



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Χημείας

IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ
ΤΩΝ METHYL ΚΑΙ PROPYL PARABENS
ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΤΗΣ ΚΕΡΑΤΙΝΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ ΤΗΣ
ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑΣ

Πτυχιακή Εργασία
Μπούτσικα Βασιλική
Γαβριήλ Χρήστος

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία, αποβλέπει στην αξιολόγηση της διαβατότητας των ουσιών methyl και propyl parabens, οι οποίες αποτελούν εστέρες του π-υδρόξυ βενζοϊκού οξέος, διαμέσου της κεράτινης στιβάδας της επιδερμίδας σε in vitro πειράματα.

ΣΥΝΤΗΡΗΤΙΚΑ

Συντήρηση ονομάζεται η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη διατήρηση μιας υπάρχουσας κατάστασης ενός προϊόντος, ή για την αποτροπή πιθανής ζημιάς που μπορεί να επέλθει από:

- χημικούς (οξειδωση),
- φυσικούς (θερμοκρασία, φως) ή
- βιολογικούς παράγοντες (μικροοργανισμούς).

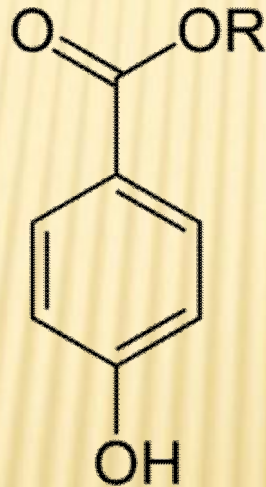
Η κύρια λειτουργία της είναι να καθυστερεί την αλλοίωση των προϊόντων και να αποτρέπει οποιεσδήποτε αλλαγές στη γεύση, τη δομή και στην εμφάνισή τους και πραγματοποιείται με χρήση συντηρητικών.

Ορισμένα παραδείγματα των συντηρητικών είναι :

Αλουμίνιο, Parabens , Ιμιδαζολινική ουρία, Quaternium-15, Φαινόξυαιθανόλη, Φορμαλδεΰδη

PARABENS

IUPAC : p-υδροξυ- βενζοϊκός εστέρας
Όπου R= methyl, ethyl, propyl, butyl



ΧΡΗΣΗ

- ò Τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα συντηρητικά στα καλλυντικά προϊόντα λόγω των αντιβακτηριδιακών και μυκητοκτόνων ιδιοτήτων τους.
- ò Τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα στα καλλυντικά προϊόντα είναι, τα methyl, ethyl, propyl και butyl parabens.
- ò Περισσότερα από ένα paraben χρησιμοποιούνται σε ένα προϊόν και συχνά σε συνδυασμό με άλλους τύπους συντηρητικών για να παρέχουν συντήρηση ενάντια σε ευρύ φάσμα μικροοργανισμών.
- ò Η χρήση των μιγμάτων τους επιτρέπει τη χρήση χαμηλότερων συγκεντρώσεων αυξάνοντας τη συντηρητική δράση.

METHYL PARABEN

ò ΚΑΤΑ ΙΟΥΡΑΚ ΟΝΟΜΑΣΙΑ:

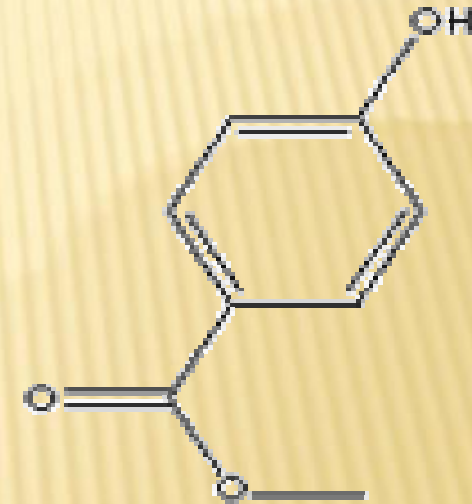
π-υδρόξυ βενζοϊκός μεθυλεστέρας

ò ΧΗΜΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ: $C_8H_8O_3$

ò ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ: 152,15 g/mol

ò CAS No: 99-76-3

ò ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ: Λεπτή, λευκή, άοσμη σκόνη,
εξαιρετικά διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες αλλά
λιγότερο στο νερό



PROPYL PARABEN

ὀ ΚΑΤΑ ΙΟΥΡΑΚ ΟΝΟΜΑΣΙΑ:

