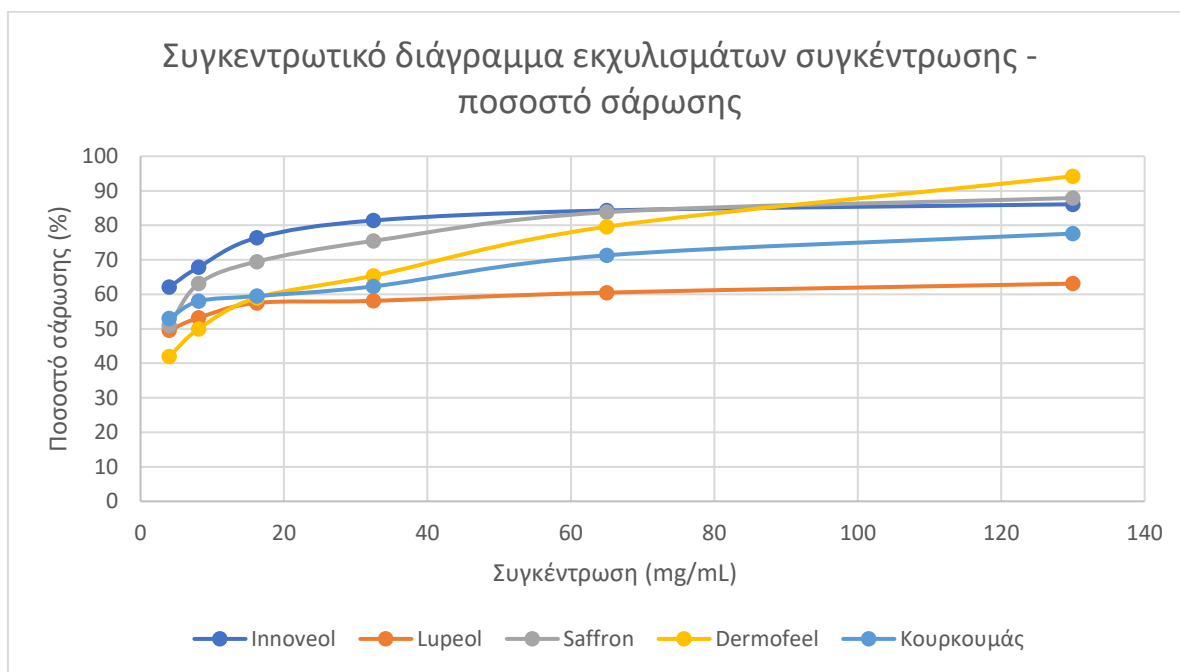
Διάγραμμα 9. Καμπύλη συγκέντρωσης - ποσοστό σάρωσης ρίζας DPPH για Dermofeel

Πίνακας 18. Αποτελέσματα Κουρκουμά με μέθοδο σάρωσης DPPH

Συγκέντρωση (mg/mL)	Μέση Απορρόφηση	Μέση τιμή της DPPH σάρωσης(%)	Τυπική απόκλιση SD	Μέση τιμή της DPPH σάρωσης(%)±2 SD	CV(%)
130	0.427	77.6	0.3	77.6±0.2	0.4
65	0.488	71.3	0.3	71.3±0.4	0.4
32.5	0.541	62.3	0.2	62.3±0.4	0.3
16.25	0.6	59.5	0.3	59.5±0.4	0.5
8.13	0.69	58	0.2	58±0.6	0.3
4	0.789	53	0.1	53±0.2	0.2



Διάγραμμα 10. Καμπύλη συγκέντρωσης - ποσοστό σάρωσης ρίζας DPPH για Κουρκουμά



Διάγραμμα 11. Συγκεντρωτικό διάγραμμα εκχυλισμάτων συγκέντρωση – ποσοστό σάρωσης ρίζας DPPH

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η ισοδύναμη αντιοξειδωτική ικανότητα Trolox (TEAC) των εκχυλισμάτων βάσει της παρακάτω εξίσωσης:

