



ISSN 1105-4999

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ PHARMAKEFTIKI

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
A QUARTERLY EDITION ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS

ΤΟΜΟΣ 28 | ΤΕΥΧΟΣ IV
VOLUME ISSUE

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ - ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2016
OCTOBER - DECEMBER

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ

ΤΡΙΜΗΝΙΑΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΜΕ ΘΕΜΑΤΑ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΟΣ 28, ΤΕΥΧΟΣ IV,
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ - ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2016

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΣΥΝΤΑΞΗΣ

A. Τσαντίλη

Ομοτ. Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Αθηνών,
tsantili@pharm.uoa.gr

ΑΡΧΙΣΥΝΤΑΚΤΗΣ

Γ.Α. Καρίκας

Καθηγητής, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό
Ίδρυμα Αθηνών, karikasg@teiath.gr

ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. Δεμέτζος

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

B. Δημόπουλος

Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

N. Κόλμαν

Galenica SA

X. Κοντογιώργης

PhD, Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. Κουρουνάκης

Ομοτ. Καθηγητής,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Π. Μαχαίρας

Ομοτ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σ. Νικολαρόπουλος

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Γ. Πάιρας

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

E. Παντερή

Αναπλ. Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δ. Ρέκκας

Αναπλ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αθηνών

E-mail για κατάθεση εργασιών:

tsantili@pharm.uoa.gr, karikasg@teiath.gr

Για την ηλεκτρονική έκδοση της «Φαρμακευτικής»
και οδηγίες προς συγγραφείς
επισκεφτείτε την διεύθυνση: www.hsmc.gr

*Τα άρθρα που δημοσιεύονται
στην «Φαρμακευτική» καταχωρούνται
στα Chemical Abstracts, EMBASE,
SCOPUS και EBSCO*

PHARMAKEFTIKI

A QUARTERLY EDITION
ON PHARMACEUTICAL SCIENCES' TOPICS
VOLUME 28, ISSUE IV,
OCTOBER - DECEMBER 2016

EDITOR

A. Tsantili

Emeritus Professor, University of Athens,
tsantili@pharm.uoa.gr

CO EDITOR

G.A. Karikas

Professor, Technological Educational
Institute of Athens, karikasg@teiath.gr

EDITORIAL BOARD

C. Demetzos

Professor, University of Athens

V.J. Demopoulos

Professor, University of Thessaloniki

N. Kolman

Galenica SA

Ch. Kontogiorgis

PhD, University of Thessaloniki

P. Kourounakis

Emeritus Professor,

University of Thessaloniki

P. Macheras

Emeritus Professor, University of Athens

S. Nikolaropoulos

Associate Professor, University of Patras

G. Pairas

Associate Professor, University of Patras

I. Panderi

Associate Professor, University of Athens

D. Rekkas

Associate Professor, University of Athens

E-mail for manuscript submission:

tsantili@pharm.uoa.gr, karikasg@teiath.gr

For "Pharmakeftiki" electronic edition
and instructions to authors
please visit www.hsmc.gr

*Articles published in "Pharmakeftiki"
are indexed in Chemical Abstracts,
EMBASE, SCOPUS and EBSCO*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ / CONTENTS

Κλινιοπτιλόλιθος (Ζεόλιθος): Ανασκόπηση εφαρμογών και χρήσεων. Νεώτερα επιστημονικά δεδομένα

Χρήστος Γ. Γάνος, Νεκτάριος Ι. Πιρμεττής, Ιωάννα Β. Χήνου, Κωνσταντία Γ. Γκραίκου _____ 145 - 160

Clinoptilolite (Zeolite) - New Scientific data fields of uses and applications

Christos G Ganos, Nektarios I Pirmettis, Ioanna B Chinou, Konstantia G Graikou _____ 145 - 160

Noopept: Development and Validation of a UV-Vis Spectrophotometric method for the quantification of (S)-N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester in bulk drug substance

Lyudmyla Antypenko, Bogdan Burlaka, Igor Belenichev _____ 161 - 169

Noopept: Ανάπτυξη και επικύρωση φασματοφωτομετρικής μεθόδου UV-Vis για την ποσοτικοποίηση του (S)-N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester σε φαρμακευτικά σκευάσματα

Lyudmyla Antypenko, Bogdan Burlaka, Igor Belenichev _____ 161 - 169

Clinical/instrumental survey. Cosmetic effectiveness evaluation of a beauty product supporting the reduction of skin blemishes caused by cellulite

Fulvio Marzatico, Angela Michelotti, Michela Qualini, Sofia Sfetsa, Vasia Gitika, Vassilis Panou, Nikos Karagiannidis _____ 170 - 177

Κλινική / Εργαστηριακή έρευνα. Αξιολόγηση της κοσμητικής αποτελεσματικότητας προϊόντος ομορφιάς που υποστηρίζει την μείωση ατελειών του δέρματος οφειλομένων σε κυτταρίτιδα

Fulvio Marzatico, Angela Michelotti, Michela Qualini, Sofia Sfetsa, Vasia Gitika, Vassilis Panou, Nikos Karagiannidis _____ 170 - 177

ZITA MEDICAL MANAGEMENT
1ο χλμ. Παιανίας - Μαρκοπούλου
19002, Παιανία, Ελλάδα
Τηλ.: + 30 211 100 1772
E-mail: t.tassou@zita-management.com

ZITA MEDICAL MANAGEMENT
1st klm Peanias - Markopoulou
19002, Peania, Greece
Tel.: + 30 211 100 1772
E-mail: t.tassou@zita-management.com



Από το όραμα στην πραγματικότητα...

- Website & Ηλεκτρονικό Marketing
- Επιστημονικές Εκδόσεις
- Χορηγίες
- Γραφιστικό - Δημιουργικό
- Γραμματειακή Υποστήριξη
- Τουρισμός Υγείας
- Νοσοκομειακό Marketing
- Γραφείο Τύπου

**Η αποτελεσματικότητα είναι...
η δική μας επιστήμη**

www.zita-management.com



Κλινοπτιλόλιθος (Ζεόλιθος): Ανασκόπηση εφαρμογών και χρήσεων. Νεώτερα επιστημονικά δεδομένα

Χρήστος Γ. Γάνος, Νεκτάριος Ι. Πιρμεττής, Ιωάννα Β. Χήνου, Κωνσταντία Γ. Γκραίκου*

Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιόπολη Ζωγράφου, 15771 Ζωγράφου, Αθήνα

Περίληψη

Η παρούσα ανασκόπηση περιλαμβάνει τις τρέχουσες επιστημονικές μελέτες σχετικά με διάφορους τομείς που χρησιμοποιείται ο ζεόλιθος, ενώ μπορεί να χρησιμεύσει και ως βάση άλλων πειραματικών και κλινικών μελετών. Η αποτοξινωτική δράση του ζεόλιθου είναι γνωστή και ευρύτατα αξιοποιούμενη σε αγρο-βιομηχανικά και ζωοτεχνικά πεδία.

Η νοσοκομειακή χρήση του ζεόλιθου ως δυνητικά επιβοηθητικού έναντι τοξικών αποτελεσμάτων χημειοθεραπείας είναι πολύ σημαντική, αλλά μένει να αποδειχθεί ότι ο ζεόλιθος δεν παρεμβαίνει στην διαδικασία απορρόφησης των φαρμάκων χημειοθεραπείας και δεν μειώνει την βιοδιαθεσιμότητά τους.

KEYWORDS: Κλινοπτιλόλιθος (Ζεόλιθος), αποτοξινωτική δράση, εφαρμογές-χρήσεις, φαρμακολογική δράση

Εισαγωγή

Ο ζεόλιθος (zeolite) είναι ένα ορυκτό το όνομα του οποίου προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις “Ζέω” (βράζω) και “Λίθος” (πέτρα), λόγω της ιδιαίτερης χημικής ιδιότητάς του, κατά τη θέρμανσή του σε υψηλή θερμοκρασία, όταν «ζέει» δηλαδή, να αναδίδει (απελευθερώνει) ατμούς και άρα να αποβάλλει νερό^{1,2}.

Η δημιουργία του αποδίδεται στην αντίδραση του αργιλοπυριτικού πετρώματος «οψιδιανού», που είναι ένα ηφαιστειακό πέτρωμα, με θαλασσινό νερό σε θερμοκρασία 50-60°C. Η διεργασία αυτή είναι εξαιρετικά βραδεία και απαιτήθηκαν δεκαετίες ή και χιλιετίες για την ολοκλήρωσή της και εμφάνιση του ορυκτού στη μορφή που το γνωρίζουμε¹⁻⁷.

Ο επιστήμονας που έδωσε το όνομα στα ορυκτά

αυτά είναι ο Σουηδός Axel Fredrik Cronstedt, μεταλλειολόγος, που το 1756 παρατήρησε πως το ορυκτό Στυλβίτης θερμαινόμενο απελευθέρωνε υδρατμούς, προερχόμενους από το νερό που είχε απορροφήσει. Το 1840 ο Γάλλος μεταλλειολόγος Alexis Damour παρατήρησε ότι κρύσταλλοι του Ζεόλιθου μπορεί να απελευθερώσουν αναστρέψιμα το νερό, χωρίς να μεταβληθεί η δομή τους. Ενώ δέκα χρόνια αργότερα ανακαλύφθηκε η δυναμική τους ικανότητα για ανταλλαγή κατιόντων. Αργότερα διαπιστώθηκε, μετά από εξειδικευμένα πειράματα, πως οι Ζεόλιθοι μπορούν να απορροφούν όχι μόνον νερό, αλλά και μεθυλική και αιθυλική αλκοόλη, βενζόλιο, χλωροφόρμιο και μυρμηκικό οξύ. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία περίπου 30 διαφορετικά στοιχεία και ενώσεις μπορούν να προσροφηθούν από τους ζεόλιθους^{1-3,7}.

*Συγγραφέας για αλληλογραφία: Konstantia Graikou, kgraikou@pharm.uoa.gr

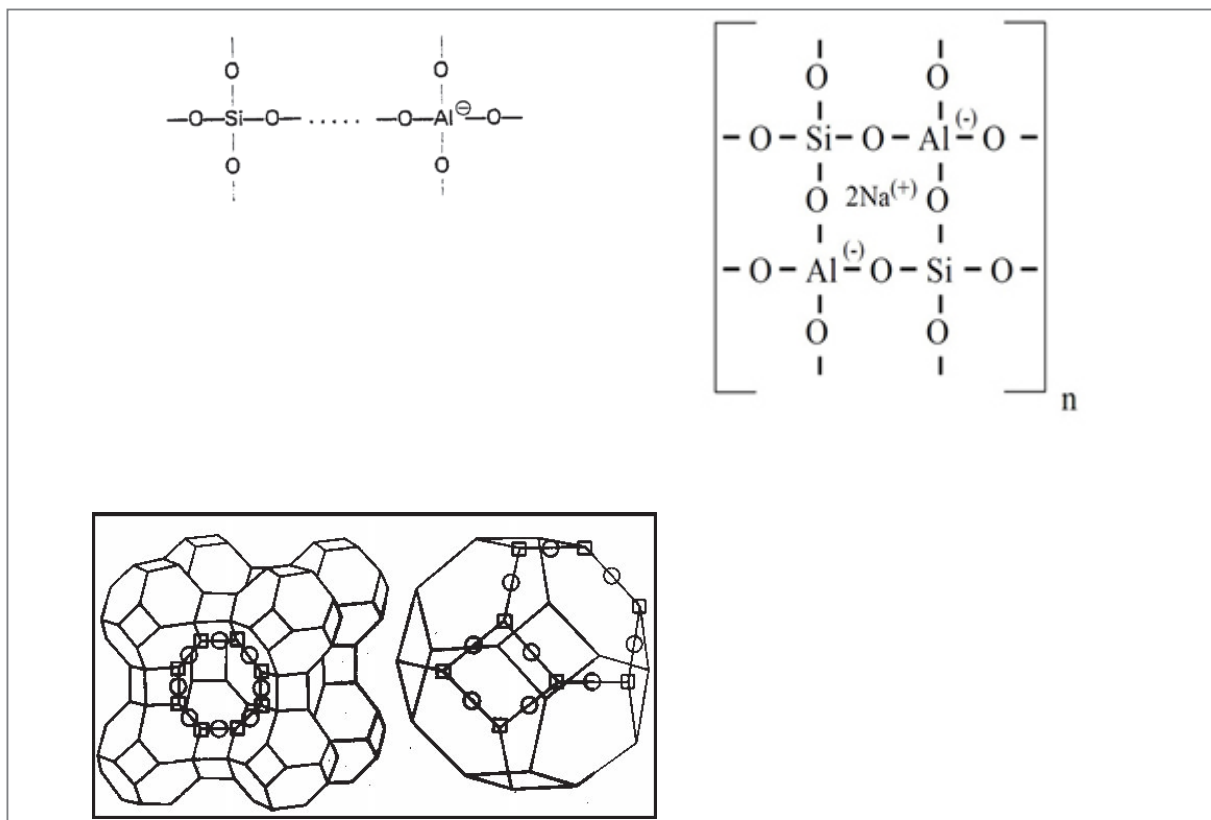


Figure 1: Βασική δομή ζεόλιθου

Οι ζεόλιθοι απαντούν ως γεωλογικά αποθέματα σε όλο τον κόσμο, ιδίως σε πετρώματα που μερικά ή στο σύνολό τους έχουν ηφαιστειογενή προέλευση. Οι φυσικοί ζεόλιθοι πολύ σπάνια είναι καθαροί. Αναλυτικότερα, είναι κρυσταλλικά, ένυδρα αργιλοπυριτικά άλατα κατιόντων αλκαλίων και αλκαλικών γαιών, που αποτελούνται από τετράεδρα SiO_4^{-4} και AlO_4^{-5} που συνδέονται με τα άτομα οξυγόνου. Ειδικότερα, η βασική δομική μονάδα τους είναι ένα περιοδικό πλέγμα ατόμων πυριτίου που περιβάλλονται από τέσσερα άτομα οξυγόνου, έτσι ώστε να σχηματίζονται τετράεδρα, όπως στην καθαρή μορφή του διοξειδίου του πυριτίου, τον χαλαζία. Στους ζεόλιθους μερικά άτομα πυριτίου έχουν αντικατασταθεί από άτομα αργιλίου, που έχουν ένα ηλεκτρόνιο λιγότερο από το πυρίτιο. Έτσι για να διατηρηθεί η δομή των τετράεδρων χρειάζεται ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο, που συνεισφέρεται από ένα άτομο νατρίου, το

οποίο εμφανίζεται θετικά φορτισμένο και βρίσκεται στο «πλέγμα» της δομής. Με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται τετράεδρα ζεόλιθων με ποικιλία διευθετήσεων στο χώρο, σχηματίζοντας πολύ χαρακτηριστικές κοιλότητες (πόρους) σε μια μεγάλη ποικιλία μεγεθών και γεωμετρίας. Στις χαρακτηριστικές αυτές κοιλότητες (πόρους) παγιδεύονται ένα ή περισσότερα μόρια νερού, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ένυδρα μόρια, με το νερό να μην βρίσκεται σε συγκεκριμένη αναλογία. Λόγω της πορώδους δομής τους οι ζεόλιθοι μοιάζουν με διάτρητους «σπόγγους» ή ακόμη και με ελαφρόπετρα, που όμως διατηρούν στο ακέραιο την αντοχή και σκληρότητα των ανόργανων υλικών. Στη φύση απαντώνται περισσότερα από 45 είδη ζεόλιθων. Οι ζεόλιθοι που εμφανίζονται συχνότερα είναι οι: κλινοπτιλόλιθος, μορδενίτης, χαβαζίτης, αναλκίμιτης, φιλλιψίτης, εριονίτης και ευλανδίτης. Ευρύτερες χρήσεις και εφαρμογές βρίσκει ο κλινοπτιλόλι-

Πίνακας 1. Αργιλοπυριτικά μόρια και η χρήση τους στην ιατρική πρακτική. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και θεραπευτικές εφαρμογές^{1,15,16}

Αργιλοπυριτικά μόρια	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά	Θεραπευτικές εφαρμογές
Κλινοπτιλόλιθος (Clinoptilolite)	Φυσικός ζεόλιθος, όπου η κρυσταλλική δομή αποτελείται από δύο τετράεδρα SiO ₄ και AlO ₄ συνδεδεμένα με δεσμούς οξυγόνου. Η δομή έχει πολλούς κενούς χώρους (πόρους) και κανάλια όπου μπορούν να βρίσκονται κατιόντα και μόρια.	• Διατήρηση ανοσοποιητικού • Ισορροπία pH του σώματος • Ελάττωση ελεύθερων ριζών • Εξουδετέρωση και /ή ελάττωση επιβλαβών ουσιών (τοξινών, βαρέων μετάλλων, αλάτων αμωνίου, νιτρο- ζαμινών) • Βελτίωση οξυγόνωσης των ιστών • Διέγερση ανάπλασης του δέρματος σε τραύματα, ουλές-ραγάδες, ερυθρότητα- δερματικούς ερεθισμούς, ακμή και ψωρίαση • Βελτίωση της γενικής κατάστασης της υγείας • Υποβοήθηση-συγχρόησηση, σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στον καρκίνο κ.ά • Ελάττωση έμμεσων παρενεργειών χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας • Αντιαμμοραγικό
Άργιλος (Clay)	Κοκκία διαστάσεων < 2 μm διαμέτρου ιοντοανταλλακτικές ικανότητες και σύντηξη κατιόντων.	• Γαστρεντερικές διαταραχές
Καολίνη (Caoline)	Προσχωσιγενές πέτρωμα αποτελούμενο κυρίως από καολινίτη, ένα ορυκτό πυριτίου του αργίλου.	• Θεραπευτική αντιμετώπιση οξείας διάρροιας • Φαρμακευτικό έκδοχο (αντιμυκητιασικών και αντι-εμετικών φαρμάκων)
Βεντονίτης (Bentonite)	Ορυκτό αργίλου σχηματιζόμενο κυρίως από μοντομιλλονίτη, ασβέστιο και νάτριο.	• Σε δίαιτες, σε παράλληλη χρήση με ψύλλιο, με σκοπό την απομάκρυνση του περιεχομένου και των βλεννών των εντέρων

θος⁷ αφού ένα από τα βασικά και θεμελιακά στοιχεία του είναι η επιλεκτικότητά του όσον αφορά στα βαρέα μέταλλα. Ο κλινοπτιλόλιθος απορροφά πρώτα το Καίσιο, μετά το Μόλυβδο, ύστερα την Αμμωνία, το Νάτριο, το Στρόντιο ενώ, το Κάδμιο, το Χαλκό και τον Ψευδάργυρο τα απορροφά στο ίδιο επίπεδο.