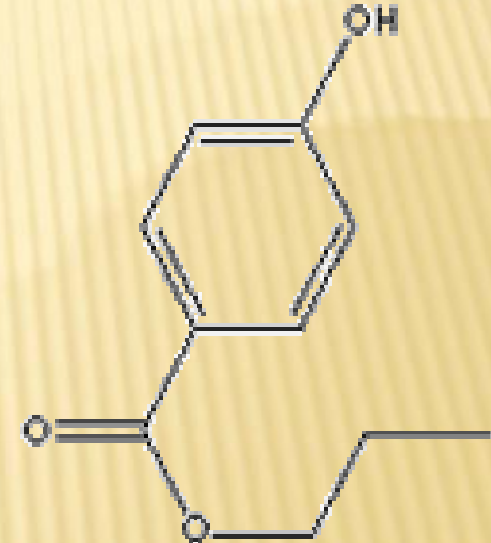
π-υδρόξυ βενζοϊκός προπυλεστέρας

ὀ ΧΗΜΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ: $C_{10}H_{12}O_3$

ὀ ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ: 180,20 gr/mol

ὀ CAS No: 94-13-3

ὀ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ: Λευκή, μικροκρυσταλλική, άοσμη σκόνη, διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες αλλά αρκετά λιγότερο στο νερό (λιπόφιλος χαρακτήρας λόγω υδρογονανθρακικής, πλευρικής αλυσίδας)



ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

- ò Τα Parabens θεωρήθηκαν ασφαλή λόγω της χαμηλής τοξικότητάς τους και της μακροχρόνιας ιστορίας ασφαλούς χρήσης τους
- ò Η Αμερικανική υπηρεσία για την προστασία του περιβάλλοντος αναφέρει ότι οι ουσίες αυτές επιδεικνύουν οιστρογονική δραστηριότητα, ουσιαστικά μιμούνται τις ορμόνες του σώματος παρεμποδίζοντας το ενδοκρινές σύστημα : υποθάλαμο, ωοθήκες, θυρεοειδή
- ò Η οιστρογονική δραστηριότητα αυξάνεται με την αύξηση του μήκους της αλκαλικής αλυσίδας, πιθανόν λόγω αύξησης της λιπόφιλης φύσης τους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο μεγαλύτερος κίνδυνος από τα parabens φαίνεται να προέρχεται από χρήση προϊόντων που απαιτούν παρατεταμένη έκθεση στο δέρμα, όπως οι κρέμες προσώπου και σώματος και τα ανθιδρωτικά. Όσο περισσότερο παραμένουν τα parabens στο δέρμα τόσο περισσότερο το διαπερνούν.

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Parabens εντοπίστηκαν σε δείγματα καρκίνου του μαστού. Τα 18 από 20 δείγματα που εξετάστηκαν, έδωσαν μέση συγκέντρωση σε αυτά 20,6 ng/g ιστού. Η σύγκριση των μεμονωμένων parabens έδειξε ότι το methylparaben εμφάνισε το πιο υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης και αντιπροσώπευε το 62% των συνολικών paraben που εντοπίστηκαν.

Δημοσιευμένες μελέτες δείχνουν ότι τα parabens μέσω του δέρματος εισχωρούν στο σώμα όπου μεταβολίζονται και εκκρίνονται με τα ούρα, η παρουσία όμως άθικτων στον ιστό όγκων δείχνει ότι αυτές οι χημικές ουσίες μπορούν όχι μόνο να απορροφηθούν από το δέρμα αλλά μπορούν επίσης να παραμείνουν και να συσσωρευτούν, στον καρκινικό ιστό του μαστού με την αρχική τους μορφή.

ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1998.

Οι in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι μπορούν να συνδεθούν

- με τους οιστρογονικούς υποδοχείς της μήτρας σε τρωκτικά και
- με τους υποδοχείς των καρκινικών κυττάρων MCF – 7 του μαστού στον άνθρωπο.

Ρυθμίζουν την έκφραση

- του γονιδίου pS2 το οποίο ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα και
- του γονιδίου του υποδοχέα της προγεστερόνης στα καρκινικά κύτταρα του μαστού

Επηρεάζουν τα επίπεδα τεστοστερόνης και την ποιότητα του σπέρματος σε ποντικούς και αρουραίους. Ενώ η χορήγησή τους σε θηλυκούς αρουραίους συσχετίστηκε με μειωμένη κινητικότητα του σπέρματος στους αρσενικούς απόγονους

ΕΠΙΤΡΕΠΤΑ ΟΡΙΑ ΤΗΣ Ε.Ε.

Η τρέχουσα οδηγία για τα καλλυντικά προϊόντα 76/768/ΕΕ παράρτημα VI μέρος 1 του 19/09/2007 επιτρέπει τη χρήση των parabens ως συντηρητικά σε συγκεντρώσεις για έναν μόνο εστέρα 0,4% (w/w) ενώ σε μίγμα 0,8% (w/w) όμως η συγκέντρωση του καθένα δεν μπορεί να ξεπερνά το 0,4% (w/w)

ΔΕΡΜΑ

- ò Είναι ένα από τα μεγαλύτερα όργανα του σώματος.
- ò Λειτουργεί ως ανθεκτικό προστατευτικό κάλυμμα ενάντια στην υγρασία και την επιβλαβή ακτινοβολία του ηλίου.
- ò Μας προστατεύει από τα μικρόβια, εμποδίζοντάς τα να εισχωρήσουν στον οργανισμό μας.
- ò Ρυθμίζει τη θερμοκρασία του σώματός μας, στους 36,4 με 37 βαθμούς Κελσίου.