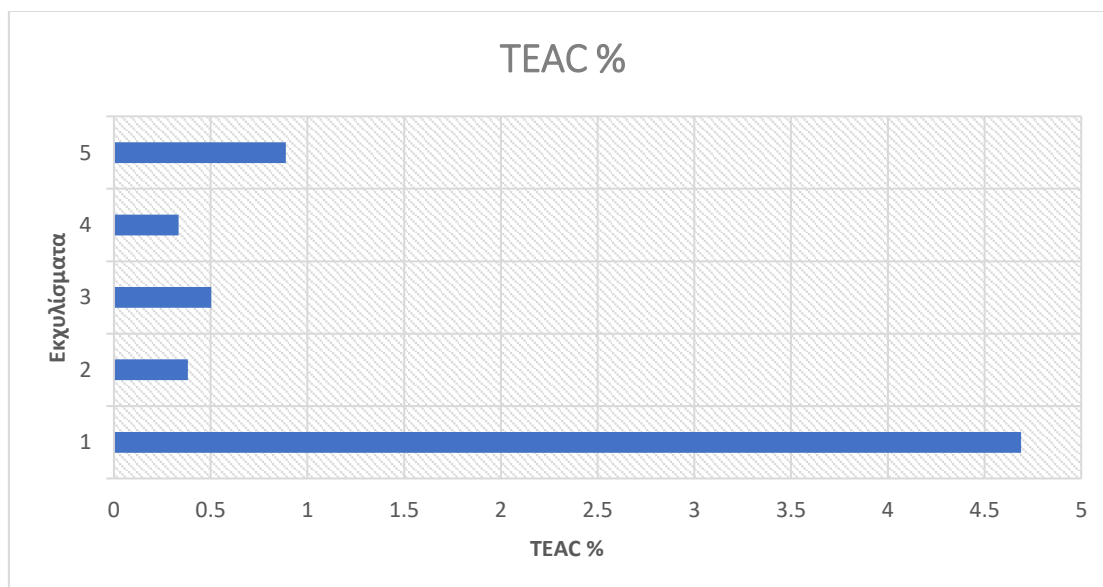
$$TEAC = IC50 \text{ του Trolox (mg/mL) } / IC50 \text{ δείγματος (mg/mL)},$$

Όπου IC50= μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (mg/mL) που απαιτείται για τον καθαρισμό της ρίζας DPPH κατά 50%.

Επειδή στο innoveol δεν μπορέσαμε βάσει των συγκεντρώσεων που είχαμε να φτάσουμε το 50% της σάρωσης υπολογίσαμε τη συγκέντρωση στην οποία θα έχουμε αυτό το αποτέλεσμα μέσω της λογαριθμικής εξίσωσης που προκύπτει από το διάγραμμα Λ. Με τον ίδιο τρόπο υπολογίστηκαν τα IC50 όλων των εκχυλισμάτων για ακριβή σύγκριση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 19. IC50 εκχυλισμάτων με μέθοδο σάρωσης ρίζας DPPH.

	Συγκεντρώσεις (mg/mL) για 50% σάρωση υπολογισμένη από τις λογαριθμικές εξίσωσεις (IC50)	TEAC% (mg/mL)
Innoveol	0.58	4.69
Lupeol	7.12	0.38
Saffron	5.40	0.50
Dermofeel	8.13	0.33
Κουρκουμάς	3.06	0.89



Διάγραμμα 12. Συγκριτικό διάγραμμα ισοδύναμης αντιοξειδωτικής ικανότητα Trolox (TEAC%) των εκχυλισμάτων.

Όσο πιο χαμηλό είναι το TEAC τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση.

4. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Η σημαντικότερη ικανότητα των διάφορων κατηγοριών αντιοξειδωτικών (φαινολικές και πολυφαινολικές ενώσεις, καροτενοειδή κ.α.), που προέρχονται από το φυτικό βασίλειο, είναι η εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών προστατεύοντας τον οργανισμό από τις συνέπειες του οξειδωτικού stress. Δρουν, συνεπώς, κυρίως ως χημειοπροστατευτικοί παράγοντες, απέναντι σε νευροεκφυλιστικές, καρδιαγγειακές και νεοπλασματικές παθήσεις ενώ εμφανίζουν ακόμη και αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση. Τις ιδιότητες αυτές χρησιμοποιεί η βιομηχανία καλλυντικών, τα τελευταία χρόνια, με σκοπό την παρασκευή κοσμητικών σκευασμάτων από φυσικά προϊόντα.