Ο εμπειρικός και ο κρυσταλλικός τύπος του κλινοπτιλόλιθου, του πιο γνωστού από τους φυσικούς ζεόλιθους, είναι: $(\text{Na}, \text{K})2\text{O} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{SiO}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ και $(\text{Na}_3\text{K}_3)(\text{Al}_6\text{Si}_{30}\text{O}_{72}) \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ αντίστοιχα. Τα ιόντα στην παρένθεση είναι τα ανταλλάξιμα ενώ τα υπόλοιπα είναι τα δομικά στοιχεία, τα οποία μαζί με το οξυγόνο, σχηματίζουν τα τετραεδρικά πλαίσια της κρυσταλλικής δομής. Συνοπτικά στους κρυσταλλικούς Ζεόλιθους η σχέση Αργιλίου και Πυριτίου:Οξυγόνου είναι σχεδόν πάντοτε 1:2. Οι ζεόλιθοι ως αργιλοπυριτικά μέλη της οικογένειας μικροπορώδων στερεών, επιτρέπουν τη διέλευση ουσιών με

συγκεκριμένο μέγεθος με αποτέλεσμα να ταξινομούνται σύμφωνα με το μέγεθός του. Όπως επεξηγήθηκε ο κρυσταλλικός σκελετός των Ζεόλιθων είναι η βασική αιτία για τη μικροπορώδη-σπογγώδη υφή τους με τα χαρακτηριστικά κενά. Επίσης λόγω του αρνητικού φορτίου τους οι πόροι αυτοί καταλαμβάνονται από κατιόντα και μόρια νερού, και με αυτό τον τρόπο αποκτούν μεγάλη ανταλλακτική ικανότητα ιόντων, και εξαιρετική προσρόφηση και απελευθέρωση μορίων νερού. Το μέγιστο μέγεθος της ουσίας που μπορεί να διέλθει από τον ζεόλιθο, εξαρτάται από τις διαστάσεις του καναλιού. Οι φυσικοί και οι συνθετικοί, εμπορικά χρησιμοποιούμενοι ζεόλιθοι ως πορώδη υλικά, χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να αποβάλλουν και να προσλαμβάνουν νερό (περίπου το 30% του βάρους τους) με αντιστρεπτό τρόπο, και να ανταλλάσσουν κατιόντα-χωρίς σημαντικές αλλαγές στη δομή τους^{7,8}.

Πίνακας 2. Περιβαλλοντικές μελέτες ζεόλιθων

Εφαρμογή	Συγκέντρωση ζεολίθου	Δείγμα	Αποτελέσματα	Βιβλιογραφικές αναφορές
Δράση κλινοπτιλόλιθου έναντι τοξικότητας μολύβδου (100-500-1000 mg dm ⁻³ σε μύκητες	Ζεόλιθος 3%	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis cinerea</i> και <i>Fusarium culmorum</i>	Ελάττωση 25% της ανάπτυξης <i>A.niger</i> και <i>B.cinerea</i> σε 1000 mg dm ⁻³ Μολύβδου, σχεδόν πλήρη αναστολή της ανάπτυξης του <i>F. culmorum</i> σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν	Harris & Birch 1985 ¹⁸
Δράσεις σιδηρο ζεολίθου FeZW	FeZW 5% ζεολίθου για 3 ώρες	<i>Euglena gracilis</i>	Ελάττωση ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων TBTCI (22.50 μg/g απουσία FeZW έναντι 7.53 μg/g παρουσία FeZW)	Ohta et al. 2001 ¹⁹
Δράσεις ζεολίθου στην απομάκρυνση ιόντων αμμωνίου NH ₄ ⁺ από φυτόχωμα	ζεόλιθος	Φυτόχωμα	απομάκρυνση NH ₄ κατά 98% επί συνολικού όγκου	Liu & Lo 2001 ¹⁰
Δράσεις ζεολίθου στην απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από φυτόχωμα	25% ζεόλιθος	Φυτόχωμα	απομάκρυνση έως 12% Co, 27% Cu, 14% Cr, 30% Fe, 40% Zn, 55% Pb και 60% Ni	Zorpas et al. 2002 ⁷

Χρήσεις - Εφαρμογές

Οι ζεόλιθοι χρησιμοποιούνται ευρύτατα σαν υποστρώματα ανταλλαγής ιόντων σε οικιακές και εμπορικές συσκευές καθαρισμού νερού, στη χημεία ως «μοριακοί ηθμοί», αφού μόνο μόρια με συγκεκριμένο σχήμα και μέγεθος μπορούν να περάσουν, σαν παγίδες μορίων, ώστε αυτά να μπορούν στην συνέχεια να αναλυθούν. Οι ζεόλιθοι έχουν επίσης τη δυνατότητα να διαχωρίζουν με ακρίβεια και εξειδίκευση τα αέρια, συμπεριλαμβανομένων των υδρατμών, CO₂, SO₂. Έχουν ευρεία χρήση στη βιομηχανία, στην προστασία του περιβάλλοντος, στις ιχθυοκαλλιέργειες, τη γεωργία, την κτηνοτροφία και την ιατρική από τη δεκαετία του 1960 και μετά¹.

Γεωργία

Στη γεωργία, ο κλινοπτιλόλιθος χρησιμοποιείται για τη βελτίωση του εδάφους. Λειτουργεί ως μια πηγή που απελευθερώνει με αργό ρυθμό κάλιο, ενώ αν στο ζεόλιθο έχει προστεθεί αμμώνιο, τότε έχει παρόμοια λειτουργία, αποδεσμεύοντας άζωτο.

Οι ζεόλιθοι μπορούν επίσης να δράσουν σαν ρυθμιστές της ποσότητας νερού, καθώς μπορούν να απορροφήσουν μέχρι το 55% του βάρους τους σε νερό και μετά να το απελευθερώσουν ανάλογα με τις ανάγκες των φυτών⁹.

Οι ζεόλιθοι συγκρατούν διάφορες αέριες ουσίες από βιομηχανικά απόβλητα δρώντας ως αποσμητικά φίλτρα. Ενώ επειδή είναι τελείως αβλαβείς, προστίθενται σε ζωοτροφές για να δεσμεύουν τοξικές ουσίες μικρής μοριακής μάζας από τον οργανισμό των ζώων. Επειδή διατηρούν την ικανότητα δέσμευσης μικρών μορίων ακόμη και μέσα στο νερό, τοποθετούνται στα ενυδρεία για να συγκρατούν την αμμωνία που παράγεται από τον μεταβολισμό των ψαριών. Η ευκολία εισόδου ουσιών συνοδεύεται και από σχετική ευκολία εξόδου, με θέρμανση ή μεταβολή της πίεσης, οπότε οι ζεόλιθοι «αδειάζουν και καθαρίζονται» και μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν. Ο ζεόλιθος με τις καλύτερες ιδιότητες είναι ο κλινοπτιλόλιθος, που δεσμεύει επίσης βακτήρια, μύκητες, αέρια, ανόργανες, οργανικές και οργανομεταλλικές ενώσεις και ρυθμίζει προς το ουδέτερο τα όξινα και αλκαλικά εδάφη^{9,10}.

Πίνακας 3. Πειραματικές μελέτες in vivo ζεολίθου

Εφαρμογή	Συγκεντρώσεις ζεολίθου	Δείγμα	Αποτελέσματα	Βιβλιογραφικές αναφορές
Επιπτώσεις συμπληρώματος διατροφής με κλινοπτιλόλιθο	50 g/kg κλινοπτιλόλιθο για 28 ημέρες	120 κοτόπουλα	Σημαντικά αποτελέσματα των συμπληρωμάτων διατροφής, ως προς τον αριθμό αυγών, το πάχος των κελυφών, προσλαμβανόμενης τροφής ($P < 0.01$)	Olver 1997 ²⁰
Αντιαναιμική δράση κλινοπτιλόλιθου και συνθετικών ζεολιθών	Κλινοπτιλόλιθος και συνθετικοί ζεόλιθοι (NaZ) 3% για 31 ημέρες	Weanling Landrace X Yorkshire χοίροι	Μείωση των επιπέδων Cd (μετά την χρήση ζεολίθου 11.4 ppm έναντι 16,6 ppm χωρίς λήψη) Χωρίς τροποποιήσεις στα επίπεδα ηπατικού Fe. Αύξηση των συγκεντρώσεων Zn ($P < 0.001$)	Pond & Yen 1983 ²¹
Προστασία έναντι υποασβεστιαμίας, κέτωσης με χρήση κλινοπτιλόλιθου	Κλινοπτιλόλιθος 2.5% ως συμπλήρωμα διατροφής κτηνιατρική χρήσης και ημερήσια χορήγηση 200 gr	βοοειδή	Προστασία έναντι υποασβεστιαμίας και κέτωσης μετά την γέννα. Βελτίωση (200 gr/d) ανοσολογικής απόκρισης εμβολιασμένων για E. coli βοοειδών Η εισαγωγή του στο πρωτόγαλα νεογνών μειώνει την συχνότητα διαρροικών συμπτωμάτων	Kyriakis et al. 2002 ³
Επιδράσεις της βιοκατανομής Ραδιενεργού Cs-137	50 g/day σιδηροζεόλιθου (ZEOFe)	Πρόβατα	Μείωση των συγκεντρώσεων ισορροπίας του Cs-137 από 15 έως 50 φορές	Jandl & Novosad 1995 ²²
Επίδραση συμπληρωματικής διαίτας με κλινοπτιλόλιθο	Κλινοπτιλόλιθος 1.25% και 2.5%	52 Holstein τύπου αγελάδες	Οι συγκεντρώσεις που ερευνηθηκαν δεν είχαν αρνητική επίπτωση στις συγκεντρώσεις Cu, Zn και Fe στον ορό των αγελάδων	Katsoulos et al. 2006 ¹²
Επίδραση κλινοπτιλόλιθου στην ελάττωση των συγκεντρώσεων αφλατοξινών	50 g/kg κλινοπτιλόλιθο για 4 εβδομάδες	40 νεογνώντα κοτόπουλα	Λιγότερη μείωση της κατανάλωσης τροφίμων (6%) στην ομάδα που ελάμβανε κλινοπτιλόλιθο, ως προς την ομάδα ελέγχου, (14%), με παράλληλη αύξηση του σωματικού βάρους (8%), σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (27%)	Parlat et al. 1999 ²³
Επιδράσεις κλινοπτιλόλιθου σε αφλατοξίνωση	HSCAS 5 g/kg και κλινοπτιλόλιθου 5 g/kg	Αρουραίοι	Αξιόλογη βελτίωση αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων ($P < 0.05$)	Mayura et al. 1998 ¹
Αύξηση βιοδιαθεσιμότητας πυρριτίου από ζεόλιθο	Zeolite A 30 mg/kg, sodium aluminosilicate 16 mg/kg, magnesium aluminosilicate 20 mg/kg και aluminum hydroxyde 675 mg/kg	12 σκύλοι beagle	Ο ζεόλιθος A αύξησε σημαντικά το Si στο πλάσμα ($9.5 + 4.5 \text{ mg hr/L} + \text{SD}$; $P = 0.041$)	Cefali et al. 1995 ¹
Αντιοξειδωτικές και νευροπροστατευτικές δράσεις κλινοπτιλόλιθου	0.6 – 1.25 – 2.5 ng/ml κλινοπτιλόλιθου. Για 5 μήνες	ποντικοί	Σημαντική μείωση κυτταρικού θανάτου επαγόμενου από οξειδωτικές ρίζες (ROS) ($P < 0.001$); μείωση της παραγωγής ROS στα μιτοχόνδρια ($P < 0.001$); σημαντική αύξηση δράσης δι-σμουτάσης στον ιππόκαμπο ποντικών ($P < 0.001$); μείωση των επιπέδων αμυλοειδών πλακών ($P < 0.05$)	Montinaro et al. 2013 ²⁵

Πίνακας 3. Πειραματικές μελέτες in vivo ζεολίθου

Εφαρμογή	Συγκεντρώσεις ζεολίθου	Δείγμα	Αποτελέσματα	Βιβλιογραφικές αναφορές
Επιδράσεις ζεολίθου	1 g/kg ζεόλιθου (61% κλινοπτιλόλιθου)	Αρουραίοι	Σημαντική μείωση αναστολής χολινεστεράσης αναστολή σε διαφορετικούς ιστούς ($P < 0.001$)	Mojzis et al. 1994 ²⁷
Αξιολόγηση καρκινογόνου δράσης κλινοπτιλόλιθου	0, 30, 60mg κλινοπτιλόλιθου	100 Αρουραίοι	Απουσία καρκινογόνου και ογκογόνου δράσης κλινοπτιλόλιθου σε όργανα και ιστούς	Tatrai et al. 1993 ³⁰
Αξιολόγηση αιμοστατικής δράσης προϊόντων κλινοπτιλόλιθου (QC και ACS)	QC and ACS	32 Yorkshire χοίροι	Ελάττωση αιμορραγίας στις ομάδες που ελάμβαναν ζεόλιθο (7.4% QC και 10.3% ACS), σε σχέση με την ομάδα που ελάμβανε κλασική θεραπεία (22.3%); παράταση του χρόνου θανάτου στις ομάδες που ελάμβαναν ζεόλιθο (188 min QC και 194 min ACS), σε σχέση με την ομάδα που ελάμβανε κλασικά φάρμακα (αύξηση κατά 4 ώρες της συνολικής επιβίωσης των ομάδων που ελάμβαναν ζεόλιθο QC ($P < 0.02$))	Arnaud et al. 2007 ²⁸
Αναστολή μελανογένεσης με χρήση ζεόλιθου	Ζεόλιθος 4A 0.16-100 μg/ml	B16F10 Κύτταρα μελανώματος	Ελάττωση μελανογένεσης ($P < 0.001$)	Shin et al. 2010 ²⁰
Αντιδιαρροϊκή δράση Μεταβολές επιπέδου αιματοκρίτη, πλασματικού ινωδογόνου & ολικών πρωτεϊνών	1.5% και 3% κλινοπτιλόλιθου για 6 εβδομάδες	30 νεογννήτα πρόβατα	Μείωση της βαρύτητας εμφανιζόμενης διάρροιας ($P < 0.05$)	Norouzzian et al. 2010 ²⁹
Επιδράσεις συμπληρωμάτων διατροφής με κλινοπτιλόλιθο	0.5% και 1% κλινοπτιλόλιθου για 45 ημέρες	200 κοτόπουλα	Ελάττωση μικροβιακής λοίμωξης εντέρων ($P < 0.05$); αύξηση ρυθμού ανάπτυξης ($P < 0.05$); αύξηση σωματικού βάρους ($P < 0.05$); αύξηση επιπέδων n-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ($P < 0.05$)	Mallek et al. 2012 ¹³
Επιδράσεις κλινοπτιλόλιθου στην αναστολή καρκινικών κυττάρων	85% κλινοπτιλόλιθου για 24 ώρες	Κύτταρα Ινοσαρκώματος προέλευσης ποντικού, Μικροκυτταρικό καρκίνωμα, κύτταρα παγκρεατικού κρκινώματος ανθρώπινης προέλευσης	Αξιοσημείωτη μείωση του αριθμού των ορατών κυττάρων, της σύνθεσης DNA, της δραστηριότητας EGF-R, pKB/Akt και NFKB ($P < 0.01$)	Katic et al. 2006 ³⁰

Πίνακας 3. Πειραματικές μελέτες in vivo ζεολίθου

Εφαρμογή	Συγκεντρώσεις ζεολίθου	Δείγμα	Αποτελέσματα	Βιβλιογραφικές αναφορές
Επιδράσεις του κλινοπτιλόλιθου στη βελτίωση της κατάστασης της υγείας και την πρόληψη δηλητηριάσεων μέσω μυκοτοξινών	2% κλινοπτιλόλιθου για 2 ημέρες και για 14 ημέρες	30 μωσχάρια	Οι τιμές ινωδογόνου στον ορό του πλάσματος, ολικής λευκωματίνης, βήτα και γάμμα σφαιρινών ήταν σημαντικά υψηλότερες μετά από 14 ημέρες ($P < 0.05$)	Mohri et al. 2008 ¹⁶
Επιδράσεις κλινοπτιλόλιθου σε κλινική κέτωση	1% και 2.5% κλινοπτιλόλιθου για 4 εβδομάδες	52 Holstein αγελάδες	Αξιοσημείωτη ελάττωση κέτωσης ($P < 0.01$) και στις δύο χορηγηθείσες συγκεντρώσεις κλινοπτιλόλιθου	Katsoulos et al 2006 ¹²
Επιδράσεις κλινοπτιλόλιθου έναντι αφλατοξίκωσης	15 g/kg κλινοπτιλόλιθου για 42 ημέρες	576 πουλερικά	Ο αριθμός των προσβληθέντων κοτόπουλων και των εκφυλισμών σε όργανά τους ήταν σημαντικά μειωμένος ($P < 0.05$)	Ortatatli et al 2005 ³¹
Επιδράσεις κλινοπτιλόλιθου στη πέψη	Ζεόλιθος 4A 0.16-100 µg/ml	χοίροι	Οι ζεόλιθοι αυξάνουν την πεπτικότητα θρεπτικών στοιχείων μειώνοντας την ταχύτητα μετακίνησης της τροφής στον πεπτικό σωλήνα	Subramaniam & Kim 2015 ⁴

Βιομηχανία χημικών και καυσίμων

Οι εφαρμογές των ζεολιθών στηρίζονται στην ιδιότητά τους να καταλύουν ορισμένες χημικές αντιδράσεις, όπως και στην ιδιότητά τους να κατακρατούν - προσροφούν ορισμένα μόρια. Στη βιομηχανία των καυσίμων χρησιμοποιούνται οι καταλυτικές ιδιότητες των ζεολιθών για τη παρασκευή βενζίνης από ορυκτέλαια, ενώ στη βιομηχανία των απορρυπαντικών χρησιμοποιείται η ιδιότητά τους να προσροφούν ιόντα ασβεστίου αποδίδοντας ιόντα νατρίου, με αποτέλεσμα να αποσκληρύνεται το νερό του πλυσίματος. Άλλες χρήσεις των ζεολιθών είναι στην κατασκευή καταλυτών αυτοκινήτων, όπου συντελούν στην κατακράτηση και εξουδετέρωση του νιτρικού οξειδίου (NO), και στην παραγωγή οξυγόνου για ιατρική χρήση, μέσω της επιλεκτικής προσρόφησης του αζώτου της ατμόσφαιρας^{1,10}.

Η χρήση του ζεολίθου στην κτηνοτροφία

Πολλοί ερευνητές έχουν αποδείξει ότι μια μικρή ποσότητα ζεολίθου στις ζωοτροφές ως ενισχυτικό στη διατροφή των ζώων (άλογα, βοοειδή, αιγοπρόβατα, πουλερικά και χοίρους), βοηθάει στην ταχύτερη ανά-

πτυξη τους, την αύξηση της παραγωγής κρέατος, γάλακτος, αυγών και όλων γενικά των προϊόντων τους και συγχρόνως τα προφυλάσσει από διάφορους επιβλαβείς παράγοντες, προσφέροντας τους καλή υγεία με απόλυτα φυσικό και ακίνδυνο τρόπο τόσο για τα ίδια, όσο και για τους ανθρώπους που καταναλώνουν τα προϊόντα τους^{1,11,12}.