Το δέρμα αποτελείται από 3 στιβάδες

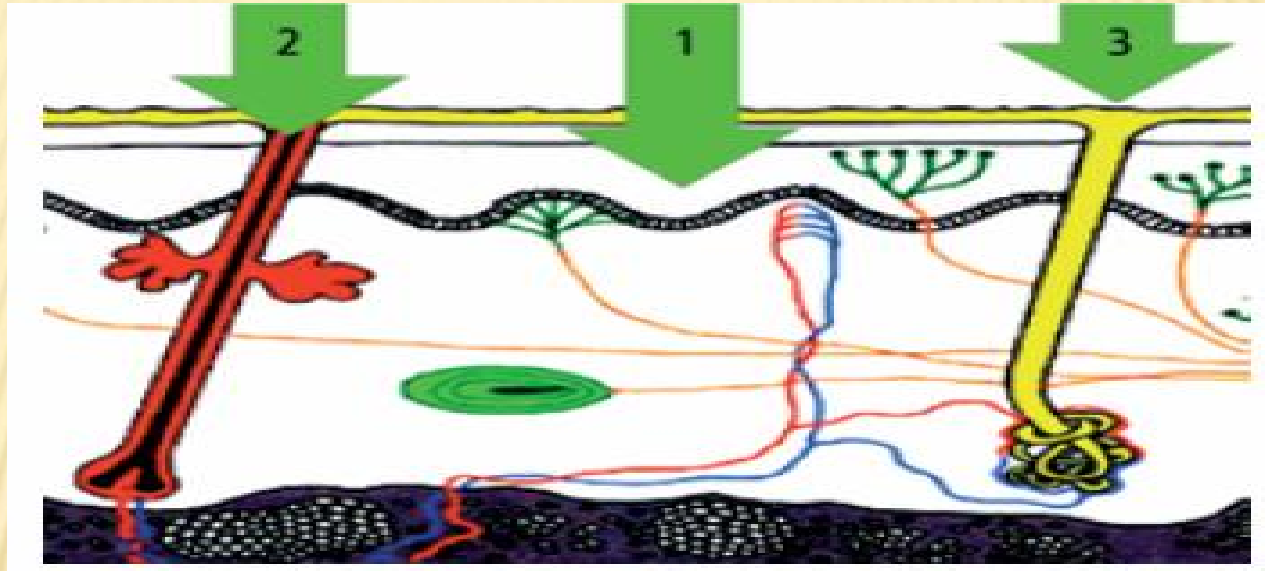
- ò την επιδερμίδα
- ò το κυρίως δέρμα, ή χόριο
- ò το υπόδερμα, ή υποδόριο συνδετικό ιστό

Ο ΦΡΑΓΜΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑΣ

- ò Υδρολιπιδικός μανδύας
- ò Κεράτινη στοιβάδα (το πιο ισχυρό φράγμα)
- ò Μεμβράνη Rein (το πιο λεπτό φράγμα)

Τα μόρια της εισαγώγιμης ουσίας, αφού περάσουν το τριπλό επιφανειακό φράγμα της επιδερμίδας, προσλαμβάνονται από τη ζώσα επιδερμίδα και στη ακολουθεί η διάχυσή τους στο θηλώδες τμήμα του χορίου

ΟΔΟΙ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ ΟΥΣΙΩΝ



Οδός 1: διέλευση ουσίας μέσα από την επιδερμίδα

Οδός 2: θύλακας της τρίχας και σμηγματογόνοι αδένες

Οδός 3: ιδρωτοποιοί αδένες

ΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ FRANZ

Τα περισσότερα σχέδια στατικών κυττάρων είναι βασισμένα στις δημοσιεύσεις του Franz τη δεκαετία του '70.

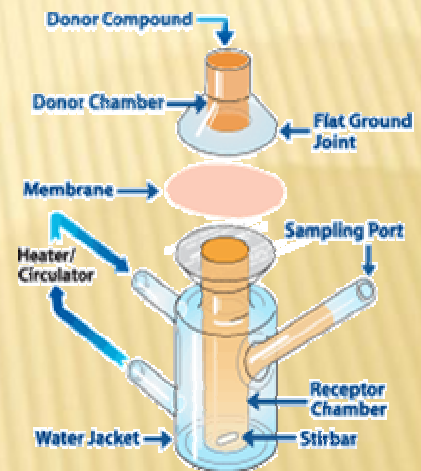
Αυτά αποτελούνται από δύο κομμάτια τα οποία είναι φτιαγμένα από βοριοπυριτική ύαλο.