Έτσι στη παρούσα εργαστηριακή μελέτη, αφού διαπιστώθηκε η παρουσία πολυφαινολικών ενώσεων, με τη δοκιμασία Folin-Ciocalteu, επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής τους δράσης, με την παράλληλη χρήση 2 μεθόδων (FRAP, DPPH).-Στη συνέχεια, και μετά την ποιοτική και ποσοτική μέτρηση της παρουσίας φαινολικών, ερευνήθηκε κατά πόσο και σε τι βαθμό τα εκχυλίσματα, εκδηλώνουν μετρήσιμη αντιοξειδωτική δράση. Οι συγκριτικές μετρήσεις έδειξαν στατιστικώς σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα και στις 5 κατηγορίες. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αποδεικνύεται ότι το υψηλό φαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος *dermofeel toco* εκδήλωσε με σημαντική διαφορά το μεγαλύτερο ποσοστό αντιοξειδωτικής δράσης, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα 4 εκχυλίσματα, εκδηλώνοντας τη μέγιστη απορρόφηση στα 8 min στη κινητική μελέτη της μεθόδου FRAP και το χαμηλότερο ποσοστό σάρωσης στην μέθοδο DPPH.

Όσον αφορά στα υπόλοιπα 4 εκχυλίσματα, το *Saffron* απεδείχθει το δραστικότερο εκχύλισμα, με φθίνουσα αντιοξειδωτική ικανότητα τα *innoveol*, *lupeol* και ο *κουρκουμάς*. Στην μέθοδο DPPH τα αποτελέσματα ήταν διαφορετικά με το *innoveol* να παρουσιάζει αρκετά χαμηλή αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα, που είχαν κοντινά αποτελέσματα. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί, ότι η μέθοδος DPPH αμφισβητείται έντονα τελευταία, λόγω προβλημάτων αξιοπιστίας. Συγκεκριμένα, από πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, υποστηρίζεται πως αυτή η τεχνητή ρίζα, είναι πολύ διαφορετική από τις ρίζες που εμφανίζονται πραγματικά στα συστήματα αντιοξειδωσης. Παράλληλα έχει φανεί πως η κινητική της αντίδρασης με DPPH επηρεάζεται σημαντικά

από τη χημική σύνθεση του εκχυλίσματος με σημαντικές διαφορές μεταξύ του IC₅₀, που μετρήθηκαν μετά από 30 λεπτά και 2 ώρες (Fadda, et al., 2014).

Τα ευρήματά μας επιβεβαιώνουν, ποσοτικά, ότι η βιταμίνη E, που αποτελεί βασική πρώτη ύλη σε αρκετά σκευάσματα καλλυντικών, όπως το ερευνηθέν *dermofeel toco*, προσφέρει ιδανική αντιοξειδωση τόσο μέσα στην ίδια τη σύνθεση (σαν συντήρηση - προσθέτοντας βιταμίνη E στα λάδια βάσης, αυξάνεται στη πράξη ο χρόνος ζωής τους), όσο και στον καταναλωτή άμεσα (βελτιώνει σημαντικά την ελαστικότητα της επιδερμίδας-αντιγήρανση) (Abid Keen & Hassan, 2016).

Όλα τα εκχυλίσματα, που αναφέρθηκαν στο θεωρητικό μέρος της παρούσας διπλωματικής, προκύπτουν από διάφορα φυτά και φρούτα (λευκή/μαύρη πεύκη, ευκάλυπτος, *aloe vera*, εσπεριδοειδή κ.α.) και η συνεισφορά τους στην Κοσμητολογία ολοένα και αυξάνεται. Η χρήση φυσικών προϊόντων για την αντιμετώπιση ασθενειών (και όχι μόνο δερματικών) είναι μία διαχρονική τάση, που συνεχίζεται με επιτυχία μέχρι σήμερα, με αναδυόμενες και ελπιδοφόρες καινοτόμες βιοτεχνολογικές εφαρμογές στο προσεχές μέλλον.