Η επιλόχεια υπασβεστιαμία και η κέτωση είναι από τα πιο κοινά μεταβολικά νοσήματα των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων. Τα τελευταία χρόνια, έχει διεξαχθεί ένας σημαντικός αριθμός ερευνών με σκοπό τον έλεγχο αυτών των ασθενειών με τη χρήση ζεολιθών, ως πρόσθετες ύλες ζωοτροφών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών είναι πολύ ελπιδοφόρα, αφού έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση της εμφάνισης υπασβεστιαμίας και κέτωσης, αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να καθοριστούν οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης των ζεολιθών¹².

Τα μηρυκαστικά (βοοειδή, πρόβατα, κατσίκες κλπ.) διαθέτουν μικροοργανισμούς στο στομάχι τους που μετατρέπουν το μη πρωτεϊνικό άζωτο (NPN) σε αμμωνία και στη συνέχεια την αμμωνία σε αμινοξέα, τα οποία συνθέτουν περαιτέρω πρωτεΐνες. Η παρουσία υψηλών αναλογιών μη πρωτεϊνικού αζώτου στην σίτι-

Πίνακας 4. Κλινικές μελέτες ζεολίθου

Παθολογία	Δόσεις ζεολίθου	Δείγμα	Σχεδιασμός μελέτη	Αποτελέσματα	Βιβλιογραφικές αναφορές
Ανοσοκαταστολή	Megamin 3.6 g/day και Lycoprenomin 1.2 g/day για 6 έως 8 εβδομάδες	61 ασθενείς	Ανοικτή τυ- χαιοποιημέ- νη ελεγχό- μενη μελέτη (controlled open-labeled study)	Σημαντική αύξηση λεμφοκυττά- ρων CD4+ και CD19+ελάττωση CD56+ (Megamin); σημαντική αύ- ξηση λεμφοκυττάρων CD3+ (Lycoprenomin) σημαντική μεί- ωση λεμφοκυττάρων CD56+ (Lycoprenomin); Απουσία ανεπιθύμητων δράσεων	Ivkovic et al. 2004 ³²
Καρκίνος	MULTIZEO Med	2000 ασθενείς	N.d.	Βελτίωση 100% της μετα-χημειο- θεραπευτικής βλεννογονίτιδας,ε- λάττωση 70-80% σε συμπτώματα γαστρίτιδας, εμέτων και διάρροιας και μια μικρή βελτίωση στις γενι- κές εξετάσεις αίματος	Laurino et al. 2015 ¹
Επιπτώσεις του κλινοπιλόλιθου σε ενδοσκοπι- κά αρνητική γα- στροοισοφαγι- κή παλινδρόμηση ENGORD	Absorbatox™ 2.4 D	25 ασθενείς	τυχαιοποιημέ- νη, διπλά-τυ- φλή ελεγ- χόμενη με εικονικό φάρ- μακο (placebo) μελέτη	Μείωση σοβαρότητας των συ- μπτωμάτων καούρας (καύσου), δυσφορίας και πόνου κατά 44%, 54% και 56% αντίστοιχα (P <0,05).	Potgieter et al. 2014 ³³

ση των ζώων δημιουργεί μεγάλες ποσότητες αμμωνίας που απορροφούνται από το αίμα και οδηγούν σε διαφοροποίηση της ισορροπίας των οξέων του αίματος. Ο φυσικός ζεόλιθος, σύμφωνα με πειράματα, έχει την ιδιότητα να προσροφά επιλεκτικά μέχρι και 15% την αμμωνία, με αποτέλεσμα να μειώνει την τοξικότητα της ουρίας και να βελτιώνει την αξιοποίηση της ουρίας ως πρόδρομη ουσία σύνθεσης πρωτεϊνών.

Τα συμπληρώματα διατροφής με ζεόλιθο (0,75% ή 1,5%) που χρησιμοποιήθηκαν σε κοτόπουλα που εκτρέφονται για την παραγωγή κρέατος (κοτόπουλα πάχυνσης) με ανεπαρκή ή οριακά επίπεδα ασβεστίου, είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ασβεστοποίησης των οστών. Κατά συνέπεια, η ενσωμάτωση ζεολίθου στη διατροφή των πουλερικών ασκεί ευεργετική επίδραση στη μείωση της εμφάνισης δυσχονδροπλασίας στα πόδια τους¹³⁻¹⁴.

Φαρμακολογικές δράσεις στον άνθρωπο

Από την δεκαετία του 1960 γίνονται πολυάριθμες μελέτες που επιβεβαιώνουν τα οφέλη της χρήσης του ζεολίθου στην ιατρική, την οδοντιατρική και τη φαρμακολογία^{1,2}.

Συνοπτικά έχουν χρησιμοποιηθεί:

- Στην οδοντιατρική σε σκευάσματα στίλβωσης των δοντιών κ.ά
- Στη χειρουργική ως επουλωτικό τραυμάτων, στυπτικό κ.ά
- Στη γαστρεντερολογία ως συστατικό που μειώνει την οξύτητα του γαστρικού περιεχομένου
- Στη παρασκευή φαρμάκων με αντιδιαρροϊκές ιδιότητες κ.α.

Αναλυτικότερα, πολλές από τις τοξίνες και τα βαρέα μέταλλα που υπάρχουν στο περιβάλλον (λόγω βιομηχανικών αποβλήτων στο έδαφος και στον υδροφόρο ορίζοντα) περνούν στην τροφική αλυσίδα. Τα βαρέα μέταλλα (π.χ. μόλυβδος, αρσενικό, υδράργυρος, κάδμιο, νικέλιο) συσσωρεύονται στον οργανισμό (λιποκύτταρα, τρίχες, ΚΝΣ) με δυνατότητα πρόκλησης χρόνιων ασθενειών. Ο ζεόλιθος ως μοριακός ηθμός μπορεί να επιτρέπει τη δέσμευση βαρέων μετάλλων, τοξινών και ελεύθερων ριζών από τον οργανισμό, ενώ δεν έχει επίδραση (αντίστοιχη δέσμευση) στα επίπεδα των ηλεκτρολυτών. Ορισμένες έρευνες αποδεικνύουν πως οι ζεόλιθοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προσθετικά στην

θεραπεία του καρκίνου, ενώ έχει βρεθεί πως σε μορφή πούδρας για εξωτερική χρήση, μπορούν να επιταχύνουν την επούλωση πληγών, αφού είναι και αντιβακτηριακοί παράγοντες⁸.

Οι αφλατοξίνες (τοξίνες που παράγονται κυρίως από τον μύκητα *Aspergillus flavus* και εντοπίζονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις συχνότερα σε δημητριακά και ξηρούς καρπούς, όταν οι συνθήκες παραγωγής και φύλαξής τους δεν είναι ορθές) αθροιστικά προκαλούν ηπατοτοξικότητα, κίρρωση ενώ είναι εξαιρετικά καρκινογόνες για το ήπαρ. Επιστημονικές *in vivo* μελέτες δείχνουν ότι ο ζεόλιθος απορροφά τις αφλατοξίνες και κυρίως βελτιώνει τη συνολική υγεία. Λόγω αύξησης της συχνότητας μόλυνσης των δημητριακών και των ζωοτροφών με μυκοτοξίνες, η προσθήκη προσροφητικών ουσιών, όπως ο ζεόλιθος (κλινοπτιλόλιθος), έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως πορώδη κρυσταλλικά υλικά που δεσμεύουν και απομακρύνουν τις μυκοτοξίνες. Ο ζεόλιθος είναι προϊόν εγκεκριμένο από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως πρόσθετο ζωοτροφών, για χρήση σε ορνιθοτροφικές και χοιροτροφικές μονάδες ακριβώς ως δεσμευτικό των αφλατοξινών¹⁴.

Περιβαλλοντικές μελέτες

Οι Harris & Birch (1987) μελέτησαν καλλιέργειες μυκήτων (*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* και *Fusarium culmorum*) και τη δράση του κλινοπτιλόλιθου (3%) σε τοξικότητα μολύβδου (Pb) (100-500-1000 mg dm⁻³). Παρατηρήθηκε μείωση 25% της αναστολής ανάπτυξης των *A. niger* και *B. cinerea* σε δόσεις 1000 mg dm⁻³ μολύβδου και *F. culmorum* σε όλες τις πειραματικές συγκεντρώσεις μολύβδου. Ο μηχανισμός δράσης του κλινοπτιλόλιθου βασίζεται στην απορρόφηση του μολύβδου, όπου λόγω ελάττωσης αντίστοιχα της συγκέντρωσης ελαττώνεται και η μυκητιασική τοξικότητα¹⁷.

Οι Ohta et al. (2001) μελέτησαν κύτταρα *Euglena gracilis* που εξέθεσαν σε μόλυνση με tributyltin chloride (TBTCl) 100 μM και 5% σε σιδηρο-ζεόλιθο (FeZW) για 3 ώρες. Ο FeZW ελάττωσε τη συγκέντρωση TBTCl από 22.50 σε 7.53 μg/g. Είναι προφανές ότι ο σιδηρο-ζεόλιθος μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σε αποτοξίνωση μολυσμένου ύδατος από βαρέα μέταλλα¹⁸.

Οι Liu & Lo (2001) απέδειξαν αντίστοιχα καθα-

ρισμό νερού από αμμωνία, με χρήση ζεόλιθου από 20% έως 98%. Επιπροσθέτως ο συνθετικός ζεόλιθος 4A (40-50 μg/l) προστιθέμενος σε καθαριστικό φίλτρο νερού συνετέλεσε στο να μειωθούν σημαντικά οι συγκεντρώσεις ιωδιούχων και ιωδικών ιόντων όπως καϊσίου και βαρίου¹⁹.

Οι Zorpas et al. (2002) αξιολόγησαν την ικανότητα του ζεόλιθου 25% στην απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από φυτόχωμα. Ο ζεόλιθος απομάκρυνε 12% του Co, 27% Cu, 14% του Cr, 30% του Fe, 40% Zn, 55% Pb και 60% Ni⁷.

Ο Haidouti (1997) ερεύνησε την ικανότητα του ζεόλιθου 1%, 2% και 5% στο καθαρισμό εδαφών μολυσμένων με υδράργυρο. Οι συγκεντρώσεις του επιμολυντή ελαττώθηκαν κατά 86% στα υπέργεια μέρη και κατά 58.2% στις ρίζες φυτών που αναπτύχθηκαν στο μολυσμένο έδαφος σε σχέση με φυτά που αναπτύχθηκαν στο ίδιο έδαφος χωρίς χρήση ζεόλιθου⁹.

In vivo πειράματα

Ο Oliver (1997) παρατήρησε ότι η χορήγηση ζεόλιθου ως συμπληρώματος διατροφής (50 g/kg) σε 120 κοτόπουλα για διάστημα 28 ημερών, βελτιώνει σημαντικά την παραγωγή αυγών, όπως και το πάχος του φλοιού των αυγών, το ποσόν της πρόσληψης τροφής καθώς και την «ρεολογία των κοπράνων»²¹.

Οι Pond & Yen (1983) ερεύνησαν τις αντιαναιμικές δράσεις κλινοπτιλόλιθου 3% και συνθετικού ζεόλιθου (NaZ) χορηγούμενων για 31 ημέρες σε (Weanling Landrace X Yorkshire) χοίρους, που ελάμβαναν επίσης δόση χλωριούχου καδμίου (CdCl₂ - 150 ppm) στην αρχή. Η συγκέντρωση καδμίου ελαττώθηκε μετά την χορήγηση των ζεόλιθων από 16.6 ppm σε 11.4 ppm. Κάθε διαφοροποίηση του ηπατικού σιδήρου και νεφρικού καδμίου παρατηρήθηκε και μετρήθηκε και στα δύο πειράματα. Αντίθετα η συγκέντρωση ψευδαργύρου αυξήθηκε μετά τη χορήγηση NaZ (P < 0.001). Συμπερασματικά οι ζεόλιθοι μπορούν δυνητικά να παρέχουν μερική προστασία σε σιδηροπενική αναιμία επαγόμενη από χορήγηση χλωριούχου καδμίου (CdCl₂)²².

Οι Jandl & Novosad (1995) ερεύνησαν τα αποτελέσματα σε χορήγηση ως συμπληρώματος σιδηρο-ζεόλιθου (ZEOFe) σε δόσεις 50 g/die. Ο ZEOFe

μείωσε δραστικά τη συγκέντρωση ραδιενεργού καισίου-137 από 15 έως 50 φορές, ελαττώνοντας τον εντερικό κύκλο (χρόνο ημιζωής) του καισίου²³.

Οι Katsoulos et al. (2005) ανάλυσαν τα δεδομένα χορήγησης ως συμπληρώματος διατροφής κλινοπτιλόλιθου σε 52 (Holstein) αγελάδες 1.25% και 2.5% ως προς τη συγκέντρωση χαλκού, ψευδαργύρου και σιδήρου. Στο τέλος της πειραματικής μελέτης βρέθηκε ότι η χορήγηση του ζεόλιθου δεν επηρέασε τις συγκεντρώσεις των μετάλλων^{2,12}.

Οι Parlat al. (1999) δημοσίευσαν τα αποτελέσματα της χορήγησης ως συμπληρώματος διατροφής κλινοπτιλόλιθου σε δόση 50 g/kg έναντι τοξικότητας συνολικά 2 mg αφλατοξινών (AF 83,06% AFB1, 12.98% AFB2, 2,84% AFG1 και 1.12% AFG2/kg). Οι αφλατοξίνες προστέθηκαν στο διαιτητικό πρόγραμμα διατροφής 40 νεαρών κοτόπουλων (chicks 10 έως 45 ημερών) για διάστημα 4 εβδομάδων. Οι συγγραφείς παρατήρησαν μεγαλύτερα ποσοστά πρόσληψης τροφής στην ομάδα των ζώων που λάμβαναν το ζεόλιθο (6%), σε σχέση με την ομάδα ελέγχου που δεν λάμβαναν ζεόλιθο (14%). Το σωματικό βάρος ήταν μεγαλύτερο στα ζώα που λάμβαναν ζεόλιθο (8%) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου χωρίς πρόσληψη ζεόλιθου (27%). Η προσθήκη των αφλατοξινών στη δίαιτα των ζώων ήταν υπεύθυνη για την ελάττωση πρόσληψης τροφής όπως και για την ελάττωση του σωματικού βάρους, ως αποτέλεσμα της ανισορροπίας των παγκρεατικών και ηπατικών ενζύμων²⁴.

Οι Mayura et al. (1998) αξιολόγησε τον ρόλο ένυδρου αργιλοπυριτικού ασβεστίου νατρίου (HSCAS 5 g/kg), μιας προσροφητικής ένωσης που προέρχεται από ζεόλιθο και μοντμοριλλονίτη, έναντι πειραματικών μοντέλων αφλατοξίκωσης σε αρουραίους (2,5 mg/kg αφλατοξίνης AFS). Η χορήγηση και των δύο ενώσεων προκάλεσε σημαντική βελτίωση των αιματολογικών και βιοχημικών παραμέτρων (αιμοσφαιρίνη, ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα, χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, χολινεστεράση, ολικές πρωτεΐνες, λευκωματίνη, ψευδάργυρο, χαλκό, κρεατινίνη, χολερυθρίνη, ουρικό άζωτο, αλκαλική φωσφατάση και τρανσαμινάσες), οι τιμές των οποίων είχαν επηρεασθεί μετά από πειραματική δηλητηρίαση¹.

Οι Cefali et al. (1995) σύγκριναν την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας πυριτίου από διαφορετικές ενώ-

σεις (ζεόλιθος A 30 mg/kg, αργιλοπυριτικό νάτριο 16 mg/kg, αργιλοπυριτικό μαγνήσιο 20 mg/kg και υδροξείδιο του αργιλίου 675 mg/kg), μετά από απλή χορήγηση σε 12 θηλυκά σκυλιά (beagles). Ελήφθησαν δείγματα πλάσματος και αναλύθηκαν μετά από 24 ώρες, και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο ο ζεόλιθος A αύξησε σημαντικά τα επίπεδα πλάσματος του πυριτίου. Κατά συνέπεια ο ζεόλιθος A μπορεί να είναι αποτελεσματικός σε θεραπεία έναντι της οστεοπόρωσης, χάρη στην διέγερση της ανάπτυξης των οστών, που προκαλείται από την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του πυριτίου. Οι ιδιότητες του ζεόλιθου ερευνήθηκαν επίσης σε επίπεδο αιματογκεφαλικού φραγμού¹¹.

Οι Montinaro et al. (2013) μελέτησαν πειραματικό μοντέλο ασθένειας Alzheimer ποντικών. Οι αντιοξειδωτικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες του κλινοπτιλόλιθου, που χορηγήθηκε μέσω παρεχόμενου νερού (0,6 - 1,25 - 2,5 ng / ml) για 5 μήνες, συνετέλεσε στην εμφάνιση σημαντικής μείωσης του κυτταρικού θανάτου επαγόμενου από ελεύθερες ρίζες (ROS) ($P < 0.001$) στην ομάδα που ελάμβανε κλινοπτιλόλιθο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση των επιπέδων των πλακών αμυλοειδούς ($P < 0,05$). Οι συγγραφείς προτείνουν χρήση κλινοπτιλόλιθου ως δυνητικά επιβοηθητικού στη θεραπευτική αγωγή της νόσου του Alzheimer²⁵.

Οι Nistiar et al. (1984) διερεύνησαν την επίδραση κλινοπτιλόλιθου 1 g/kg, σε χορήγηση από το στόμα, σε αρουραίους που «προ δηλητηρίασαν» με τοξικές δόσεις φυτοφαρμάκου dichlorvos σε δόσεις (200-128 - 81,9 - 65,5 και 52,4 mg/kg). Διερευνήθηκε η επίδραση επί της χολινεστεράσης σε διάφορους ιστούς. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της χολινεστεράσης μετά τη χορήγηση του κλινοπτιλόλιθου ($P < 0.01$)²⁶.

Οι Mojzis et al. (1994) ερευνήσαν τις δράσεις ζεόλιθου (κατά 61% κλινοπτιλόλιθος) στη διακύμανση χολινεστεράσης σε διαφορετικούς ιστούς αρουραίων. Οι αρουραίοι είχαν δηλητηριαστεί με VX ουσία (65,5 μg/g), μία συνθετική νευροτοξική ένωση. Ο ζεόλιθος χορηγήθηκε 5 λεπτά πριν την δηλητηρίαση. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση της αναστολής της χολινεστεράσης σε όλους τους ιστούς που διερευνήθηκαν ($P < 0,001$)²⁷.