◦Θάλαμος δότη (πάνω τμήμα)

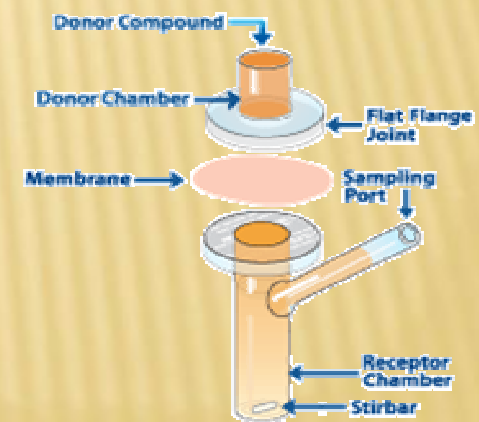
◦Θάλαμος δέκτη (κάτω τμήμα)

Η κάτω επιφάνεια του θαλάμου δότη και η άνω επιφάνεια του θαλάμου δέκτη συζευγνύονται και εκεί είναι το σημείο όπου φιλοξενείται η μεμβράνη μέσω της οποίας θα μελετηθεί η διαπέραση, η οποία σταθεροποιείται μέσω ενός δακτυλίου από Teflon. Τα κομμάτια συγκρατούνται από μεταλλικό σφιγκτήρα.

Ο θάλαμος του υποδοχέα μπορεί να διαθέτει υδατοχιτώνιο ώστε με έναν απλό κυκλοφορητή να διατηρείται η θερμοκρασία σταθερή ή να μην διαθέτει και να χρειάζεται να βρίσκεται βυθισμένος σε υδατόλουτρο κατά τη διάρκεια του πειράματος (32°C) επιπλέον στον πάτο του θαλάμου τοποθετείται μαγνητικός αναδευτήρας ώστε καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος το διάλυμα να αναδεύεται με σταθερό ρυθμό. Ο θάλαμος του υποδοχέα έχει έναν βραχίονα από τον οποίο γεμίζεται ο θάλαμος με διάλυμα του υποδοχέα στο οποίο πραγματοποιείται η ανάλυση

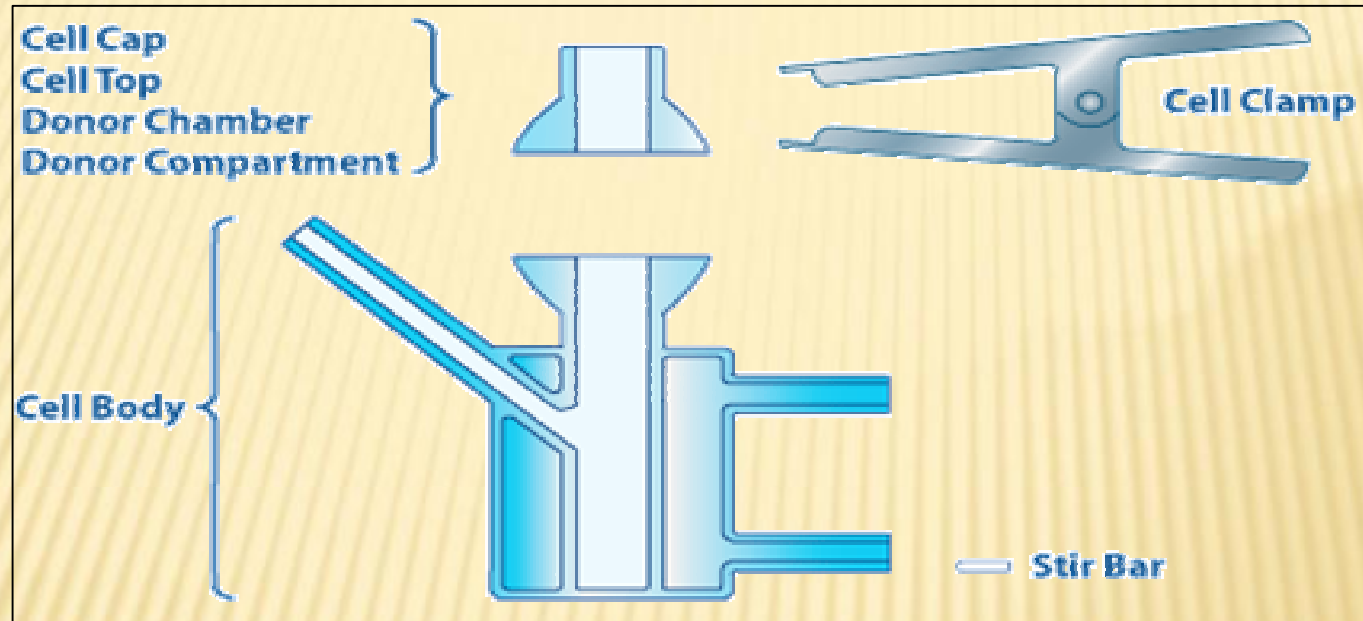


Με υδατοχιτώνιο



Χωρίς υδατοχιτώνιο

ΚΥΤΤΑΡΑ FRANZ



Αυτά αποτελούνται από δύο κομμάτια τα οποία είναι φτιαγμένα από βοριοπυριτική ύαλο.