Βιβλιογραφία

1. Abid Keen, M., & Hassan, I. (2016). Vitamin E in dermatology. *Indian Dermatology Online Journal*, 7(4):311-5.
2. Adly, A. (2010). Oxidative stress and disease: An updated review. *Research Journal of Immunology*, 129.145.
3. Afak, F., Adhami, V., & Ahmad, N. (2003). Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 86, 28–37.
4. Agostinis, P., Garmynand, M., & Laethem, A. (2007, September 11). The aryl hydrocarbon receptor: an illuminating effector of the UVB response. *Science's STKE*, 403, article pe49.
5. Ames, B., Cathcart, R., Schwiers, E., & Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, 78:6858-6862.
6. Arosio, P., & Harrison, P. (1996, July 31). The ferritins: molecular properties, iron storage function, and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1275(3):161-203.
7. Arredondo, M. (2016). Relationship between vitamin intake and total antioxidant capacity in elderly adults. *Universitas Scientiarum*. 2016;21(2):167-177, pp. 21(2):167-177.
8. Arredondo, M. (2016). Relationship between vitamin intake and total antioxidant capacity in elderly adults. *Universitas Scientiarum*, 21(2):167-177.
9. Ayala, A., Muñoz, M., & Argüelles, S. (2014, May 08). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, pp. 1-3.
10. Baek, J., & Lee, M.-G. (2016). Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Communications in Free Radical Research*, Volume 21, Issue 4, pp: 164-169.
11. Bains, P., Kaur, M., Kaur, J., & Sharma, S. (2018). Nicotinamide: Mechanism of action and indications in dermatology. *Indian. J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 84, 234–237.
12. Barbosa, E., Faintuch, J., Moreira, E., Da Silva, V., Pereima, M., Fagundes, R., & Filh, D. (2009). Supplementation of vitamin E, vitamin C, and zinc attenuates oxidative stress in burned children: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Journal of Burn Care Research*, 30(5):859-66.

13. Barrera, G. (2012). Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *International Scholarly Research Notices*, 137-289.
14. Basu, T., Temple, N., & Garg, M. (1999). Antioxidants in Human Health and Disease. *CABI*, 43.
15. Benzie, I., & Strain, J. (1996, July 15). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, Volume 239, Issue 1, Pages 70-76.
16. Bravo, L. (1998, November). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11):317-33.
17. Brennan, P., & Fedor, C. (1988). Sunlight, UV, and accelerated weathering. *Additives for Polymers*, pp. vol. 18, no. 7, p.
18. Brigelius-Flohé, R., Kelly, F. J., Salonen, J. T., Neuzil, J., Zingg, J.-M., & Azzi, A. (2002, October). The European perspective on vitamin E: Current knowledge and future research. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 76, Issue 4, Pages 703–716,
19. Bure, K. (2010, August 1). Photoaging: the role of oxidative stress. *Europe PMC*, pp. 145(4):445-459.
20. Caritá, A., Fonseca-Santos, B., Shultz, J., Michniak-Kohn, B., Chorilli, M., & Leonardi, G. (2020, February). Vitamin C: One compound, several uses. Advances for delivery, efficiency, and stability. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Volume 24,102117.
21. Cătană, C.-S., Atanasov, A., & Berindan-Neagoe, I. (2018, November 1). Natural products with anti-aging potential: Affected targets and molecular mechanisms. *Biotechnology Advances*, Volume 36, Issue 6, pp. 1649-1656.
22. Cathy, O. (2017). *Weapons of Math Destruction: How Big Data Increases Inequality and Threatens Democracy*. Chicago: Crown Random House.
23. Cheeseman, K., & Slater, T. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, Volume 49, Issue 3, pages 481–493.
24. Cherubim, D., Martins, C., Fariña, L., & Aparecida da Silva de Lucca, R. (2019, August 7). Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*.
25. Cho, D., Park, H., & Kim, K. (2016). Air pollution and skin diseases: adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *Life Sciences*, vol. 152, pp. 126–134.
26. Choe, E., & Min, D. (2006, September). Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, pp. 5(4), 169-186.