Οι Arnauld et al. (2007) μελέτησαν τις αιμοστατικές δράσεις ζεολίθου, χορηγούμενου ως ιατροτεχνολογικού προϊόντος. Αιμορραγίες προκλήθηκαν σε 32 χοίρους Yorkshire με πλήρη διατομή του μηριαίου αγγείου. Παρατηρήθηκε ελάττωση της αιμορραγίας στις ομάδες που ελάμβαναν ζεόλιθο (7.4% QC και 10.3% ACS), σε σχέση με την ομάδα που ελάμβανε κλασσική θεραπεία (22.3%); μεγαλύτερη παράταση του χρόνου θανάτου στις ομάδες που ελάμβαναν ιατροτεχνολογικά προϊόντα με ζεόλιθο (188 min QC και 194 min ACS), σε σχέση με την ομάδα που ελάμβανε κλασσικά φάρμακα (αύξηση κατά 4 ώρες της συνολικής επιβίωσης των ομάδων που ελάμβαναν ζεόλιθο QC (6/8; 75%) σε σχέση με την ομάδα που ελάμβανε κλασσική θεραπευτική αγωγή (1/8; 12.5%) ($P < 0.02$). Επιβεβαίωση του ρόλου του ιατροτεχνολογικού προϊόντος CS στον έλεγχο αιμορραγιών²⁸.

Οι Shin et al. (2010) παρατήρησαν ότι συνθετικός ζεόλιθος (ζεόλιθος 4A) ανέστειλε *in vitro* την παραγωγή μελανίνης σε δοσοεξαρτώμενη αναλογία αποτελέσματος ($P < 0.001$). Κύτταρα μελανώματος ποντικού B16P10 επωάσθηκαν για 24 ώρες με ζεόλιθο 4A σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0,16 και 100 $\mu\text{g/ml}$. Η καρκινογένεση μελανώματος πιθανά επάγεται με αναστολή έκφρασης της μελανοτρόπου ορμόνης της υπόφυσης α -MSH), υπεύθυνης για τη παραγωγής μελανοκυττάρων μέσω του ενζύμου τυροσινάσης. Κατά συνέπεια επαληθεύεται ο αποκλεισμός της έκφρασης της τυροσινάσης των μελανοκυττάρων και η καταστολή της μελανογενέσης-ERK. Αυτά τα αποτελέσματα συντελούν στη πιθανή χρησιμοποίηση του ζεολίθου ως λευκαντικού παράγοντα του δέρματος²⁹.

Οι Norouzian et al. (2010) μελέτησαν τις αντιδιαρροϊκές ιδιότητες, όπως και την επίδραση στα επίπεδα του αιματοκρίτη, στο ινωδογόνο του πλάσματος και στις ολικές πρωτεΐνες κατά τη λήψη συμπληρωμάτων διατροφής με 1.5% και 3% κλινοπτιλόλιθου για 6 εβδομάδες σε 30 νεογέννητα αρνιά. Βρέθηκε στο τέλος του πειράματος ότι και οι δύο συγκεντρώσεις κλινοπτιλόλιθου συνετέλεσαν σε σημαντική μείωση της βαρύτητας της εμφανιζόμενης διάρροιας, χωρίς επίδραση στις ελεγχθείσες αιματολογικές παραμέτρους ($P < 0.05$)²⁹.

Οι Mallek et al. (2012) παρατήρησαν τις επιδρά-

σεις συμπληρωμάτων διατροφής με κλινοπτιλόλιθο 0.5% και 1% για 45 ημέρες σε 200 κοτόπουλα, όπου παρατηρήθηκε ελάττωση μικροβιακής λοίμωξης εντέρων ($P < 0.05$); αύξηση ρυθμού ανάπτυξης ($P < 0.05$); αύξηση σωματικού βάρους ($P < 0.05$); αύξηση επιπέδων n-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ($P < 0.05$)¹³.

Οι Katic et al. (2006) εξέτασαν τις επιδράσεις *in vitro* κλινοπτιλόλιθου 85% στην βιωσιμότητα κυττάρων χάρη στην μεταβολή πρωτεϊνών και γονιδίων. Κύτταρα σαρκώματος ποντικών και ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παγκρέατος καλλιεργήθηκαν με κλινοπτιλόλιθο. Μετά από 24 ώρες καλλιέργειας ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων, η σύνθεση DNA, η δραστηριότητα των EGF-R, pKB/Akt και NFkB μειώθηκαν σημαντικά ($P < 0.01$). Πιθανά η απορρόφηση κλινοπτιλόλιθου από καρκινικά κύτταρα επιδρά στα επίπεδα ασβεστίου και στο μονοπάτι σηματοδότησης του ασβεστίου. Με αυτόν τον τρόπο ο κλινοπτιλόλιθος μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανό ενισχυτικό φαρμάκων θεραπείας του καρκίνου³⁰.

Οι Mohri et al. (2008) ερευνήσαν τις επιδράσεις του κλινοπτιλόλιθου στη βελτίωση της κατάστασης της υγείας και την πρόληψη δηλητηριάσεων μέσω μυκοτοξινώσεων σε 30 μοσχάρια. Οι τιμές ινωδογόνου στον ορό του πλάσματος, ολικής λευκωματίνης, βήτα και γάμμα σφαιρινών ήταν σημαντικά υψηλότερες μετά από 14 ημέρες ($P < 0.05$). Αναλυτικότερα κλινοπτιλόλιθος προστέθηκε σε πρωτόγαλα σε συγκεντρώσεις 2% για 2 ημέρες (Ομάδα 1) και 2% για 14 ημέρες (ομάδα 2). Τα δείγματα αίματος αναλύθηκαν 12 ώρες μετά τη γέννηση των μοσχαριών και στο τέλος της πρώτης, δεύτερης, τρίτης, τέταρτης, πέμπτης και έκτης εβδομάδας της ζωής τους. Το ινωδογόνο του πλάσματος, η συνολική αλβουμίνη, οι βήτα και γάμμα σφαιρίνες ήταν σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα 2 ($P < 0.05$) γεγονός που υποδηλώνει μια ευεργετική επίδραση των συμπληρωμάτων κλινοπτιλόλιθου στην υγεία των νεαρών μοσχαριών¹⁶.

Επίσης οι ζεόλιθοι αυξάνουν την απορρόφηση θρεπτικών στοιχείων σε χοίρους, καθώς μειώνουν την ταχύτητα μετακίνησης της τροφής διαμέσω του πεπτικού σωλήνα και το μέγεθος των εντερικών λαχνών⁴.

Οι Katsoulos et al. (2006) μελέτησαν τις επιδρά-

σεις του κλινοπτιλόλιθου στην κλινική κέτωση 52 αγελάδων Holstein. Ειδικότερα, 17 αγελάδες ελάμβαναν συμπληρώματα που περιείχαν 1,25% κλινοπτιλόλιθου για 4 εβδομάδες (ομάδα 1), 17 αγελάδες ελάμβαναν συμπλήρωμα που περιείχε 2,5% κλινοπτιλόλιθου για 4 εβδομάδες (Ομάδα 2) και 18 αγελάδες δεν ελάμβαναν διατροφή με συμπληρώματα (Ομάδα 3, του ελέγχου). Στο τέλος της πειραματικής περιόδου, οι αγελάδες των ομάδων 1 και 2 έδειξαν σημαντική μείωση της κέτωσης ($P < 0.01$) σε σχέση προς την ομάδα 3. Διερευνήθηκαν τα προστατευτικά αποτελέσματα του κλινοπτιλόλιθου (15 g/kg) έναντι αφλατοξίκωσης, που προκλήθηκε από χορήγηση 100 ppb αφλατοξινών σε 576 κοτόπουλα. Μία σημαντική ηπατοκυτταρική βλάβη -υδρωπική εκφύλιση- μια υπερπλασία του χοληδόχου πόρου και περιπυλαία ίνωση βρέθηκαν στα κοτόπουλα που τρέφονταν με αφλατοξίνες ($P < 0,05$). Μετά από 42 ημέρες από την διατροφή των ζώων με προσθήκη συμπληρωμάτων διατροφής με κλινοπτιλόλιθο, ο αριθμός των προσβεβλημένων ζώων και ο εκφυλισμός των οργάνων τους ήταν σημαντικά μειωμένος ($P < 0,05$)¹².

Η χρήση κλινοπτιλόλιθου ως συμπλήρωμα διατροφής κτηνιατρικής χρήσης παρουσιάζει ευεργετικές δράσεις στην προστασία και την θεραπεία ασθενειών σε βοοειδή. Μια σειρά πειραμάτων έδειξε ότι η χορήγηση κλινοπτιλόλιθου 2.5% στην τροφή των ζώων προασπίζει έναντι υποασβεστιαμίας και κέτωσης, μετά την γέννα. Επίσης αποδείχτηκε πως η ημερήσια χορήγηση 200 gr κλινοπτιλόλιθου στην τροφή βελτιώνει την ανοσολογική απόκριση βοοειδών εμβολιασμένων για *E. coli* και αποτρέπει την ελάττωση του pH στα μηρυκαστικά. Τέλος, η εισαγωγή κλινοπτιλόλιθου στο πρωτόγαλα των νεογνών αυξάνει την απορρόφηση αντισωμάτων και μειώνει την συχνότητα και εμφάνιση διαρροϊκών συμπτωμάτων³.

Κλινικές μελέτες

Οι Ivkovic et al. (2004) μελέτησαν την επίδραση 2 συμπληρωμάτων διατροφής με κλινοπτιλόλιθο (σε δόσεις 3.6 g/day και 1.2 g/day) σε 61 ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Η παρεχόμενη συμπληρωματική αγωγή διήρκεσε 6 έως 8 εβδομάδες. Στο τέλος της περιόδου, παρατήρηση των εξετάσεων αίματος δεν εμφάνισε αλλαγές από τα συμπληρώματα, ενώ

παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση των υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων CD4+ και CD19+, και μία σημαντική μείωση των CD56+ σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με 3.6 g/day. Η χορήγηση της δεύτερης δόσης (1.2 g/day) συσχετίστηκε με μια σημαντική αύξηση των υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων CD3+ και μείωση των CD56+, ενώ παράλληλα δεν εμφανίσθηκαν παρενέργειες³².

Μια κλινική έρευνα της Δρ Triebnig στο ογκολογικό κέντρο του Villach (Αυστρία) διεξήχθη σε 2000 ογκολογικών ασθενών (προσωπική επικοινωνία, δεν έχει δημοσιευθεί). Οι ασθενείς έλαβαν κλινοπτιλόλιθο ως ιατροτεχνολογικό παρασκεύασμα (MULTIZEO Med) σύμφωνα με διαφορετικά πρωτόκολλα χορήγησης. Εμφανίσθηκε και καταγράφηκε βελτίωση 100% της μετα-χημειοθεραπευτικής βλεννογονίτιδας, ελάττωση κατά 70-80% συμπτωμάτων γαστρίτιδας, εμέτων και διάρροιας και μια μικρή βελτίωση στις γενικές εξετάσεις αίματος. Πιθανά αυτό το ιατροτεχνολογικό προϊόν μπορεί να θεωρηθεί ως ένα σημαντικό επιβοηθητικό προϊόν σε χημειοθεραπείες και ακτινοθεραπείες. Η φαρμακοτεχνολογική μορφή σε κοκκία προτιμάται, δεδομένου ότι μπορεί να χορηγείται ευκολότερα στο νερό, ή σε χυμούς φρούτων, γιαούρτια και άλλα ποτά και τρόφιμα¹.

Σε μία πρόσφατη δημοσίευση οι Potgieter et al. (2014) ερεύνησαν τις επιπτώσεις του κλινοπτιλόλιθου σε ενδοσκοπικά αρνητική γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση (ENGORD). Αυτή ήταν μια τυχαίοποιημένη, διπλά-τυφλή ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο (placebo) μελέτη. 25 ENGORD ασθενείς έλαβαν 750 mg Absorbatox™ 2.4 D κλινοπτιλόλιθου ως ιατροτεχνολογικού προϊόντος ή το εικονικό φάρμακο, δύο φορές ημερησίως για 14 ημέρες. Στο τέλος της μελέτης, η σοβαρότητα των συμπτωμάτων (σύμφωνα με το σύστημα Sidney) συμπεριλαμβανομένης της μείωσης της καούρας (καύσου), δυσφορίας και του πόνου μειώθηκε κατά 44%, 54% και 56% αντίστοιχα ($P < 0,05$). Η πρόληψη της διάβρωσης του βλεννογόνου πιθανώς οφειλόταν σε δεσμούς μεταξύ κλινοπτιλόλιθου με ιόντα υδρογόνου των ενζύμων πεψίνης του γαστρικού βλεννογόνου, ενώ οι αμίνες και τα νιτρικά άλατα του κλινοπτιλόλιθου μπορούν επίσης να μειώσουν τις βλάβες του γαστρικού βλεννογόνου³³.

Οι Nakane et al. (2006) διερεύνησαν την αντιμικροβιακή δράση ενός Ag-ζεόλιθος 5-40 w/w% σκευάσματος έναντι ανθεκτικών βακτηρίων στη μασχαλιαία περιοχή. Η ένωση ήταν αποτελεσματική στην εξουδετέρωση βακτηρίων στο δέρμα, που ενέχονται στην παραγωγή μεταβολιτών υπεύθυνων δυσοσμίας στις μασχάλες, για 24 ώρες. Με βάση τα ανωτέρω ο Ag-ζεόλιθος μπορεί να αποδειχθεί μια σημαντική ουσία για πιθανή αποσμητική χρήση¹⁷.

Δοσολογία

Ο ζεόλιθος διατίθεται σε πολλές διαφορετικές τελικές μορφές π.χ. καψάκια, δισκία, σκόνη κλπ. Δεν έχει καμία γεύση ή οσμή και είναι προτιμότερο να ξεκινά ο χρήστης με χαμηλή δοσολογία μέχρι να φθάσει σε συγκεκριμένη δόση (περίπου 1gr την ημέρα)¹.

Ασφάλεια στη χρήση και παρενέργειες

Σύμφωνα με μελέτες η χρήση ζεόλιθου είναι σχετικά ασφαλής, αφού δεν είναι τοξικός. Ακόμη και ίχνη του ζεόλιθου απομακρύνονται από τον οργανισμό σε 6-8 ώρες. Επιπλέον, λόγω της αποβολής των τοξινών, σε ένα ελάχιστο ποσοστό χρηστών ζεόλιθου (περίπου 1%), έχει αναφερθεί ήπια μυαλγία, κεφαλαλγία, εξάνθημα σε συχνότητα όχι γνωστή¹.

Αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα

Ο ζεόλιθος μπορεί να μειώσει την αποτελεσματικότητα ορισμένων φαρμάκων, όπως της ασπιρίνης^{1,34}.

Συμπεράσματα

Έχουν αναφερθεί πολλοί τύποι φυσικών απαντώνμενων ζεολιθών καθώς και συνθετικοί. Έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα (ζεόλιθοι-κλινοπτιλόλιθοι) στη ζωοτεχνία και την κτηνιατρική, κυρίως ως αποτοξινωτικός παράγοντας έναντι ραδιενεργών στοιχείων, αφλατοξινών και άλλων δηλητηρίων. Επίσης ο ζεόλιθος έχει μεγάλη αντιοξειδωτική, λευκαντική, αιμοστατική και αντιδιαρροϊκή ικανότητα σε τομείς ανθρώπινης χρήσης. Οι υπάρχουσες κλινικές μελέτες είναι λίγες και ανεπαρκείς και οι περισσότερες έχουν διεξαχθεί σε ανοσοανεπάρκεια και

ογκολογικές περιπτώσεις ασθενών μετά από χημειοθεραπεία και ραδιοθεραπεία^{1,35}. Αν και υπάρχει μεγάλη ανάπτυξη τελικών εμπορικών προϊόντων ζεολίθου, δεν υπάρχουν επαρκή κλινικά στοιχεία για την αποτελεσματικότητα αυτής της ένωσης. Οι προσροφητικές ιδιότητες του ζεόλιθου επί κατιόντων βαρέων μετάλλων, ιόντων αμμωνίου, τοξινών κ.λπ. τον καθιστούν πολύ σημαντικό για χρήσεις του σε περιβαλλοντικές εφαρμογές με σκοπό την απομάκρυνση των ρύπων από το νερό, το έδαφος και τα τρόφιμα.

Κατά αντιστοιχία με άλλα αδρανή ανόργανα προϊόντα, όπως η από του στόματος χορήγηση αργίλου, μπεντονίτη κλπ, που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε θεραπευτικούς τομείς όπως στην αγωγή του ευερέθιστου εντέρου, την κολίτιδα και διαταραχές του παχέος εντέρου, ο κλινοπτιλόλιθος μπορεί να αποτελέσει μία επιπλέον ένωση αποτελεσματική στην απομάκρυνση τοξικών μορίων από τον οργανισμό. Για το λόγο αυτόν είναι πολύ ενδιαφέρον να γνωρίζουμε το μηχανισμό δράσης του. Αντ' αυτού είναι σήμερα άγνωστος ο μηχανισμός ελέγχου της τοπικής αιμορραγίας και της επούλωσης τραυμάτων. Οι Arnaud et al. (2007) έδειξαν ότι πιθανά η απορρόφηση του νερού από ζεόλιθο είναι υπεύθυνη της συγκέντρωσης αιμοπεταλίων και παραγόντων πήξης του αίματος, συντελώντας στο σχηματισμό θρόμβου και προάγοντας έτσι την πήξη. Αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες του ζεόλιθου μπορεί να επάγουν την έναρξη της πήξης του αίματος, χάρη στην αύξηση της συγκέντρωσης του παράγοντα πήξης αίματος γύρω από τις πληγές^{28,1}.

Η παρούσα ανασκόπηση περιλαμβάνει όλες τις τρέχουσες επιστημονικές μελέτες σχετικά με διάφορους τομείς που χρησιμοποιείται ο ζεόλιθος, ενώ μπορεί να χρησιμεύσει και ως βάση άλλων πειραματικών και κλινικών μελετών. Η αποτοξινωτική δράση του ζεόλιθου είναι γνωστή και ευρύτατα χρησιμοποιούμενη σε αγρο-βιομηχανικά και ζωοτεχνικά πεδία. Η νοσοκομειακή χρήση του ως δυνητικά επιβοηθητικού παράγοντα έναντι τοξικών αποτελεσμάτων χημειοθεραπείας φαίνεται πολύ σημαντική, αλλά χρειάζεται να αποδειχθεί ότι δεν παρεμβαίνει στην απορρόφηση των φαρμάκων χημειοθεραπείας και δεν μειώνει την βιοδιαθεσιμότητά τους. □

Clinoptilolite (Zeolite) - New Scientific data fields of uses and applications

**Christos G Ganos, Nektarios I Pirmettis,
Ioanna B Chinou, Konstantia G Graikou***

*Division of Pharmacognosy and Chemistry
of Natural products, Dept. of Pharmacy,
National and Kapodistrian University of
Athens, University Campus of Zografou,
15771 Zografou, Athens, Greece*

Abstract

Clinoptilolite is a natural zeolite and it is among the most widespread minerals in the medical market. Zeolites are a family of aluminosilicates and cations clustered to form macro aggregates by small individual cavities. In the medical area, they are involved in detoxification mechanisms capturing ions and

molecules into their holes. This overview analyzes the main fields of zeolite utilization and applications in zootechnology and veterinary medicine where it improves the pets' fitness, removes radioactive elements, aflatoxins and poisons. Moreover, it has been also proved that zeolite also possesses antioxidant, hemostatic and anti-diarrhoic properties, applied in human care. Very recently clinoptilolite was used in oncology (mainly after chemotherapy and radiotherapy) as adjuvant and in the area of medical devices. As the existing clinical trials are only few, further clinical investigations would be urgently required.