- Θάλαμος δότη (πάνω τμήμα)
- Θάλαμος δέκτη (κάτω τμήμα) και
- Μεταλλικό σφικκτήρα

ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗΣ ΤΗΣ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗΣ ΔΙΑΧΥΣΗΣ

- ο Η μεταφορά μιας ουσίας στις βιολογικές μεμβράνες, όπως το δέρμα, είναι ένα σύνθετο φαινόμενο που περιλαμβάνει τις φυσικές, χημικές, και βιολογικές αλληλεπιδράσεις
- ο Όσον αφορά στη μεταφορά μέσω του δέρματος μιας διαλυτής ουσίας, ο νόμος διάχυσης του Fick είναι κοινά αποδεκτός, όπου η διάχυση θεωρείται ότι είναι μια διαδικασία μαζικής μεταφοράς μεμονωμένων μορίων, που επέρχεται από την τυχαία μοριακή κίνηση.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός: Η μελέτη της διαβατότητας μιας σειράς τεσσάρων διαλυμάτων (υπό μορφή γέλης) και ενός φαρμακευτικού σκευάσματος του εμπορίου Flamigel που περιείχε τις ουσίες methyl και propyl parabens διαμέσου της κεράτινης στιβάδας της επιδερμίδας του δέρματος.

Εξοπλισμός:

- ò Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού: UV/Vis Συσκευή διήθησης υπό κενό: Millipore
- ò Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (HPLC)
- ò Τροποποιημένα κύτταρα του Franz
- ò Θερμορρυθμιστής
- ò Υδατόλουτρο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ

- ü Δοκιμασία στο UV-Vis
- ü Επιλογή των κατάλληλων συνθηκών της HPLC
- ü Μελέτη της αξιοπιστίας της μεθόδου
- ü Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης
- ü Προσδιορισμός του ορίου ποσοτικοποίησης
- ü Μελέτη της διαλυτότητας κορεσμού
- ü Παρασκευή των προς μέτρηση δειγμάτων
- ü Πραγματοποίηση του 24ωρου πειράματος διάχυσης
- ü Ανάλυση των δειγμάτων
- ü Στατιστική επεξεργασία δειγμάτων

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- ò Μια αντίστροφης φάσης HPLC
- ò Κινητή φάση μεθανόλη: ρυθμιστικό δ/μα (1:1)
- ò Χρόνος έκλουσης του μεθυλεστέρα 4 min ενώ του προπυλεστέρα στα 10 min
- ò Μήκος κύματος ανιχνευτή 256nm
- ò Ρυθμιστικό δ/μα KH_2PO_4 0,025M σε pH=3,5 με H_3PO_4

ΜΕΛΕΤΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΚΟΡΕΣΜΟΥ

Η διαλυτότητα κορεσμού είναι η μέγιστη ποσότητα ουσίας που μπορεί να διαλυθεί σε δεδομένο διαλύτη (διάλυμα του υποδοχέα)

- ✓ Methyl paraben 144.77 mg/mL
- ✓ Propyl paraben 93.10 mg/mL

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- ò Gel 1: methyl:propyl paraben 1:4
- ò Gel 2: methyl:propyl paraben 1:1
- ò Gel 3: διαλυτότητα κορεσμού του methyl paraben
- ò Gel 4: διαλυτότητα κορεσμού του propyl paraben
- ò Gel 5: Flamigel

Διαλύτης : $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 1:1 και
0,125g υδρόξυπρόπυλο κυτταρίνη

24ΩΡΟ ΠΕΙΡΑΜΑ ΔΙΑΧΥΣΗΣ

- ò Προετοιμασία δέρματος
- ò Προετοιμασία διαλύματος του υποδοχέα
- ò Προετοιμασία κυττάρων διάχυσης
- ò Πραγματοποίηση πειράματος
- ò Ανάλυση των δειγμάτων

ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Η έναρξη του πειράματος σηματοδοτείται με την τοποθέτηση 70μL των δραστικών ουσιών πάνω στην επιδερμίδα των κυττάρων διάχυσης και με την επανατοποθέτηση τους στο υδατόλουτρο (χρόνος μηδέν)

Μετρήσεις :