27. Cook, N., & Samman, S. (1996, February). Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Volume 7, Issue 2, Pages 66-76.
28. Cui, Q., Du, R., Liu, M., & Rong, L. (2020). Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals. *Molecules*, 25(1); 83.
29. Dai, J., & Mumper, R. (2010, October 21). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, pp. 15(10):7313-7352.
30. Dai, J., & Mumper, R. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis, and Their Antioxidant and. *Molecules*, 15, 7313-7352.
31. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Miltzani, A., & Colombo, R. (2003, March). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *International Journal of Clinical Chemistry*, 329(1-2):23-38.
32. D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*, 43(4):348-61.
33. De Graft-Johnson, J., Kolodziejczyk, K., Krol, M., Nowak, P., Krol, B., & Nowak, D. (2007, May). Ferric-reducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic Clinical Pharmacology & Toxicology*, 100(5):345-52.
34. Draper, H., McGirr, L., & Hadley, M. (1986). The metabolism of malondialdehyde. *Lipids*, 21:305–307.
35. Duester, G. (2008). Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. *Cell*, 134, 921–931.
36. Dunaway, S., Odin, R., Zhou, L., Ji, L., Zhang, Y., & Kadekaro, A. (2018, April 24). Natural Antioxidants: Multiple Mechanisms to Protect Skin From Solar Radiation. p. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00392>.
37. Edwin D., L. (2018). Equol's anti-aging effects protect against environmental assaults by increasing skin antioxidant defense and ECM proteins while decreasing oxidative stress and inflammation. *Cosmetics*, vol. 5, no.1, p.16.
38. El Barky, A., Hussein, S., & Mohamed, T. (2017, October 25). The Potent Antioxidant Alpha Lipoic Acid. *Plant Chemistry and Ecophysiology*, p. 2(1): 1016.
39. Elsayed, N., Omaye, S., Klain, G., & Korte Jr, D. (1992). Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology*, 72(2):153-65.
40. EPA. (2021, June). The EPA United States Environmental Protection Agency. Ανάκτηση από <https://www.epa.gov/no2-pollution/basic-information-about-no2>

41. Esworthy, R., Ho, Y., & Chu, F. (1997, April 1). The Gpx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver. *Archives Biochemistry Biophysics*, pp. 370(1): 59-63.
42. Evers, D., Wang, X., Huong, S.-M., Huang, D., & Huang, E.-S. (2004, August). 3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene (resveratrol) inhibits human cytomegalovirus replication and virus-induced cellular signaling. *Antiviral Research*, Volume 63, Issue 2, Pages 85-95.
43. Fadda, A., Serra, M., Molinu, M., Azara, E., Berberis, A., & Sanna, D. (2014). Reaction time and DPPH concentration influence antioxidant activity and kinetic parameters of bioactive molecules and plant extracts in the reaction with the DPPH radical. *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 35, Issue 2, Pages 112-119.
44. Ferguson, L. (2001, Απριλ 18). Role of plant polyphenols in genomic stability. *475(1-2):89-111*.
45. Foti, M. (2015). Use and Abuse of the DPPH• Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63,40, pages 8765–8776.
46. Friedman, O. (2005). Changes associated with the aging face. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, vol. 13, no. 3, pp. 371–380,
47. Guanglun, M. M., Yang, H., & Yan, W. (2017, October). Building resilience of students with disabilities in China: The role of inclusive education teachers. *Teacher and Teaching Education*, σσ. 125-134.
48. Gupta, R., Dixon, K., Deo, S., Holliday, C., Slater, M., Halliday, G., . . . Mason, R. (2007, March 1). Photoprotection by 1,25 Dihydroxyvitamin D3 Is Associated with an Increase in p53 and a Decrease in Nitric Oxide Products. Volume 127, Issue 3, pp. 707-715.
49. Gutteridge, J. (1978, January 1). Caeruloplasmin: A Plasma Protein, Enzyme, and Antioxidant. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*.
50. Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press.
51. Halliwell, B. (1988, Feb 15). Albumin--an important extracellular antioxidant? *Biochemical Pharmacology*, 37(4):569-71.
52. Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 14-22.
53. Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem Society Symphonia 61*, pp. 73-101.