**KEYWORDS: Clinoptilolite (Zeolite),
detoxification, uses-applications,
pharmacological activity**

Corresponding author: Konstantia Graikou,
kgraikou@pharm.uoa.gr

References

1. Laurino C., Palmieri B., Zeolite: "The magic stone"; main nutritional, environmental, experimental and clinical fields of application. *Nutr. Hospitalar.* 32, 573-581, 2015.
2. Katsoulos P.D., Roubies N., Panousis N., Karatzias H. Effects of long-term feeding dairy cows on a diet supplemented with clinoptilolite on certain serum trace elements. *Biol. Trace Elem. Res.* 108,137-145, 2005.
3. Kyriakis, S.C., Papaioannou D.S, Alexopoulos C., Polizopoulou Z., Tzika E.D, Kyriakis C.S. Experimental studies on safety and efficacy of the dietary use of a clinoptilolite-rich tuff in sows: A review of recent research in Greece, *Micropor and Mesopor Material* 51, 65-74, 2002.
4. Subramaniam M. D., Kim I. H. Clays as dietary supplements for swine: A review *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6,38, 2015 DOI: 10.1186/s40104-015-0037-9.
5. Wajima T. Ion exchange properties of Japanese natural zeolites in seawater. *Anal Sci.* 29, 139-141, 2013.
6. Zhang J., Li X., White J., Dutta P.K. Effects of surface and morphological properties of zeolite on impedance spectroscopy-based sensing performance. *Sensors (Basel, Switzerland)* 12, 13284-13294, 2012.
7. Zorpas A.A., Vassilis I., Loizidou M., Grigoropoulou H., Particle size effects on uptake of heavy metals from sewage sludge compost using natural zeolite clinoptilolite. *J. Colloid Interface Sci.*, 1,250,1-4, 2002.
8. Katsoulos, P.D., Karatzia, M.A., Karatzias, H. The use of clinoptilolite as feed additive for the prevention and treatment of certain diseases in cattle Cattle: Domestication. *Dis. Environm.*, 115-126, 2013.
9. Haidouti C. Inactivation of mercury in contami-

References

- nated soils using natural zeolites. *Sci. Total Environ.* 208, 105-109, 1997.
10. Liu C.H., Lo K.V. Ammonia removal from compost leachate using zeolite. II. A study using continuous flow packed columns. *J. Environm. Sci. Health Part B, Pesticides, food contaminants, Agricultural wastes*, 36, 667-675, 2001.
 11. Cefali E.A., Nolan J.C., McConnell W.R., Walters D.L Pharmacokinetic study of zeolite A, sodium aluminosilicate, magnesium silicate, and aluminum hydroxide in dogs. *Pharm. Res.* 12, 270-274, 1995.
 12. Katsoulos P.D., Panousis N., Roubies N., Christaki E., Arsenos G., Karatzias H. Effects of long-term feeding of a diet supplemented with clinoptilolite to dairy cows on the incidence of ketosis, milk yield and liver function. *Vet. Rec.* 23, 415-418, 2006.
 13. Mallek Z., Fendri I., Khannous L., Ben Hassena A., Traore A.I., Ayadi M.A. Effect of zeolite (clinoptilolite) as feed additive in Tunisian broilers on the total flora, meat texture and the production of omega 3 polyunsaturated fatty acid, *Lipids Health Dis.* 11, 35-45, 2011.
 14. Marchioro A., Mallmann A.O., Diel A., Dilkin P., Rauber R.H., Blazquez F.J. Effects of aflatoxins on performance and exocrine pancreas of broiler chickens, *Avian Dis.* 57, 280-284, 2011.
 15. Mohri M., Seifi H.A., Daraei F. Effects of short-term supplementation of clinoptilolite in colostrum and milk on hematology, serum proteins, performance, and health in neonatal dairy calves. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2112-2117, 2008.
 16. Nakane T., Gomyo H., Sasaki I., Kimoto Y., Hanzawa N., Teshima Y. New antiaxillary odour deodorant made with antimicrobial Ag-zeolite (silver-exchanged zeolite). *Int. J. Cosmet. Sci.* 28, 299-309, 2006.
 17. Harris J.A., Birch P. The effect of zeolite on the toxicity of lead to fungi. *Environ. Pollut.* 49, 235-241, 1988.
 18. Ohta M., Nakamura K., Kubo T., Suzuki T. Detoxification effect of iron-encaging zeolite-processed water in tributyltin-intoxicated *Euglena gracilis* *Z. Biosci. Biotech. Biochem.* 65, 14-21, 2001.
 19. Shin Y.J., Han C.S., Lee C.S., Kim H.S., Ko S.H., Hwang S.K., Ko S.G., Shin J.W., Ye S.K., Chung M.H. Zeolite 4A, a synthetic silicate, suppresses melanogenesis through the degradation of microphthalmia-associated transcription factor by extracellular signal-regulated kinase activation in B16F10 melanoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 72-76, 2010.
 20. Olver M.D. Effect of feeding clinoptilolite (zeolite) on the performance of three strains of laying hens. *Brit. Poultry Sci.* 38, 220-222 1997.
 21. Pond W.G., Yen J.T. Protection by clinoptilolite or zeolite NaA against cadmium-induced anemia in growing swine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 173, 332-337, 1983.
 22. Jandl J., Novosad J., In vivo reduction of radiocesium with modified clinoptilolite in sheep. *Veterinarni medicina*, 40, 237-41, 1995.
 23. Parlat S.S., Yildiz A.O., Oguz H. Effect of clinoptilolite on performance of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) during experimental aflatoxicosis. *Brit. Poultry Sci.* 40, 495-500, 1999.
 24. Montinaro M., Uberti D., Maccarinelli G., Bonini S.A., Ferrari-Toninelli G., Memo M. Dietary zeolite supplementation reduces oxidative damage and plaque generation in the brain of an Alzheimer's disease mouse model. *Life Sci.* 20, 903-910, 2013.
 25. Nistiar F., Hrusovsky J., Mojzis J., Mizik P. Distribution of dichlorvos in the rat and the effect of clinoptilolite on poisoning. *Veterinarni medicina*, 29, 689-698, 1984.
 26. Mojzis J., Nistiar F., Kovac G., Mojziso G. Preventive effect of zeolite in VX poisoning in rats. *Veterinarni medicina*, 39, 443-449, 1994.
 27. Arnaud F., Tomori T., Saito R., McKeague A., Prusaczyk W.K., McCarron R.M. Comparative efficacy of granular and bagged formulations of the hemostatic agent QuikClot. *J. Trauma*, 63, 775-782, 2007.
 28. Norouzian M.A., Valizadeh R., Khadem A.A., Afzalzadeh A., Nabipour A. The effects of feeding clinoptilolite on hematology, performance, and

- health of newborn lambs, *Biol. Trace Elem. Res.*, 137,168-176, 2010.
29. Tatnai E., Ungvary G., Study on carcinogenicity of clinoptilolite type zeolite in Wistar rats. *Polish J. Occup. Med. Environ. Health*, 6, 27-34, 1993.
 30. Katic M, Bosnjak B, Gall-Troselj K, Dikic I, Pavelic K. A clinoptilolite effect on cell media and the consequent effects on tumor cells in vitro. *Front Biosci.* 11,1722-1732, 2006.
 31. Ortatatli M., Oguz H., Hatipoglu F., Karaman M. Evaluation of pathological changes in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. *Res. Vet. Sci.* 78, 61-68, 2005.
 32. Ivkovic S., Deutsch U., Silberbach A., Walraph E., Mannel M. Dietary supplementation with the tribo mechanically activated zeolite clinoptilolite in immunodeficiency: effects on the immune system. *Adv. Therap.* 21,135-147, 2004.
 33. Potgieter W., Samuels C.S., Snyman J.R. Potentiated clinoptilolite: artificially enhanced aluminosilicate reduces symptoms associated with endoscopically negative gastroesophageal reflux disease and nonsteroidal anti-inflammatory drug induced gastritis. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 7, 215-220, 2014.
 34. Stylianou, M.A.(2012) Natural zeolites in medicine in Handbook of Natural Zeolites. (Inglezakis V.J, Zorpas A.A. eds) BenthamScience pp 317-334.
 35. Yeritsyan H., Sahakyan A., Harutyunyan V., Nikoghosyan S., Hakhverdyan E., Grigoryan N. Radiation-modified natural zeolites for cleaning liquid nuclear waste (irradiation against radioactivity), *Sci. Rep.* 3, 2900-2910, 2013.

Noopept: Development and Validation of a UV-Vis Spectrophotometric method for the quantification of (*S*)-*N*-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester in bulk drug substance

Lyudmyla Antypenko^{*1}, Bogdan Burlaka², Igor Belenichev³

¹Organic and Bioorganic Chemistry Department, Zaporizhzhya State Medical University, Zaporizhzhya, Ukraine

²Technology of Drugs Department, Zaporizhzhya State Medical University, Zaporizhzhya, Ukraine

³Pharmacology and Medical Recipes Department, Zaporizhzhya State Medical University, Zaporizhzhya, Ukraine

Summary

A simple UV-spectrophotometric method has been developed and validated for the quantification of noopept in bulk substance. The linearity with $r^2 = 0.999$ was found at the 258 nm in the range of 0.6 to 1.8 mg/ml in both 5% glycerin-water (w:v) solutions with prior dilution of the analyte in 96% ethanol

and after heating at 80-100°C in a water bath. The limits of detection for above-mentioned cases were found to be 0.14-0.16 mg/ml, while the limits of quantification were 0.42-0.49 mg/ml. The methods were validated for linearity, accuracy, precision, range, ruggedness and robustness.

KEY WORDS: Noopept, (*S*)-*N*-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester validation, UV-spectrophotometry

1. Introduction

Noopept, ((*S*)-*N*-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester) is a peptide drug with nootropic and neuroprotective activity (**Figure 1**)^{1,2}.

It was chosen among other *N*-acylprolyl-containing dipeptides for consequent investigations as the most potent to prevent memory decline evoked by maximal electroshock in a passive avoidance step-through paradigm^{3,4}. The substance activity was based on its antioxidant and anti-inflammatory effects, its inhibitory activity towards the neurotoxic-

ity of excess of calcium and glutamate, and its ability to improve blood rheology^{5,6}. It was demonstrated, that noopept affected synaptic transmission in central neurons⁷, decreased activity of stress-induced kinases, and increased expression of neutrophines in rat hippocampus⁸. Activation of NMDA receptors was involved in the effects of a single injection of the noopept, whereas activation of quisqualate/AMPA receptors was associated with the decrease in their efficacy after repeated use of drug⁹. Besides it was reported, that it improved spatial memory and increased immunoreactivity to A β amyloid in an

Corresponding author: Dr. Lyudmyla Antypenko, E-mail: antypenkol@gmail.com Tel.: +380669658740

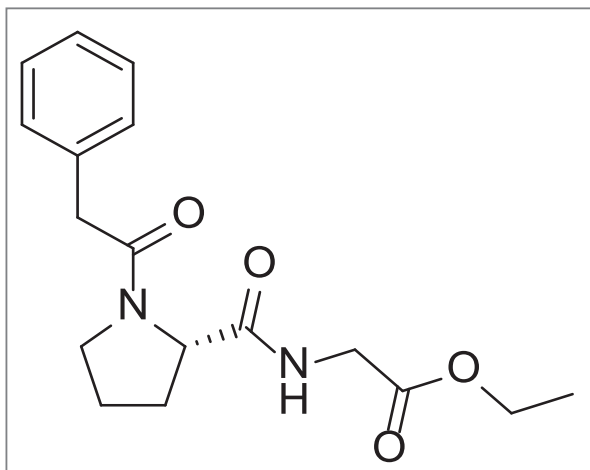


Figure 1: Noopept structural formula

Alzheimer's disease mice model following olfactory bulbectomy operation¹⁰; displayed anxiolytic effects and was used in anxiety treatment^{4,7,11}.

Furthermore, it was found, that due to hydrophobic interactions with toxic amyloid oligomers of α -synuclein, it prompted their rapid sequestration into larger fibrillar amyloid aggregates, reducing the cytotoxic effect on neuroblastoma SH-SY5Y cells, thus preventing neurodegenerative disorder characterized by α -synuclein containing Lewy body formation and selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (Parkinson's disease)¹². Moreover, its antioxidant and anti-inflammatory effects have been examined in the context of an antidiabetic agent¹³.

Clinical pharmacological study established, that noopept is an effective drug for the treatment of psychoorganic disorders with cerebroasthenic and cognitive disturbances in doses of 15 and 30 mg per day¹⁴. It was found, that in 0.1 and 0.5 mg/kg it effectively eliminated the manifestations of learned helplessness neurosis after long-term treatment¹⁵. Additionally it was in 200-50,000 times more potent than piracetam as a nootropic agent¹⁶, and produced positive effect in animal models in 0.01 to 0.8 mg/kg dosage^{9,10,17}.

Considering noopept analytical determination, some instrumental procedures were found in literature. Thus, it was reported, that UV spectra of its

1.0 mg/mL solutions in 95% ethanol had absorption maxima at the 253 ± 2 , 258 ± 2 (the strongest), and 265 ± 2 nm^{18,19}. Complete separation of the peaks for extracted excipients, noopept, and its impurities has been achieved by HPLC using mobile phase consisting of acetonitrile, water and glacial acetic acid (500:500:1, v:v) or acetonitrile and phosphate buffer (0.02 M, pH 2.7) (300:800, v:v). The UV absorbance at the 205 nm was selected as the analytical wavelength for determining the content of impurities and 258 nm - to evaluate the dose uniformity, dissolution, and the quantitative determination of active substance. Besides, it was found, that noopept, administered to experimental animals, was subjected to ester hydrolysis, amide hydrolysis, *N*-deacylation and aromatic hydroxylation forming *N*-phenylacetyl-L-prolylglycine, *N*-phenylacetyl-L-proline and L-prolylglycine²⁰. Boiko et al. also performed quantitative determination of noopept in the blood plasma using HPLC with UV detection, but at the 206 nm in 0.1 M methanol - ammonium monosubstituted phosphate buffer at pH = 4.6 (40:60, v:v)²¹. Moreover, it was shown, that noopept has been determined by mass spectrometric detection^{20,22} or gas chromatography with flame-ionization²⁰.

In addition, it's worth to mention, that nootropics are under consideration by forensic toxicology, and noopept is recently identified in illegal designer herbal products distributed in Japan, extracted with methanol under ultrasonication along with other substances: an opiate-like analgesic MT-45 (1-cyclohexyl-4-(1,2-diphenylethyl)piperazine, synonym: I-C6), noopept (GVS-111), and two synthetic cannabinoids: A-834735 and QUPIC N-(5-fluoropentyl) analog (5-fluoro-PB-22)^{23,24}. The substances were analyzed in high details by: ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (UPLC-ESI-MS), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in the electron ionization (EI), liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) with a photodiode array (PDA) detector, digital polarimeter. The structural assignments were made *via* ¹H, ¹³C NMR, heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC), heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC), double quantum filtered correlation spec-

troscopy (DQF-COSY), and rotating-frame nuclear Overhauser effect (ROE) spectra. The UV analytical wavelength was also reported to be 258 nm.

Summing up, although the noopept structure and pharmacological profile has been fully described, no simple validated, detailed UV-method has been reported to determine noopept in bulk drug substance. Thus, our aim was to develop, validate and propose such a procedure in this paper.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

The substance was weighed using analytical balances Shimadzu AUX220 (10 mg - 220 g), Shimadzu Corporation, ShimUkraine Ltd., Kyiv. UV spectra were recorded on a UV-vis spectrophotometer UV-2600 (190-1100 nm), Shimadzu Corporation, ShimUkraine Ltd., Kyiv.

2.2. Reagents and solutions

The used ethanol was of 96% (v:v) concentration and medical purity: "Pharmasept", Lohvytsky alcohol factory, Chervonozavodske, Ukraine. Glycerin was of 99.5% concentration and medical purity (GOST 6824-96): SynbiaS, Kiev, Ukraine. Working substance of noopept (CAS Number 157115-85-0) was purchased from Shijiazhuang Prosperity Import and Export Co., Ltd., China. Manufacture Date 2016/10/01. Purity: $\geq 98\%$. Distilled water was used throughout all experiments.

2.3. Validation

Calibration curve. The initial standard solution (0.1%) was prepared by the following procedure: a) dissolve 0.0500g of noopept in a 50 ml volumetric flask with 1 ml of 96% ethanol, stir for 5 min, then fill with 5% glycerine-water (w:v) solution, stir for 5 min, and left for more 15 min; b) dissolve 0.0500g of noopept in a 50 ml flask containing 5% glycerine-water (w:v) solution, place the solution in a water bath for 5 min at 80-100°C., stir for 5 min, and left to cool down for 20 min. Quality control solutions were prepared over the concentration range 0.2 to 1.8 mg/ml (0.02-0.18%) in the same manner. All solutions were stored at the 18-22°C.

The calibration curve was constructed by measuring absorption at $\lambda_{\max}$, 5 times for each sample. The regression equation was obtained by least squares regression analysis for $n=5$. Regression equation: $Y = \text{slope} \times C + \text{intercept}$. Slope, intercept and regression coefficient were determined from the regression analysis calculations in Microsoft Excel 2007²⁵.

Using this linear equation, regression coefficient (r^2) and the detection limits were calculated. Accuracy: mean $\pm$ SD; Linearity (lowest - highest concentration while curve is linear); SE of intercept: $\sqrt{\sum(y-y')/n}$, where y - standard concentration, y' - found concentration; SD of intercept: SE of intercept $\times \sqrt{n}$.

The limit of detection (LOD): $3.3 \times (\text{SD of intercept} / \text{slope})$; and the limit of quantitation (LOQ): $10 \times (\text{SD of intercept} / \text{slope})$.

Precision (repeatability of the method) was evaluated by repeated absorption measurements at $\lambda_{\max}$ and the results were expressed as the mean standard deviation (SD) and the percent relative standard deviation RSD (%). To evaluate intra-day and inter-day precision the samples were analyzed six times a day and for 6 consecutive days.