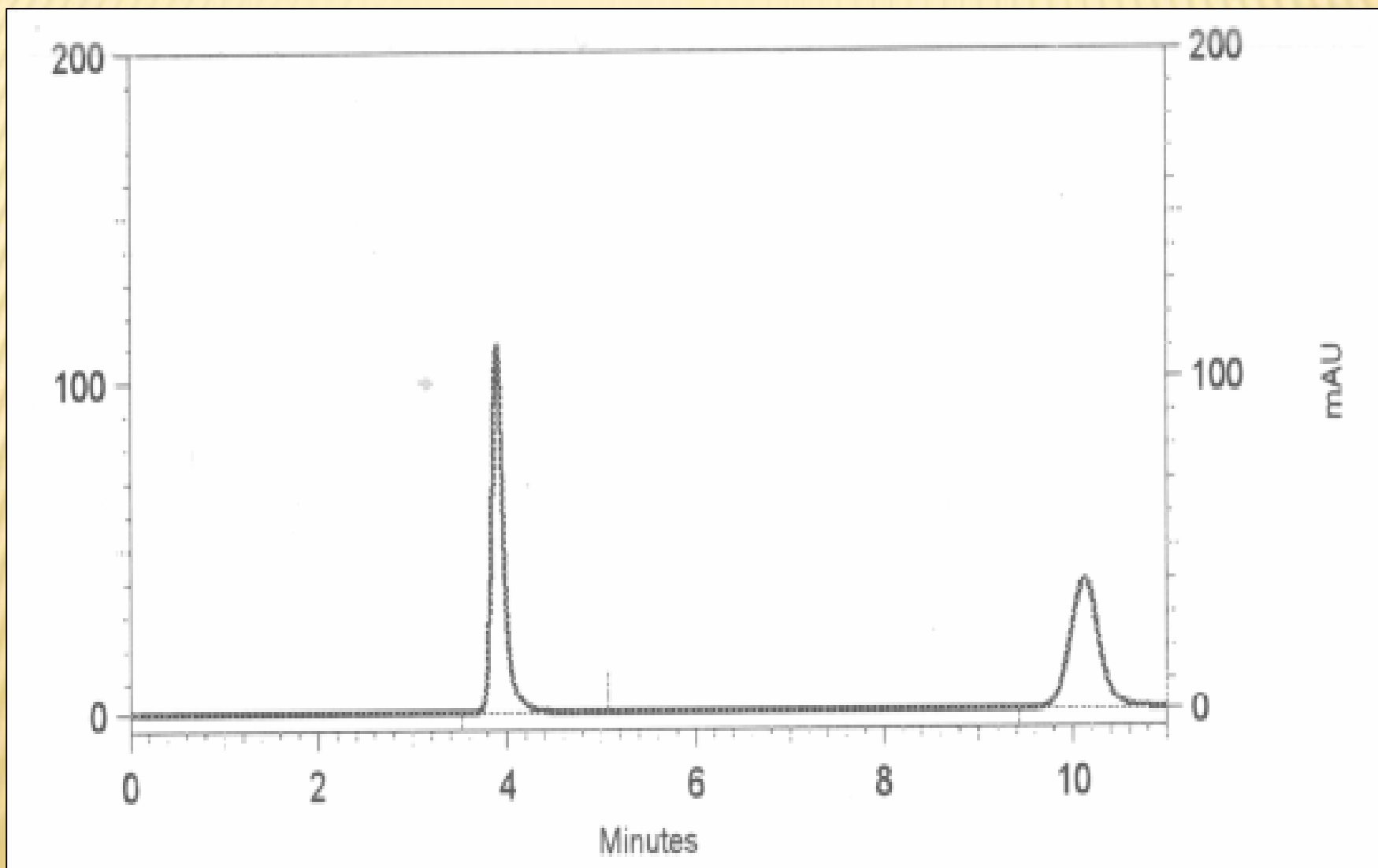
ò 6 ώρες

ò 12 ώρες

ò 24 ώρες

Μετά από κάθε δειγματοληψία γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός των δειγμάτων. Ταυτόχρονα γίνεται και μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης από τα οποία κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς και υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων

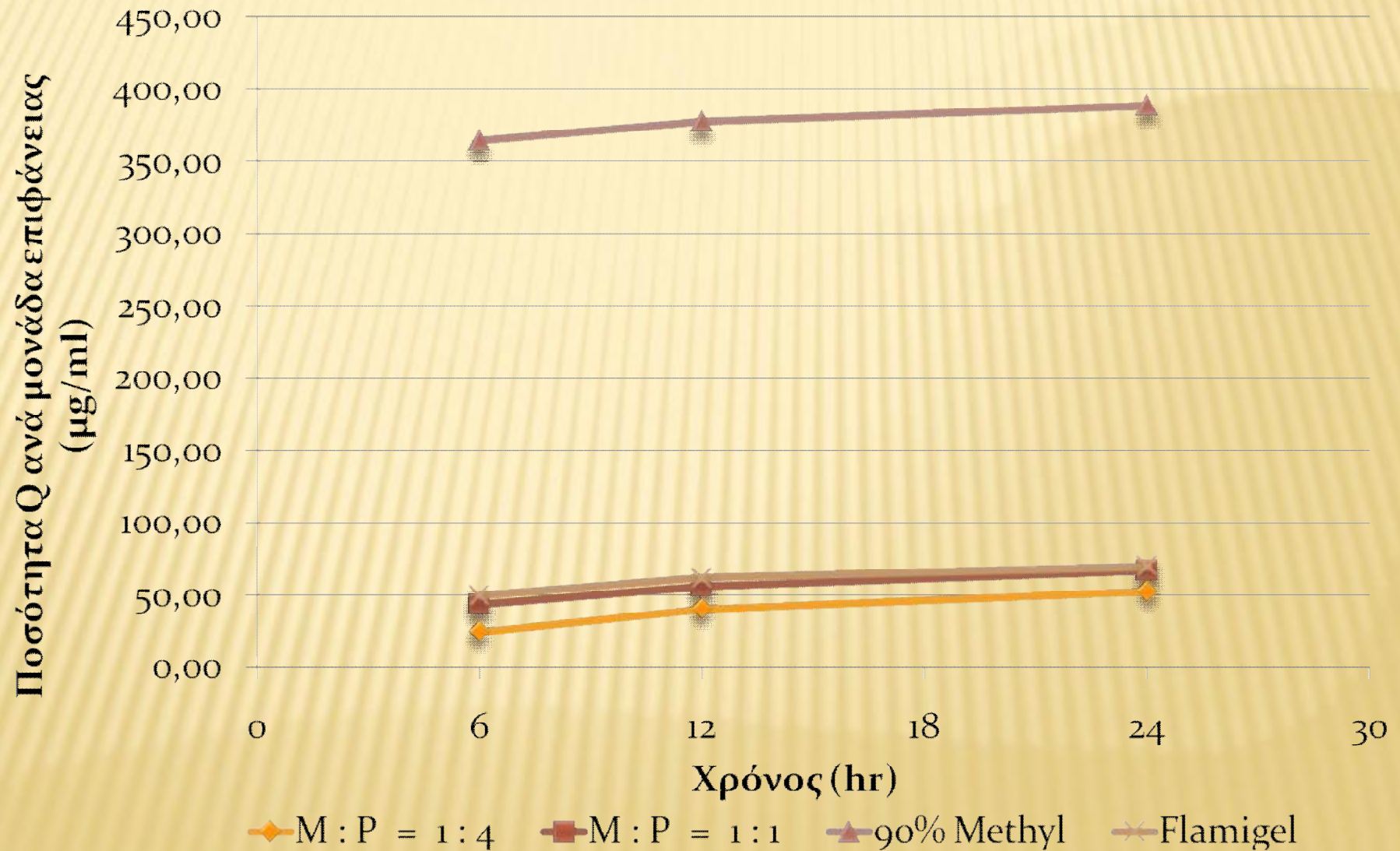
ΤΥΠΙΚΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ



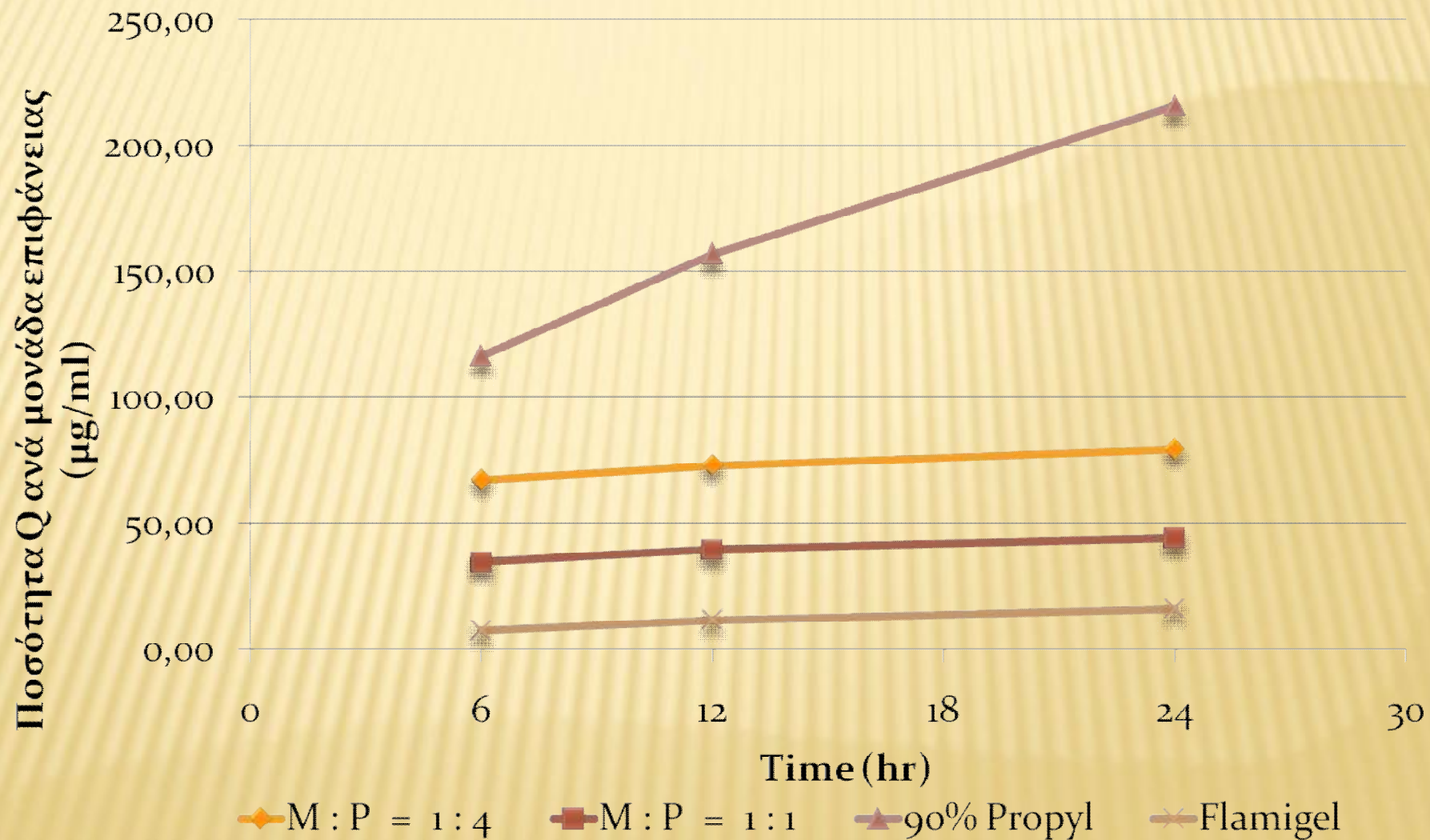
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- ò Από τη συγκέντρωση, το χρόνο, τη διαθέσιμη επιφάνεια και τον όγκο του διαμερίσματος δέκτη, υπολογίστηκε για κάθε μέτρηση και για όλο το εικοσιτετράωρο
- ø η καθαρή διάχυση ή αλλιώς το ποσοστό μεταφοράς ανά μονάδα επιφάνειας J σε $\mu\text{g}/\text{h cm}^2$
- ø καθώς και η ποσότητα των ουσιών που διαπέρασε την κεράτινη στοιβάδα
- ò Πραγματοποιείται με το πρόγραμμα Prism σύγκριση μεταξύ των gel για κάθε δειγματοληψία ώστε να προσδιοριστεί αν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά στις ροές διάχυσης των μετρήσεων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ METHYL PARABEN