54. Halliwell, B. (1996, August 1). Free Radicals and Antioxidants: a Personal View. *Nutrition Reviews*, pp. 253-265.
55. Halliwell, B., & Chirico, S. (May 1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 57, Issue 5, pages 715S–725S.
56. Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford Scholarship Online.
57. Hameister, R., Kaur, C., Thameem Dheen, S., Lohmann, C., & Singh, G. (2020, January 2). Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and oxidative stress in arthroplasty. *Journal of Biomedical Materials Research*, abstract.
58. Heinonen, S.-M., Hoikkala, A., Wähälä, K., & Adlercreutz, H. (2003). Metabolism of the soy isoflavones daidzein, genistein, and glycitein in human subjects. Identification of new metabolites having an intact isoflavonoid skeleton. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 87: 285–299.
59. Hiroko, U., Nohara, K., & Fujimaki, H. (1999, March 8). Effect of environmental pollutants on the production of pro-inflammatory cytokines by normal human dermal keratinocytes. *Toxicology Letters*, Volume 105, Issue 1, Pages 17-24.
60. Hoang, H., Moon, J.-Y., & Lee, Y.-C. (2021). Natural Antioxidants from Plant Extracts in Skincare Cosmetics: Recent Applications, Challenges, and Perspectives. *Cosmetics*, 8(4), 106.
61. Hurst, R., Bao, Y., & Williamson, G. (1999). Phospholipid hydroperoxide cysteine peroxidase. *Biochemical Journal*, 338: 723-728.
62. Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., & Janda, K. (2020, April 22). Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Polski Merkurusz Lekarski*, 48(284):124-127.
63. Katiyar, S., Afak, F., Azizuddin, K., & Mukhtar, H. (2001). Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 176, 110–117.
64. Keen, M., & Hassan, I. (2016). Vitamin E in dermatology. *Indian Dermatology Online Journal*, 7(4):311-5.
65. Khan, N., & Mukhtar, H. (2018). Tea Polyphenols in Promotion of Human Health. *Nutrients*, (11,39) page: 1.
66. Kim, D., Kim, M., & Kim, B.-W. (2013). The Antioxidant and Skin Whitening Effect of *Withania somnifera* (Winter Cherry). *Journal of Food Hygiene and Safety*, Volume 30, Issue 3, Pages: 258-264.

67. Klein, D. (2015). Οργανική Χημεία. Στο D. Klein, & Γ. Κόκοτος (Επιμ.). Αθήνα, Ελλάδα: Utopia.
68. Knight, J. (2000, April 30). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of clinical and laboratory science*, pp. (2):145-58.
69. Kochlar, S., & Russell J. (1999). Detection, Estimation, and Evaluation of antioxidants in Food Systems. pp. 19-64.
70. Kolechar, V., Kubikova, K., Rehakova, Z., Kuca, K., Jun, D., Jahodar, L., & Opletal, L. (2008, May Vit Koleckar 1, Katerina Kubikova, Zuzana Rehakova, Kamil Kuca,). Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, (5):436-47.
71. Köpcke, W., & Krutmann, J. (2008). Protection from Sunburn with β -Carotene—A Meta-analysis. *Photochemistry and Photobiology*, 84, 284–288.
72. Krishnamurthy, P., & Wadhvani, A. (2012). *Antioxidant Enzymes and Human Health*. Croatia: Antioxidant Enzyme.
73. Laine, A.-L. (2004). Resistance variation within and among host populations in a plant–pathogen metapopulation: implications for regional pathogen dynamics. *Journal of Ecology*, 92, 990–1000.
74. Lephart, E. (2016, November). Skin aging and oxidative stress: Equol’s anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Research Reviews*, 36-54.
75. Levine, R. (2002, May 1). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology & Medicine*, pp. 32(9):790-6.
76. Lobo V, A Patil, A Phatak, & N Chandra. (2010, July). Free radicals, antioxidants, and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.*
77. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. *Pharmacognosy Reviews*, 118-126.
78. Magalhães, L., Segundo, M., Reis, S., & Lima, J. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, Volume 613, Issue 1, 1-19.
79. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiméne, L. (2004, May). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5):727-47.
80. Manal, A., Abdylkareem, S., & Abeer, A. (2019). *Antioxidant Categories and Mode of Action*.

81. Mancebo, S., & Wang, S. (2015, August 20). Recognizing the impact of ambient air pollution on skin health. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 29, no. 12, pp. 2326–2332.
82. Masaki, H., Okano, Y., & Sakurai, H. (1999, June 28). Generation of active oxygen species from advanced glycation end-products (AGEs) during ultraviolet light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damaging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, pp. Volume 1428, Issue 1, Pages 45-56.
83. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005, October 16). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 16: 577-586:
84. Middleton Jr, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. (2000, December). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, pp. 52(4):673-751.
85. Morita, A. (2007, December 1). Tobacco smoke causes premature skin aging. *Journal of Dermatological Science*, pp. VOLUME 48, ISSUE 3, P169-175,
86. Morrissey, J. (2018, August 2). *The New York Times*. Ανάκτηση από How to Write a Good College Application Essay: <https://www.nytimes.com/2018/08/02/education/learning/writing-college-application-essay.html?ref=collection%2Fsectioncollection%2Feducation&action=click&contentCollection=education®ion=rank&module=package&version=highlights&contentPlacement=2&pgtype=s>
87. Munteanu, I.-G., & Constantin, A. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Science*, 22(7), 3380.
88. Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoshida, N., & Kondo, M. (1998, September Y Naito 1, T Yoshikawa, N Yoshida, M Kondo). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences*, pp. 43(9 Suppl):30S-34S.
89. Nichols, J., & Katiyar, S. (2009). Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.*, 302, 71–83.
90. Nimse, S., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*.
91. Núñez de Castro, Pérez-Gómez, C., & Matés, J. (1999, November). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry J M Matés 1, C Pérez-Gómez, I Núñez de Castro*, 32(8):595-603.