3. Results and discussion

According to the safety sheet data of Caiman Chemical Company the solubility of Noopept (CAS Number is 157115-85-0) is: ~ 1 mg/ml in PBS, ~ 20 mg/ml in DMSO, ~ 25 mg/ml in DMF [26], freely soluble in chloroform, 95% ethanol, slightly soluble in water, very slightly soluble in diethyl ether¹⁹.

In a paper regarding HPLC analysis of noopept it has been reported that by changing the ratio of mobile-phase components towards an increased aqueous content the selectivity of the procedure was increased; however, the efficiency was reduced due to hydrolysis of noopept¹⁸. After one day in an aqueous medium, slow hydrolysis of the ester bond occurred and within a month 1% of the free acid was formed; in 0.1M HCl solution - the next day 15% of impurities have been detected; in 0.1M NaOH solution - the next day 99% of noopept was hydrolyzed¹⁹. Hydrolysis of the amide bond during a month was not greater than 5%.

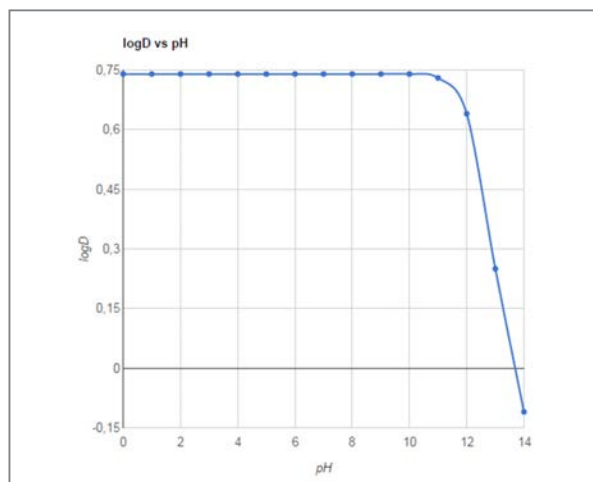


Figure 2: Noopept logD prediction

In the light of the above considerations it was decided to use 5% glycerin-water solution as solvent, because of future dialysis studies. Considering noopept bad solubility in this mixture, it was decided firstly to dilute substance in minimum quantity of 96% ethanol, which was found to be 1 ml for 50 ml of main solvent.

The measured pH of the 0.1-0.16% (w:v) working solutions was 5.65-5.76, and close to data of intestines environment. At this pH, noopept should be in non-ionized form according to *in silico* calculations done by LogD Predictor (**Figure 2**)²⁷.

The absorbance maxima were found as it was reported earlier: 253, 258 and 264 nm in both cases¹⁹.

Validation of the method was prepared in accordance to the analytical method validation parameters²⁸. According to the Beer's law, regression coefficient, obtained similar specific absorbance (6), the calibration curve of noopept exhibited good linearity over the concentration range 0.6 to 1.8 mg/ml (**Table 1, Figure 3**).

The above-mentioned data were evaluated by linear regression analysis, which was calculated by the least-square regression analysis measuring maximum absorbance of noopept standard solutions. The concentration range was very close to the data reported earlier for the determination of noopept in 95% ethanol (0.2-1.6 mg/ml)¹⁹, but due to bad recovery because of unequal distribution of noopept in

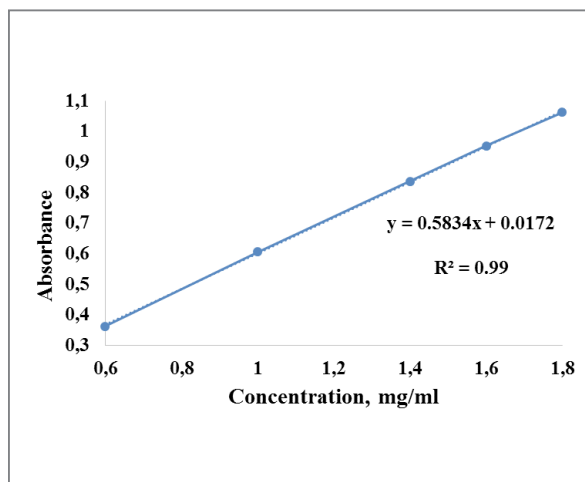


Figure 3: Calibration curve of noopept in 5% glycerin-in-water (w:v) solution with prior dilution in 96% ethanol

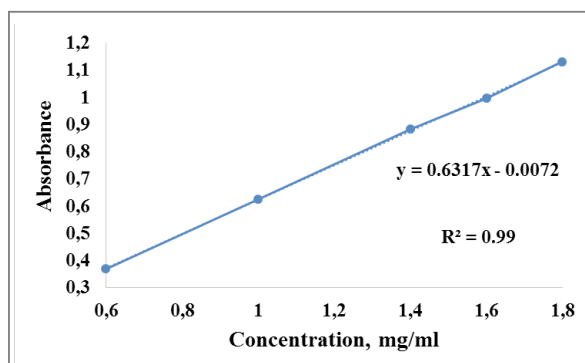


Figure 4: Calibration curve of noopept in 5% glycerin-in-water (w:v) solution with heating at the 80-100°C

solvent, 0.2 and 0.4 mg/ml were extracted from the linearity calculations.

The precision of the method was evaluated by measuring absorption at λ_{max} of noopept standard solutions for five times. Standard deviations of each measured absorbance were good - 0.0132-0.0225 mg/ml and RSD was 0.01-0.1%.

The recovery at five different concentrations (99.9±0.85%) evaluated the accuracy of the method (**Table 1**). The mean percentage of recoveries was 99.9±0.01%.

The presented calibration curve can be used for fast concentration evaluation of unknown solution of noopept (**Figure 3**).

Table 1. Concentration of standard solutions of noopept in 5% glycerin-water (w:v) solution with prior dilution in 96% ethanol, their absorbancies, accuracy and recovery data

Concentration	A	SD	%RSD	E%cm	^a Found C.	^b Recovery
mg/ml	of 5 meas.	mg/ml			mg/ml	%
0.6	0.3626	0.0132	0.03	6.0	0.59	98.7
1	0.6058	0.0187	0.03	6.1	1.01	100.9
1.4	0.8371	0.0144	0.01	6.0	1.40	100.4
1.6	0.9521	0.0225	0.02	6.0	1.60	100.2
1.8	1.0625	0.0189	0.02	5.9	1.79	99.5
					%RSD	0.01

^aFound concentration: (Absorbance – intercept) / slope;^bRecovery: found concentration / labeled concentration×100.**Table 2. Concentration of standard noopept solutions in 5% glycerin-water (w:v) solution with heating at the 80-100° C, their absorbancies, accuracy and recovery data**

Concentration	A	SD	% RSD	E% cm	^a Found C.	^b Recovery
mg/ml	of 5 meas.	mg/ml			mg/ml	%
0.6	0.3705	0.0026	0.01	6.2	0.60	99.6
1	0.6255	0.0122	0.02	6.3	1.00	100.2
1.4	0.8825	0.0022	0.002	6.3	1.41	100.6
1.6	0.9964	0.0031	0.002	6.2	1.59	99.3
1.8	1.1318	0.0039	0.002	6.3	1.80	100.2
					SD	0.51
					%RSD	0.01
					Accuracy	99.98±0.51
					Recovery	99.98±0.01

^aFound concentration: (Absorbance – intercept) / slope;^bRecovery: found concentration / labeled concentration*100

Moreover, to exclude unnatural reagent for human plasma, namely, - ethanol from the future pharmacological investigations of pharmaceutical dosage forms, it was decided just to heat the glycerin-water solution with noopept in the water bath and compare the obtained results with previous ones (**Table 2, Figure 4**).

Upon heating the noopept solution, according to the increasing absorbance values, a solvatochromic

effect was observed, most likely due to noopept protonation and to the formation of stable aggregates in this solvent²⁹.

Slope, intercept and correlation coefficient were determined from the regression analysis calculations (**Table 3**).

The limits of detection (LOD) were found to be 0.14-0.16 mg/ml upon heating or upon addition of

Table 3. Linearity data, LOD and LQD of noopept in 5% glycerin-water (w:v) solution

Parameters	With addition of 0.5% of 96% ethanol (v:v)	Under heating	Reported data in 95% ethanol ¹⁹
Slope	0.5834	0.6317	0.5921
Intercept	0.0172	0.0072	0.0028
Linearity (mg/ml)	0.6-1.8	0.6-1.8	0.2-1.6 (UV) 0.0025-1.0 (HPLC)
Regression equation	$y = 0.5834x + 0.0172$	$y = 0.6317x - 0.0072$	$y = 0.5921x + 0.0028$
r^2	0.999	0.999	0.999
SE of intercept (mg/ml)	0.0130	0.0118	-
SD of intercept (mg/ml)	0.029	0.026	-
LOD (mg/ml)	0.16	0.14	-
LOQ (mg/ml)	0.49	0.42	-

ethanol respectively, while the corresponding limits of quantification (LOQ) were 0.42-0.49 mg/ml respectively.

The ruggedness of the methods was determined by performing the same assay by different analysts, also while the precision was investigated. In addition, the assay was performed for 0.1% noopept solution during week to check its reproducibility (**Table 4**).

The results were found to be highly reproducible during the day for dilution in the first method - RSD was 0.006%, but for the period of the week it increased to 0.02%, due to ester bond hydrolysis, but still with high valid values. The dissolution in 5% glycerin-water solution influenced practically in the same rate - RSD was 0.01%.

To determine the robustness of the method, experimental conditions like room temperature, stirring time, addition of different ethanol volumes were studied. It is very important to dilute noopept firstly in the 96% ethanol, because without it substance formed suspension in 5% glycerin-water (w:v) solution. It was found, that 1 ml was enough in case of dilution 0.0100-0.0900 g of noopept in a 50 ml volumetric flask. Also heating for 5 min at 80 to 100° C in a water bath was essential to dilute the same quantity of the bulk drug substance. During the week, opacity of solutions has not appeared in both

cases. Furthermore, stirring for 5-10 min over a time period 0.5 - 2 h. was essential to determine most accurate data as it was already mentioned in **Table 4**. The temperature has also affected the results, and the 20-22°C was chosen as the most appropriate one for prior dilution in the ethanol and 80-100° C – for the second method with heating, to be calculated by the obtained equations, because otherwise, due to solvatochromism phenomenon, absorbances were of higher values.

Hence, to obtain absorption in the range of 0.6-0.8 and to detect the amount of noopept in bulk by first dilution in ethanol, the next method is proposed.

Quantitatively place 0.0500-0.0700 g of noopept in a 50 ml volumetric flask, dissolve with 1 ml of 95% ethanol, stir for 5 min., add 5% glycerin-water (w:v) solution, stir for 5 min. and left for 30 min. Determine the concentration of noopept by measuring maximum UV absorption at the wavelength of 258 nm in comparison to 5% glycerin water (w:v) solution with addition of 0.5% of 96% ethanol (v/v) (0.1 ml of 96% ethanol with 4.9 ml of 5% glycerin water (w:v) solution) in 3 ml cuvette with 1 cm layer.

The sample concentration is calculated in accordance with the following equation:

$$C \text{ mg/ml of final solution} = \frac{A_i - 0.0172}{0.5834}$$

Table 4. The intra-day and inter-day precision of noopept in 5% glycerin-water (w:v) solutions

	With addition of 0.5% of 96% ethanol (v:v)		With heating	
	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
1	0.5941	0.6051	0.6402	0.6446
2	0.6011	0.5808	0.6398	0.6403
3	0.6001	0.5770	0.6365	0.6416
4	0.5939	0.5702	0.6343	0.6502
5	0.5917	0.5654	0.6315	0.6612
Mean	0.5962	0.5876	0.6365	0.6476
SD	0.0042	0.0152	0.0037	0.0085
%RSD	0.006	0.021	0.005	0.01

$$C \% (w/v) \text{ of final solution} = \frac{A_i \cdot 0.1}{0.6004}$$

or concentration in the initial sample:

$$C \% (w/v) \text{ in bulk} = \frac{A_i \cdot 0.1 \cdot 50}{0.6004 \cdot l \cdot a}$$

where A_i – sample absorbance;

0.1 - concentration (%) of the standard solution with absorbance of 0.6004;

50 – flask volume, ml;

l – cuvette layer is 1 cm;

a – sample weight, g.

Furthermore, to determine the amount of noopept with heating, the next method is given.

Quantitatively place 0.0500-0.0700 - for ukrainian rules of accurate weigh of noopept in a 50 ml volumetric flask, dissolve in 5% glycerin-water (w:v) solution by heating in the water bath at the 80-100°C during 5-10 min. Cool the solution to 20-22°C for 30-45 min. Determine the concentration of noopept by measuring maximum UV absorption at the wavelength of 258 nm in comparison to 5% glycerin water (w:v) solution in 3 ml cuvette with 1 cm layer.

The sample concentration is calculated in accordance with the next equation:

$$C \text{ mg/ml of final solution} = \frac{A_i + 0.0072}{0.6317}$$

$$C \% (w/v) \text{ of final solution} = \frac{A_i \cdot 0.1}{0.6245}$$

or concentration in the initial sample:

$$C \% (w/v) \text{ in bulk} = \frac{A_i \cdot 0.1 \cdot 50}{0.6245 \cdot l \cdot a}$$

where A_i – sample absorbance;

0.1 - concentration (%) of the standard solution with absorbance of 0.6245;

50 - flask volume, ml;

l - cuvette layer is 1 cm;

a - sample weight, g.

4. Conclusions

It was found, that noopept in 5% glycerin-water (w:v) solution could be accurately qualitatively and quantitatively determined by UV spectroscopy by measuring the maximum absorbance at the 258 nm with initial addition of 0.5% of 96% ethanol (v:v) or upon heating for 5 min in a water bath at 80-100°C. The method was validated and calibration curves gave good linearity ($r^2 = 0.999$) over the concentration range of 0.6 to 1.8 mg/ml. The LOD and LQ were calculated and evaluation criteria such as accuracy, precision, robustness and ruggedness also showed high validity. □

References

1. Seredenin S., Ostrovskaya R., Gudasheva T., Halikas J., Voronina T., Trofimov S., Garibova T., Valdman H., Kravchenko H., Overstreet D. A novel cognitive enhancing substance GVS-111. *Neuropsychopharmacology* 11, 283, 1994. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1380206>.
2. Seredenin S.B., Voronina T.A., Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Rozantsev G.G., Skoldinov A.P., Trofimov S.S., Halikas J.A., Garibova T.L. (1995): Biologically active N-acylprolyldipeptides having anti-amnesic, antihypoxic and anorexigenic effects. *US Patent* 5,439,930.
3. Ostrovskaya R. *Substituted acyl-proline glycine GVS-111 combines cognition enhancing and neuroprotective activities*. Behavioural Pharmacology [online]. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 1999 Aug; 10 (SUPPLEMENT 1): S69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/00008877-199908001-00174>.
4. Gudasheva T., Voronina T., Ostrovskaya R., Rozantsev G., Vasilevich N., Trofimov S., Kravchenko E.V., Skoldinov A.P., Seredenin S.B. Synthesis and anti-amnesic activity of a series of N-acylprolyl-containing dipeptides. *Eur. J. Med. Chem.* 31, 151-7, 1996. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0223-5234\(96\)80448-x](http://dx.doi.org/10.1016/0223-5234(96)80448-x).
5. Pelsman A., Hoyo-Vadillo C., Gudasheva T.A., Seredenin S.B., Ostrovskaya R.U., Busciglio J. GVS-111 prevents oxidative damage and apoptosis in normal and Down's syndrome human cortical neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21, 117-24, 2003.
6. Bukanova J.V., Solntseva E.I., Skrebitsky V.G. Selective suppression of the slow-inactivating potassium currents by nootropics in molluscan neurons. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 5, 229-37, 2002.
7. Gudasheva T.A., Konstantinopol'skii M.A., Ostrovskaya R.U., Seredenin S.B. Anxiolytic activity of endogenous nootropic dipeptide cycloprolylglycine in elevated plus-maze test. *Bull. Exp. Biol. Med.* 131, 464-66, 2001.
8. Ostrovskaya R.U., Vakhitova Iu.V., Salimgareeva M., Iamidanov R.S., Sadovnikov S.V., Kapitsa I.G., Seredenin S.B. On the mechanism of noopept action: decrease in activity of stress-induced kinases and increase in expression of neurotrophins. *Eksp. Klin. Farmakol.* 73, 2-5, 2010.
9. Vorobyov V., Kaptsov V., Kovalev G., Sengpiel F. Effects of nootropics on the EEG in conscious rats and their modification by glutamatergic inhibitors. *Brain Res. Bull.* 85, 123-32, 2011. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.02.011.
10. Ostrovskaya R.U., Gruden M.A., Bobkova N.A., Sewell R.D., Gudasheva T.A., Samokhin A.N., et al. The nootropic and neuroprotective proline containing dipeptide noopept restores spatial memory and increases immunoreactivity to amyloid in an Alzheimer's disease model. *J. Psychopharmacol.* 21, 611-19, 2007.
11. Neznamov G.G., Teleshova E.S. Comparative studies of noopept and piracetam in the treatment of patients with mild cognitive disorders in organic brain diseases of vascular and traumatic origin. *Neurosci. Behav. Physiol.* 39, 311-21, 2009.
12. Jia X., Gharibyan A.L., Öhman A., Liu Y., Olofsson A., Morozova-Roche L.A. Neuroprotective and nootropic drug noopept rescues α -synuclein amyloid cytotoxicity. *J. Mol. Biol.* 414(5), 699-712, 2011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.09.044>.
13. Ostrovskaya R.U., Zolotov N.N., Ozerova I.V., Ivanova E.A., Kapitsa I.G., Taraban K.V., et al. Noopept normalizes parameters of the incretin system in rats with experimental diabetes. *Bull. Exp. Biol. Med.* 157(3), 344-9, 2014. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-014-2562-5>.
14. Teleshova E.S., Davydova I.A. P.5.038. *Clinical pharmacological study of the novel peptide nootropic drug noopept*. European Neuropsychopharmacology [online]. Elsevier BV; 2005 Jan;15: S222. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0924-977x\(05\)80440-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-977x(05)80440-7).
15. Uyanaev A.A., Fisenko V.P. Studies of long-term noopept and afobazol treatment in rats with learned helplessness neurosis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 142(2):202-4, 2006. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-006-0327-5>.
16. Ostrovskaya R.U., Gudasheva T.A., Voronina T.A., Seredenin S.B. The original novel nootropic and