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PROPYL PARABEN



Όταν $P > 0,05$ δεν υπάρχει στατιστική διαφορά στις ποσότητες των ουσιών που μετρήθηκαν.

Όταν $P < 0,05$ υπάρχει στατιστική διαφορά.

METHYL PARABEN			
ΣΥΓΚΡΙΣΗ	6h	12h	24h
G1 Vs G2	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
G1 Vs G3	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
G1 Vs G5	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
G2 Vs G3	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
G2 Vs G5	$P > 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
G3 Vs G5	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
PROPYL PARABEN			
ΣΥΓΚΡΙΣΗ	6h	12h	24h
G1 Vs G2	$P < 0,01$	$P < 0,05$	$P > 0,05$
G1 Vs G4	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
G1 Vs G5	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
G2 Vs G4	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$
G2 Vs G5	$P < 0,05$	$P > 0,05$	$P > 0,05$
G4 Vs G5	$P < 0,001$	$P < 0,001$	$P < 0,001$

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η μεγαλύτερη ποσότητα των parabens διαπερνά το δέρμα τις πρώτες έξι ώρες της εφαρμογής από εκεί και μετά η ποσότητα είναι σχεδόν αμελητέα.
- Η ποσότητα του methyl paraben που διαπερνά την επιδερμίδα στις 6, 12 και 24 ώρες για το δείγμα με αναλογία 1:1 (G_1) δεν έχει στατιστική διαφορά με την ποσότητα που διαπερνά την επιδερμίδα στην αναλογία 1:4 (G_2). Παρότι η αρχική συγκέντρωση στην αναλογία 1:1 (G_1) είναι 4,7 φορές μεγαλύτερη από ότι στην αναλογία 1:4 (G_2)
- Η ποσότητα του propyl paraben που διαπερνά την επιδερμίδα στις 24 ώρες για το δείγμα με αναλογία 1:1 (G_1) δεν έχει στατιστική διαφορά με την ποσότητα που διαπερνά την επιδερμίδα στην αναλογία 1:4 (G_2). Ενώ στις 6 και 12 ώρες υπάρχει στατιστική διαφορά. Η αρχική συγκέντρωση στην αναλογία 1:1 (G_1) και στην αναλογία 1:4 (G_2) είναι ίδια.



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Χημείας

IN VITRO ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ
ΤΩΝ METHYL ΚΑΙ PROPYL PARABENS
ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΤΗΣ ΚΕΡΑΤΙΝΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ ΤΗΣ
ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑΣ

Πτυχιακή Εργασία
Μπούτσικα Βασιλική
Γαβριήλ Χρήστος