92. Palacea, V., Khapera, N., Qina, Q., & Singala, P. (1999, March Vince PPalacea3NeelamKhapera4QiningQina5Pawan KSingala12). Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 746-761.
93. Patwell, D., McArdle, A., Morgan, J., Patridge, T., & Jackson, M. (2004, October 1). Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 1064-1072.
94. Petruk, G., Del Giudice, R., Manuela Rigano, M., & Monti, D. (2018, August 2). Antioxidants from Plants Protect against Skin Photoaging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
95. Petruk, G., Del Giudice, R., Rigano, M., & Monti, D. (2018). Antioxidants from Plants Protect against Skin Photoaging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity Maria Manuela Rigano,3 and Daria Maria Monti*, Article ID:1454936.
96. Powers, S., & Jackson, M. (2008, October 1). Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Psychological Reviews*(Voll 88, Issue 4), 1243-1276.
97. Pullar, J., Carr, A., & Vissers, M. (2017, August 12). The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients*, 9(8):866.
98. Radak, Z., Asano, K., Inoue, M., Kizaki, T., Oh-Ishi, S., Suzuki, K., . . . Ohno, H. (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in the liver and kidney of rats induced by exhausting exercise. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 72, pages189–194.
99. Rahman, K. (2007, June 2). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, (2): 219–236.
100. Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2):219-236.
101. Rao, C., Rivenson, A., Simi, B., & Reddy, B. (1995). Chemoprevention of Colon Carcinogenesis by Dietary Curcumin, a Naturally Occurring Plant Phenolic Compound. *Cancer Research*, 55 (2): 259–266.
102. Robbins, R., & Grisham, M. (June 1997). Nitric oxide. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 29, Issue 6, pages 857-860.
103. Roeser, H., Lee, G., Nacht, S., & Cartwright, G. (1970, December). The role of ceruloplasmin in iron metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, 49(12): 2408–2417.
104. Runger, T., & Takeuchi, H. (2013). Longwave UV light induces the aging-associated progerin. *The Journal of Investigative Dermatology*, vol. 133, no. 7, pp. 1857–1862.

105. Saewan, N., & Jimtaisong, A. (2015). Natural products as photoprotection. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 14, 47–63.
106. Salvador, A., Sousa, J., & Pinto, R. (2001, November 15). Hydroperoxyl, superoxide and pH gradients in the mitochondrial matrix: a theoretical assessment. *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 1208-12115.
107. Sandur, S., Pandey, M., Sung, B., Ahn, K., Murakami, A., Sethi, G., . . . Aggarwal, B. (2007, August 28). Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin, and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis*, pp. (8):1765-1773.
108. Sasco, A., Secretan, M., & Straif, K. (2004, August). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer*, pp. Volume 45, Supplement 2, Pages S3-S9.
109. Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130: 2073-2085.
110. Serror, K., Boismal, F., Bensussan, A., Laurence, M., Dobos, G., & Zuelgaray, E. (2020, December 9). Skin aging: Pathophysiology and innovative therapies. *Med Sci*, pp. 36: 1163–1172.
111. Shimizu, K., Kondo, R., Sakai, K., Takeda, N., & Nagahat, T. (2001, December). Novel vitamin E derivative with 4-substituted resorcinol moiety has both antioxidant and tyrosinase inhibitory properties. *Lipids*, 36(12):1321-6.
112. Shui, G., & Leong, L. (2004, January 2). Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 1022(1-2):67-75.
113. Sies, H. (2000). *Oxidative Stress and Vascular Disease*.
114. Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. (2017, April 24). Oxidative Stress. *Annual Review of Biochemistry*, pp. Vol. 86:715-748.
115. Stadtman, E. (2004, May 11). Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry*, (9):1105-12.
116. Staško, A., Brezová, V., Biskupič, S., & Mišík, V. (2007). The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. *Free Radical Research*, Volume 41, Issue 4, Pages 379-390.
117. Sun, S.-Y. (2010, January 9). N-acetylcysteine, reactive oxygen species, and beyond. *Cancer Biology & Therapy*, pp. (2): 109–110.
118. Sunil Kumar, B., Singh, S., & Verma, R. (2017, August 13). Anticancer potential of dietary vitamin D and ascorbic acid: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(12):2623-2635.