- neuroprotective agent noopept. *Eksp. Klin. Farmakol.* 65, 66-72, 2002.
17. Avedisova A.S., Yastrebov D.B. Comparative efficiency of noopept and piracetam in therapy of astenic disorder of organic genesis. *Neurology* 15, 435-38, 2007.
 18. Grushevskaya L.N., Avdyunina N.I., Pyatin B.M., Alekseev K.V., Gaevaya L.M., Sergeeva M.S., Dudenko M.E., Klumova V.S., Tikhonova N.V. Pharmaceutical analysis and standardization of noopept tablets. *Pharm. Chem. J.* 45(6), 377-80, 2011. Translated from *Khim.-Farm. Zh.*, 45(6), 53 - 56, 2011.
 19. Grushevskaya L.N. (2011) Pharmaceutical analysis and standardization of new neurotropic drugs. *Thesis for degree of Doctor of Pharmacy*. Institute of Pharmacology RAMS. Moscow, p. 1-48. <http://medical-diss.com/medicina/farmatsevticheskiy-analiz-i-standartizatsiya-novyh-lekarstvennyh-sredstv-neurotropnogo-deystviya#ixzz4SFrJ-4zw>.
 20. Gudasheva T.A., Boyko S.S., Ostrovskaya R.U. et al. The major metabolite of dipeptide piracetam analogue GVS-111 in rat brain and its similarity to endogenous neuropeptide cyclo-L-prolylglycine. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 22, 245-52, 1997.
 21. Boiko S.S., Zherdev V.P., Kolyvanov V.P., et al. Noopept pharmacokinetics after intravenous administration of a lyophilized medicinal form in rats. *Pharmaceut. Chem. J.* 41, 123-25, 2007. doi: 10.1007/s11094-007-0027-0.
 22. Mares M., Scott K.S., Papsun D.M., Logan B.K. (2015). Development of an analytical method for nootropic "smart" drugs in biological fluids. *Annual meeting of the American Academy of Forensic Sciences*, Orlando, Florida, February 19.
 23. Uchiyama N., Matsuda S., Kawamura M., Kikura-Hanajiri R., Goda Y. Identification of two new-type designer drugs, piperazine derivative MT-45 (I-C6) and synthetic peptide noopept (GVS-111), with synthetic cannabinoid A-834735, cathinone derivative 4-methoxy- α -PVP, and phenethylamine derivative 4-methylbuphedrine from illegal products. *Forensic Toxicology* 32(1), 9-18, 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11419-013-0194-5>.
 24. Chemical and analytical data on controlled and new psychoactive substances for forensic drug chemists. [cited 12 January 2016]. Available from: <http://forendex.southernforensic.org/index.php/detail/index/1251>.
 25. Etheridge D. (2007). Microsoft Office Excel 2007 Data Analysis: Your Visual Blueprint for Creating and Analyzing Data, Charts, and Pivot Tables. 3rd ed. *Wiley Publishing, Indianapolis, Indiana*.
 26. Noopept safety sheet data of Caiman Chemical Company, 2014. [cited 12 January 2016]. Available from: <https://www.caymanchem.com/msdss/14496m.pdf>.
 27. LogD Predictor. ChemAxon. [cited 12 January 2016] Available from: <https://disco.chemaxon.com/apps/demos/logd/>.
 28. Validation of Analytical Procedures: Methodology. (1996). *Geneva Q2B*. Incorporated in Q2(R1), 2005. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.
 29. Homocianu M., Airinei A., Dorohoi O. Solvent effects on the electronic absorption and fluorescence spectra. *Journal of Advanced Research in Physics* 2(1), 1-9, 2011. Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1007.2329&rep=rep1&type=pdf>.

Clinical/instrumental survey. Cosmetic effectiveness evaluation of a beauty product supporting the reduction of skin blemishes caused by cellulite*

Fulvio Marzatico¹, Angela Michelotti¹, Michela Qualini², Sofia Sfetsa³, Vasia Gitika³, Vassilis Panou³, Nikos Karagiannidis³

¹ *Univercity of Pavia, Department of Physiological-Pharmacological Cellular and Molecular Sciences, Pharmacology and Pharmaceutical Biotechnology Division*

² *Department of Dermatology and Venereology, University of Pavia*

³ *Department of R&D and Marketing PHARMACROS Group*

Summary

Cosmetic effectiveness evaluation of a beauty product supports the reduction of skin blemishes caused by cellulite. Cellulite is the herniation of subcutaneous fat within fibrous connective tissue that manifests topographically as skin dimpling and nodularity, often on the pelvic region (specifically the buttocks), lower limbs and abdomen. In the present work the evalua-

tion of the product. BodyeCrackle™ to reduce cellulite was performed in 20 healthy female volunteers using clinical tests including thermography, cellulite degree and tenderness to palpation, thigh and knee circumference measurements and self-evaluation. A positive influence on the parameters taken into consideration in all tested subjects was observed.

KEY WORDS: Cellulite, clinical tests, thigh and knee circumference measurements, self-evaluation

1. Introduction

Cellulite, common term for edematous fibro-sclerotic panniculopathy, is an inflammation affecting adipose tissues, interstitial tissues (i.e. situated within the cells) and the thinnest blood vessels on a subcutaneous level¹.

Cellulite is the herniation of subcutaneous fat within fibrous connective tissue that manifests topographically as skin dimpling and nodularity, often on the pelvic region (specifically the buttocks), lower limbs and abdomen². Cellulite is a secondary sex characteristic, occurring in most postpubescent females³. The causes

of cellulite include changes in metabolism, physiology, diet and exercise habits, sex-specific dimorphic skin architecture⁴, alteration of connective tissue structure, hormonal factors, genetic factors, the microcirculatory system, the extracellular matrix and subtle inflammatory alteration⁵. There are currently many possible treatment of cellulite as skin care and non-invasive therapy⁶.

As a consequence of the alteration of the fibrous connective tissues in cellulite there is an increase in the mass of adipose cells, water retention and fluids stagnation⁵. The development of cellulite can be divided into 4 stages:

***The study was conducted under the supervision of the Professors:**

Dr. Fulvio Marzatico (Scientific Supervisor), Dr. Michela Quaglini (Experimenter), Dr. Angela Michelotti (Biologist)

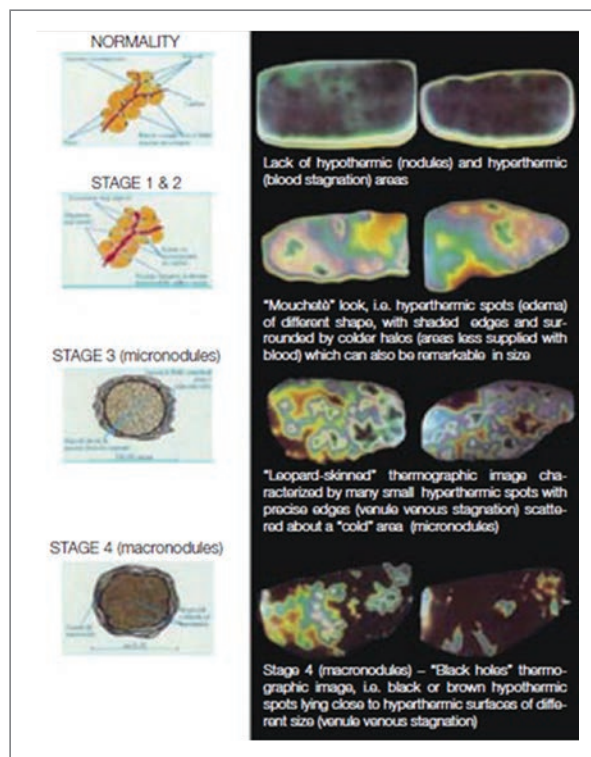


Figure 1: Evolution stages of cellulite

STAGE 1: At this stage, known as edematous phase, the most prominent feature is liquids stagnation and cellulite is noticeable only to the touch. Clinical presentation is characterized by subjective ailments such as heaviness and tingling sensations in the lower limbs and objective troubles like swelling.

Note: Edema (from Greek oidema, swelling) consists in an excess accumulation of serous fluid, called interstitial fluid, located within connective tissues on the outside of blood vessels and cells.

STAGE 2: This stage, known as fibrous phase, is distinguished by the spreading of the ailment which now affects adipose tissues as well. Elastic fibres (whose characteristic is to make the skin smooth and taut) are squeezed by the swelling of adipose cells. As a consequence, the skin looks less elastic and loses its natural brilliance. At this stage cellulite is visible due to the appearance of puckers and dimples on the skin surface. Fluids stagnation and circulation disorders cause a swelling of individual adipocytes.

STAGE 3: This stage, known as sclerotic stage, is the final result of the tissues deterioration. Connective tissue, a gelatinous covering substance which is found in all organs of the human body, is altered irreparably. The molecules of which it is formed start piling up and make this tissue always harder and thicker. These tissue modifications end up involving all other structures: adipose cells, blood vessels, water, elastic fibres and collagen⁵. Eventually the alteration becomes such to form many little nodules made of trapped fat also known as micronodules. Micronodules are unmodifiable. Dimples and swellings are clearly visible on the skin surface, giving it the typical "mattress" look.

STAGE 4: At this stage, subcutaneous fat architecture is overthrown and replaced by stiff macronodules encapsulated in the hypodermis. Macronodules tend to squeeze the remaining normal adipocytes,¹⁶ causing a sclerotic degeneration. This is the irreversible stage of cellulite. Cellulite, then, is a condition of microcirculation deficit that causes damages to adipose tissues. Cellulite is due to a complicated interplay of:

- Genetic reasons
- Constitutional causes
- Hormonal and vascular causes

To this it is to add a range of other factors (bad eating habits, liver troubles, overweight etc..) that lead to a worsening of cellulite. The developmental process of cellulite can be monitored by means of contact thermography and thermographic plates (**Figure 1**).

2. Materials and methods

Product: BodyCrackle™

FORMULATION

BUTANE, AQUA, ALCOHOL DENAT, PROPANE, GLYCERIN, ISOBUTANE, PPG-8-CETETH-20, CAFFEINE, ALOE BARBADENSIS LEAF EXTRACT, CAMELLIA SINENSIS LEAF EXTRACT, THEOBROMA CACAO EXTRACT, BETULA ALBA LEAF EXTRACT, CENTELLA ASIATICA EXTRACT, HEDERA HELIX FLOWER EXTRACT, PUNICA GRANATUM BARK EXTRACT, FUCUS VESCICULOSUS EXTRACT, CARNITINE HCL, HUMULUS LUPULUS EXTRACT, GLYCINE SOJA SEED EXTRACT, ANANAS SATIVUS FRUIT EXTRACT, CAPSICUM ANNUUM FRUIT EXTRACT, METHYL NICOTINATE, THEOBROMINE, LIMONENE, LINALOOL, CITRAL, DIMETHICONE, PARFUM, HYDROXYETHYLCELLULOSE, PROPYLENE GLYCOL, PHENOXYETHANOL, O-CYMEN-5-OL.

-Information Provided by the Client

All the cosmetic products undergone the test are produced without using any of those substances whose employment in cosmetic and personal hygiene products is forbidden by the EEC law. All preservatives included in the formula appear on the white list published by the EEC and are used with a concentration suiting the uses prescribed by this law. Besides, all limits and warnings cited in the EEC Regulation 76/768 were respected for all those substances to which a concentration limit was set. All ingredients have Bibliography- References.⁷⁻¹⁸

-Instructions of Use and Application of the Product

The product is used following instructions provided by the client. For further information on the use and application modalities please refer to the corresponding paragraph in the "materials and methods" section.

Experimental Sample

A group made of 20 healthy female volunteers. This test was conducted following the ethical principles on medical research.

Ethical Principles for Medical Research

The test is carried out in accordance with the principles cited in the World Medical Association Declaration of Helsinki - Ethical principles on medical research involving human subjects - Adopted by the 18 th WMA General Assembly Helsinki, Finland, June 1964 and amended by the 29 th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, 35th WMA General Assembly, Venice, Italy, October 1983, 41st WMA General Assembly, Hong Kong, September 1989, 48th WMA General Assembly, Somerset West, Republic of South Africa, October 1996, and the 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000.

Personal Data Processing

All personal information provided by the volunteers was treated as prescribed by the Italian law (D.lg. 196, June 30th 2003, dealing with sensitive data protection).

Selection of the Volunteers:

To carry out the survey 20 female volunteers affected

by cellulite at stage 1 to 3 were selected. All volunteers were chosen by the dermatologist following specific parameters:

- Thermography as a means of evaluation of the stage of cellulite.
- The dermatologist, using thermographic plates, estimated the phase of cellulite.
- Clinic evaluation of the stage of cellulite. The dermatologist, in association with the volunteer, pointed out typical troubles derived from cellulite.

Recruitment occurred when the following inclusion criteria were met:

- Healthy female subjects
- Age ranging from 18 to 40
- Race*: Caucasian (to be intended in a strictly biological sense and without any discrimination purpose)
- Cellulite stage: 1 to 3
- Subjects who hadn't taken part in similar tests during the previous two months
- Subjects who were well aware of the test procedures and signed the informed consent form.

Exclusion criteria included:

- Subjects who doesn't meet one or more inclusion criteria
- Pregnant and nursing women
- History of allergy or sensitivity to cosmetic products, sunscreens and/or topical medications
- Positive anamnesis for atopic dermatitis
- Subjects with dermatological troubles in the test areas
- Subjects undergoing pharmacological therapy (both local and systemic).

After the recruitment the subjects received the product to be tested.

Anatomical Parts on which the product was tested

The product was applied on glutei and thighs with a light circular massaging motion until the product was completely absorbed. All measurements were taken on a section of the thigh set at 1/3 of the distance between the top of the thigh-bone and the knee.

Instructions on Application of the Product

Product was applied pure (not diluted) on clean skin with a light circular massaging motion until completely absorbed. Three knobs of product was the quantity put on each leg twice a day (in the morning and again in the evening).

Table 1. Tenderness to palpation /Scores	
TENDERNESS TO PALPATION	SCORE
Sharp pain as a reaction to palpation or touch	3
Pain during the early stage of palpation, tends to disappear while massaging	2
Light pain as a reaction to palpation	1
Complete lack of pain	0

Parameters considered

At the moment of recruitment and after 2, 4 and 8 weeks after the first application of the product. The following clinical and instrumental parameters were registered:

- Clinical Tests:
 1. Thermography
 2. Cellulite degree
 3. Tenderness to palpation
- Thigh and knee circumference measurements
- Self-evaluation

At the end of the experimentation all volunteers were asked to give their personal opinion on the following characteristics of the product:

- Tolerability of the product
- Cosmetic agreeableness.

Self-evaluation

1. Tolerability
2. Effectiveness
3. Agreeableness
4. Duration of the bottle (in weeks).

Tenderness to palpation was scored as listed in **Table 1**. Clinical tests were carried out according to the scores and all clinical evaluations were processed by the dermatologist.

Thigh and Knee Circumference Measurements

All thigh and knee circumference measurements were taken using a flexible rule with millimeter division.

Pictures Analysis

All pictures were taken after 0 and 6 weeks of product application, using KODAK EASY SHARE DX6490 (© Eastman Kodak Company, 2003 - Kodak and Easy Share Eastman Kodak Company's trademarks). Image quality level was set to 2,304 x 1,728 pixels (4.0 Mp).



Figure 2: Cell-meter

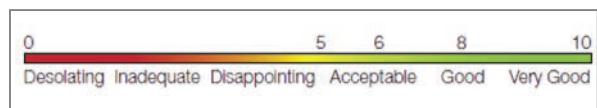


Figure 3. Information on how to read the scale for Self-evaluation

Contact Thermography

All thermographic surveys were carried out using Cell-Meter system (**Figure 2**) Professional kit's thermographic plates. Contact thermography makes the most of the capacity of cholesterol liquid crystals to rotate on their own axis and modify their layout according to the temperature. To every spatial modification corresponds a distinct refraction of beams of light which turn a different color depending on the light impact on cholesteric microcrystals, as happens with prisms. According to the local variations of skin temperature, different changes in colors enables a valuation of the extent and seriousness of microcirculatory damages on a both cutaneous and hypodermic level. For this purpose it's important to make use of liquid crystals plates (whose characteristics are high flexibility and high

resolution (6 to 8 colors, H.P.T.C.)) which are capable of pointing out different skin temperatures and turn a different color according to those.

Self-Evaluation

All volunteers passed their own judgement using an arbitrary scale ranging from 0 to 10. Information on how to read the scale is provided in **Figure 3**.

Statistical Analysis

All collected data were grouped together and repeatedly analyzed using ANOVA (Variance analysis). Tukey's test was performed as posttest.

3. Results

Results are presented in detail for all tests performed.

-Thigh Circumference Measurement

All data concerning the "thigh circumference measurement" parameter (in cm) registered at each stage of the experimentation are shown in **Table 2**. T0, T2, T4 & T8 correspond to time 0, week 2, week 4 and week 8 respectively. The chart in **Figure 4** displays the average values taken from **Table 2** versus time points.

The results presented in **Table 2** and **Figure 4** show that treatment with the product being tested produces a time proportionated thigh circumference thinning. Maximum reduction value (3.1cm) was registered 8 weeks after the beginning of the program.

-Knee Circumference Measurement

All data concerning the "knee circumference measurement" parameter (in cm) registered at each stage of the experimentation are shown in **Table 3**. T0, T2, T4, & T8 correspond to time 0, week 2, week 4 and week 8 respectively. The chart in **Figure 5** displays the average values taken from **Table 3** versus time points.

As shown in **Table 3** and **Figure 5** treatment with the product being tested produces a time proportionated knee circumference thinning. Maximum reduction value (2.1cm) was registered 8 weeks after the beginning of the program.