119. Tanno, O., Ota, Y., Kitamura, N., Katsube, T., & Inoue, S. (2000, September). Nicotinamide increases biosynthesis of ceramides as well as other stratum corneum lipids to improve the epidermal permeability barrier. *The British Journal of Dermatology*, 143(3):524-31.
120. Tozer, S., O'Mahony, C., Hannah, J., O'Brien, J., Kelly, S., Alexander-White, C., & Kosemund-Meynen, K. (2019). Aggregate exposure modelling of vitamin A from cosmetic products, diet, and food supplements. *Food and Chemical Toxicology*, 131, 110549.
121. Ulusoy, H., & Sanlier, N. (2020). A minireview of quercetin: from its metabolism to possible mechanisms of its biological activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(19):3290-3303.
122. Valko, M., Leibfritz, D., Jan, M., Cronin, M., Milan, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Volume 39, Issue 1, 44-84.
123. W.Lim, H., & A. Soter, N. (1993). *Clinical Photomedicine*. New York: Marcel Dekker.
124. Wang, M., Charareh, P., Lei, X., & Zhong, J. (2019). Autophagy: Multiple Mechanisms to Protect Skin from Ultraviolet Radiation-Driven Photoaging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. Article ID 8135985.
125. Wcislo, G., & Szarlej-Wcislo, K. (2014). Colorectal Cancer Prevention by Wheat Consumption: A Three-Valued Logic – True, False, or Otherwise? In *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health* (pp. 91-11). Academic Press.
126. Wijeratane, S., Abou-Zaid, M., & Shahidi, F. (2005). Antioxidant Polyphenols in Almond and Its Coproducts. *J. Agric. Food Chem*, 54, 312–318.
127. Xia, N., Daiber, A., Förstermann, U., & Li, H. (2017). Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, 174:1633-1644, 1633.
128. Xue, X., Zhao, A., Wang, Y., Ren, H., Du, J., Li, D., & Li, Y. (2021, October 14). Composition and content of phenolic acids and flavonoids among the different varieties, development stages, and tissues of Chinese Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.). *PLOS ONE*, Abstract.
129. Yin, H., Xu, L., & Porter, N. (2011, November 23). Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *ACS Publications*, pp. 5944–5972.
130. Yin, H., Xu, L., & Porter, N. (2011, August 23). Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, pp. 5944–5972.
131. Yoshikawa, T., & Naito, Y. (2002, July). What Is Oxidative Stress? *JMAJ*, 45(7): 271–276.

132. Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
133. Καλλιτσουνάκης, Γ. (2016). ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΛΛΩΝ ΙΠΠΟΦΑΟΥΣ ΗΙΡΡΟΡΗΑΕ RHAMNOIDES L.) ΣΕ ΘΕΙΩΜΕΝΟΥΣ ΚΑΙ ΑΘΕΙΩΤΟΥΣ ΟΙΝΟΥΣ & ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ & ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ. Αθήνα.
134. Κουρουνάκη, Α. (2022). Σημειώσεις μοριακής φαρμακολογίας.
135. Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό stress και ενδογενες αντιοξειδωτικό σύστημα: ι. Δραστικές ρίζες Οξυγόνου. *Ελληνική Νεφρολογία*, σσ. 26(3): 151 - 194.
136. Παπαγεωργίου, Γ. (2005). *Βιοχημεία ελεύθερων ριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξειδωση*. Θεσσαλονίκη: University Studio Press.
137. Πνευματικάκης, Γ., Μητσοπούλου, Χ., & Μεθενίτης, Κ. (2006). *Βασικές Αρχές Ανόργανης Χημείας*. Αθήνα: Σταμούλη Α.Ε.
138. Ρέρη, Ε. (2010). *Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων από μέντα*. Λάρισα: Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly.
139. Σωτηρούδης, Γ. (2004). Ελεύθερες ρίζες, αντιοξειδωτικά και υγεία. *Κοινωνία και Υγεία*, 208-210.