-Clinical Analysis: Tenderness to Palpation

All data concerning the "tenderness to palpation" clinical parameter registered at each stage of the

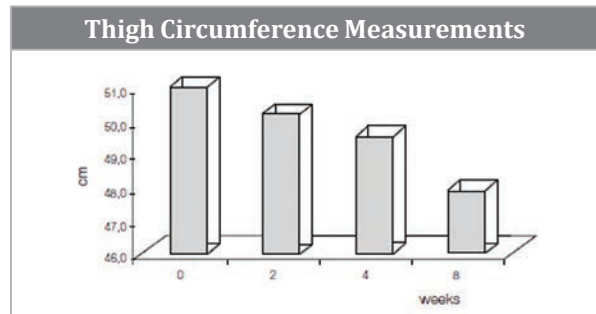


Figure 4: The Thigh Circumference Measurements parameter versus time points

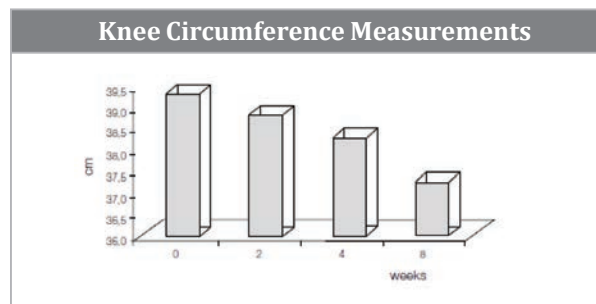


Figure 5: The Knee Circumference Measurements parameter versus time point

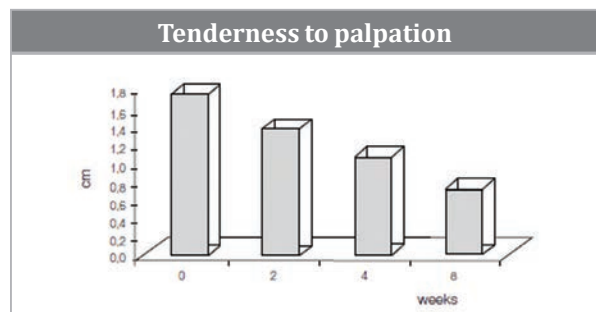


Figure 6: Average values of "tenderness to palpation". Versus time points

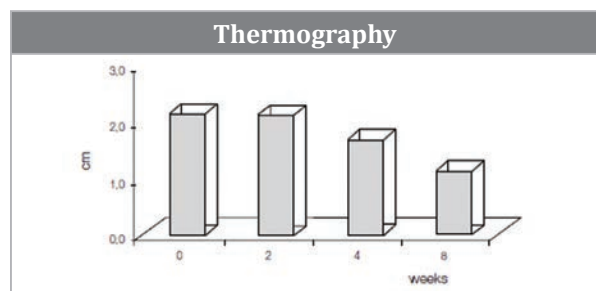


Figure 7: The average Cellulite degree" clinical parameter versus time points

Table 2. The “thigh circumference measurement” parameter (in cm)

Volunteer Numb.	T0	T2	T4	T8	VARIATIONS		
					T2-T0	T4-T0	T8-T0
01CP	51,0	50,4	49,5	47,6	-0,6	-1,5	-3,4
02BL	48,5	48,0	48,0	45,6	-0,5	-0,5	-2,9
03AA	48,0	48,0	46,4	44,8	0,0	-1,6	-3,2
04AF	48,6	46,5	46,0	46,0	-2,1	-2,6	-2,6
05SF	43,0	43,2	43,0	40,4	0,2	0,0	-2,6
06AG	53,9	55,0	53,0	51,5	1,1	-0,9	-2,4
07GM	46,5	46,0	46,4	44,6	-0,5	-0,1	-1,9
08SD	47,0	45,0	42,8	42,0	-2,0	-4,2	-5,0
09DVG	55,8	53,9	53,0	52,6	-1,9	-2,8	-3,2
10TML	50,8	49,8	50,0	48,6	-1,0	-0,8	-2,2
11CA	57,3	57,0	57,0	55,2	-0,3	-0,3	-2,1
12OL	58,9	55,6	56,0	53,8	-3,3	-2,9	-5,1
13DP	56,0	55,0	55,0	52,8	-1,0	-1,0	-3,2
14GG	47,6	48,0	47,8	48,0	0,4	0,2	0,4
15BMA	56,4	55,4	55,0	53,2	-1,0	-1,4	-3,2
16AA	52,0	51,2	50,6	48,6	-0,8	-1,4	-3,4
17MA	45,6	44,8	43,0	42,1	-0,8	-2,6	-3,5
18GA	48,4	48,0	47,6	44,4	-0,4	-0,8	-4,0
19MN	53,2	52,6	51,2	49,4	-0,6	-2,0	-3,8
20GS	50,4	49,6	48,4	46,5	-0,8	-2,0	-3,9
Average	50,9	50,2	49,5	47,9	-0,8	-1,5	-3,1
Margin of error	1,0	0,9	1,0	1,0			

Table 3. The “knee circumference measurement” parameter (in cm) registered at each stage of the experimentation.

Volunteer Numb.	T0	T2	T4	T8	VARIATIONS		
					T2-T0	T4-T0	T8-T0
01CP	39,0	39,5	38,0	37,2	0,5	-1,0	-1,8
02BL	37,4	37,0	36,4	36,0	-0,4	-1,0	-1,4
03AA	36,0	35,0	35,0	33,3	-1,0	-1,0	-2,7
04AF	40,5	40,0	40,0	37,4	-0,5	-0,5	-3,1
05SF	38,0	38,0	36,5	35,6	0,0	-1,5	-2,4
06AG	42,0	42,5	41,0	40,2	0,5	-1,0	-1,8
07GM	42,0	41,5	41,0	40,6	-0,5	-1,0	-1,4
08SD	34,6	33,5	33,6	33,0	-1,1	-1,0	-1,6
09DVG	43,8	42,0	42,4	41,8	-1,8	-1,4	-2,0
10TML	39,0	38,1	37,6	36,4	-0,9	-1,4	-2,6
11CA	45,4	45,0	44,4	43,0	-0,4	-1,0	-2,4
12OL	45,0	44,0	44,0	42,2	-1,0	-1,0	-2,8
13DP	31,4	31,0	30,2	29,8	-0,4	-1,2	-1,6
14GG	37,8	37,8	37,8	38,0	0,0	0,0	0,2
15BMA	36,5	36,0	35,6	34,2	-0,5	-0,9	-2,3
16AA	40,2	40,0	39,5	37,6	-0,2	-0,7	-2,6
17MA	38,4	38,0	37,6	36,2	-0,4	-0,8	-2,2
18GA	35,6	36,0	34,2	32,3	0,4	-1,4	-3,3
19MN	40,2	38,4	38,0	38,6	-1,8	-2,2	-1,6
20GS	42,6	42,0	41,2	40,4	-0,6	-1,4	-2,2
Average	39,3	38,8	38,2	37,2	-0,5	-1,1	-2,1
Margin of error	0,8	0,8	0,8	0,8			

Table 4. The “tenderness to palpation” clinical parameter registered at each stage of the experimentation

Volunteer Numb.	T0	T2	T4	T8	VARIATIONS		
					T2-T0	T4-T0	T8-T0
01CP	1	1	0	0	0,0	-1,0	-1,0
02BL	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0
03AA	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0
04AF	3	2	2	2	-1,0	-1,0	-1,0
05SF	2	1	1	1	-1,0	-1,0	-1,0
06AG	3	3	2	2	0,0	-1,0	-1,0
07GM	1	0	0	0	-1,0	-1,0	-1,0
08SD	0	0	0	0	0,0	0,0	0,0
09DVG	2	1	1	1	-1,0	-1,0	-1,0
10TML	2	2	2	1	0,0	0,0	-1,0
11CA	2	2	1	1	0,0	-1,0	-1,0
12OL	3	2	2	1	-1,0	-1,0	-2,0
13DP	1	0	0	0	-1,0	-1,0	-1,0
14GG	1	1	1	0	0,0	0,0	-1,0
15BMA	3	3	3	2	0,0	0,0	-1,0
16AA	2	2	2	1	0,0	0,0	-1,0
17MA	3	3	2	2	0,0	-1,0	-1,0
18GA	2	1	1	0	-1,0	-1,0	-2,0
19MN	3	2	1	0	-1,0	-2,0	-3,0
20GS	1	1	0	0	0,0	-1,0	-1,0
Average	1,8	1,4	1,1	0,7	-0,4	-0,7	-1,1
Margin of error	2,0	1,0	1,0	0,5			

Table 5. “Thermography: Cellulite degree” clinical parameter registered at each stage of the experimentation

Volunteer Numb.	T0	T2	T4	T8	VARIATIONS		
					T2-T0	T4-T0	T8-T0
01CP	2	2	2	1	0,0	-1,0	-1,0
02BL	2	2	1	1	0,0	0,0	0,0
03AA	1	1	0	0	0,0	0,0	0,0
04AF	3	3	3	2	-1,0	-1,0	-1,0
05SF	3	3	3	2	-1,0	-1,0	-1,0
06AG	3	3	2	2	0,0	-1,0	-1,0
07GM	2	2	2	1	-1,0	-1,0	-1,0
08SD	1	1	1	0	0,0	0,0	0,0
09DVG	2	2	1	1	-1,0	-1,0	-1,0
10TML	2	2	2	1	0,0	0,0	-1,0
11CA	3	3	3	2	0,0	-1,0	-1,0
12OL	3	3	2	2	-1,0	-1,0	-2,0
13DP	1	1	1	0	-1,0	-1,0	-1,0
14GG	1	1	0	0	0,0	0,0	-1,0
15BMA	3	3	2	2	0,0	0,0	-1,0
16AA	3	3	3	2	0,0	0,0	-1,0
17MA	2	2	2	1	0,0	-1,0	-1,0
18GA	2	2	2	1	-1,0	-1,0	-2,0
19MN	2	2	1	1	-1,0	-2,0	-3,0
20GS	1	1	1	0	0,0	-1,0	-1,0
Average	2,1	2,1	1,7	1,1	-0,4	-0,7	-1,1
Margin of error	2,0	2,0	2,0	1,0			

experimentation are presented in **Table 4**. The average values are displayed versus time points in **Figure 6**. Results in **Table 4/Figure 6** show that treatment with the product being tested produces a reduction of the clinical parameter “tenderness to palpation”. This reduction is to be associated with an improvement of subcutaneous blood perfusion.

-Clinical Analysis: Thermography: Cellulite Degree

All data concerning the “Thermography: Cellulite degree” clinical parameter registered at each stage of the experimentation are presented in **Table 5**. The average values are displayed versus time points in **Figure 7**. Treatment with the product being tested produces an improvement of subcutaneous blood perfusion.

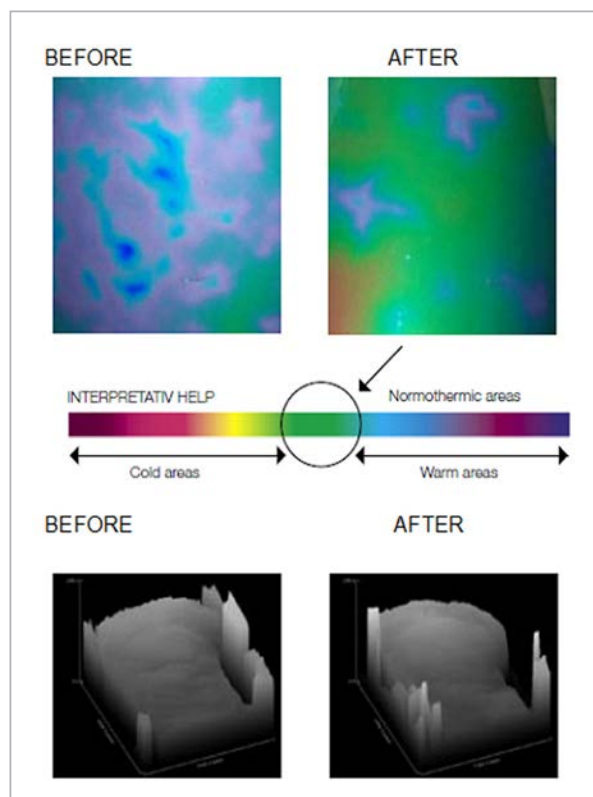


Figure 8: Pictures before and at the end of treatment

-Thermography Images

Table 6	Percentage
0-7 days	20,0%
0-14 days	35,0%
14-21 days	30,0%
21-28 days	15,0%

In **Figure 8**, picture number 1, taken before the beginning of the treatment, shows a thermographic image known as “leopard-skinned” indicating cellulite at its 3rd stage. Picture number 2, taken after the end of the treatment, shows a thermographic image closer to normality and thus indicating cellulite at its 1st/2nd stage.

Pictures show cutaneous relief before and after the treatment. It's possible to notice how an application of this product produces an improvement in the aesthetic appearance of the skin, which results smooth and even.

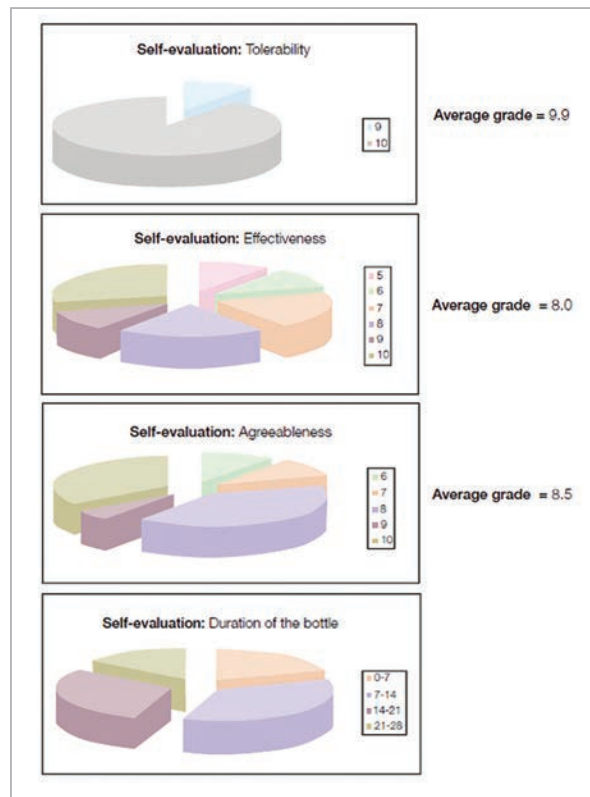


Figure 9: Results of self-evaluation

-Self-Evaluation

Results for tolerability, effectiveness, agreeableness and duration of bottle are presented in **Figure 9**. **Table 6** displays percentage data related to the duration of the bottle divided into classes. The middle value of the duration of the bottle is 15.1 days. The median value of the duration of the bottle is 14.0 days.

4.Conclusion:

Given what expounded above, it is possible to declare that during the period of treatment the cosmetic product known as: BodyeCrackle™ had a positive influence on the parameters taken into consideration in all tested subjects. More specifically:

- It produces a thinning of thighs and knees
- It produces an improvement of subcutaneous blood perfusion in treated areas
- It reduces skin imperfections caused by cellulite improving skin appearance.

The product was favorably judged by all tested subjects. □

References

- Rossi A.B., Vergnanini A.L. Cellulite: A review. *J.Eur. Acad.Dermatol. Venereol.* 14, 251-262, 2000.
- Avram M.M. Cellulite: A review of physiology and treatment. *J.Cosmet. Laser Ther.* 6, 181-185, 2004
- Janda K. Tomikowska A. Cellulite - causes, prevention, treatment. *Ann. Acad. Med. Stetin.* 60, 29-38, 2014.
- Pavicic T. Borelli C., Korting H.C. Cellulite-the greatest skin problem in healthy people? *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 4, 861-870, 2006.
- Terranova F., Berardesca E., Maibach H. Cellulite: Nature and aetiopathogenesis. *Int. J.Cosmet. Sci.* 28, 157-167, 2006.
- Gold M. H. Cellulite-an overview of non-invasive therapy with energy-based systems. *JDDG.* 10, 553-558, 2012.
- Gannon N.P., Lambalot E.L., Vaughan R.A. The effects of capsaicin and capsaicinoid analogs on metabolic molecular targets in highly energetic tissues and cell types. *Biofactors* 42, 229-246, 2016.
- Gilardini L, Pasqualinotto L, Di Pierro F, Risso P, Invitti C.: Effects of Greenselect Phytosome® on weight maintenance after weight loss in obese women: A randomized placebo-controlled study. *BMC Complement Altern. Med.* 16, 233, 2016.
- Kumari S., Deori M., Elancheran R., Kotoky J., Devi R. In vitro and In vivo Antioxidant, Anti-hyperlipidemic Properties and Chemical Characterization of Centella asiatica (L.) Extract. *Front Pharmacol.* 7: 400, 2016. eCollection 2016.
- Varghese S, Kubatka P, Rodrigo L, Gazdikova, Caprnda M, Fedotova J, Zulli A, Kruzliak P, Büßelberg D. Chili pepper as a body weight-loss food. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 1-10, 2016.
- Morganti P, Fionda A, Elia U, Tiberi L. Extraction and analysis of cosmetic active ingredients from an anti-cellulitis transdermal delivery system by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci.* 37,51-5, 1999.
- Rahman S, Carter P, Bhattarai N. Aloe Vera for Tissue Engineering Applications. *J. Funct. Biomater.* 8(1) 2017. pii: E6. doi: 10.3390/jfb8010006.
- Pooyandjoo M., Nouhi M., Shab-Bidar S., Djafarian K., Olyaeemanesh A. The effect of (L-)carnitine on weight loss in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes Rev.* 17, 970-976, 2016.
- Azman N.A., Skowryra M., Muhammad K., Gallego M.G., Almajano M.P. Evaluation of the antioxidant activity of Betula pendula leaves extract and its effects on model foods. *Pharm. Biol.* 55, 912-919, 2017.
- Janssens P.L., Hursel R., Westerterp-Plantenga M.S. Nutraceuticals for body-weight management: The role of green tea catechins. *Physiol Behav.* 162, 83-87, 2016.
- Suzuki A., Saeki T., Ikuji H., Uchida C., Uchida T. Brown Algae Polyphenol, a Prolyl Isomerase Pin1 Inhibitor, Prevents Obesity by Inhibiting the Differentiation of Stem Cells into Adipocytes. *PLoS One.* 11(12) 2016. e0168830.
- Tanaka M., Yamamoto Y., Misawa E., Nabeshima K., Saito M., Yamauchi K., Abe F., Furukawa F. Effects of Aloe Sterol Supplementation on Skin Elasticity, Hydration, and Collagen Score: A 12-Week Double-Blind, Randomized. Controlled Trial. *Skin Pharmacol. Physiol.* 29, 309-317, 2016.
- Dal'Belo S.E., Gaspar L.R., Maia Campos P.M. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. *Skin Res. Technol.* 12, 241-246, 2006.

ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ | MEETINGS

9 - 12 OCTOBER 2016

VIENNA, AUSTRIA

16th International Symposium on Preparative and Industrial Chromatography and Allied Techniques

www.spica2016.org

20 - 23 OCTOBER 2016

SPARTA, GREECE

2nd World Congress 'Genetics, Geriatrics and Neurodegenerative Diseases Research',

<http://www.genedis.eu/>

18 NOVEMBER 2016

BUDAPEST, HUNGARY

VI Meeting of the Paul Ehrlich Euro-PhD Network

<http://phdcongress.com>

<http://www.pehrlichmedchem.eu>

24 - 25 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2016

ΑΘΗΝΑ

Διημερίδα Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας

«Η βιβλιογραφία ως “πολυδύναμο εργαλείο” για την επιστήμη»

www.effe.org.gr/

11 - 12 FEBRUARY 2017

ΑΘΗΝΑ

Επιστημονική Ημερίδα Ελληνικής Φαρμακευτικής Εταιρείας

Zappeion Conference and Exhibition Center

18 - 19 ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΥ 2017

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ

3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Φαρμακευτικών Τμημάτων

Αίθουσα Τελετών του ΑΠΘ

www.pharma.edu.gr

ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ | MEETINGS

18 - 19 FEBRUARY 2017

ΑΘΗΝΑ

1^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φαρμακευτικής Φροντίδας
Ελληνική Φαρμακευτική Εταιρεία

Εκθεσιακό Κέντρο Metropolitan Expo, Αθήνα

1 - 3 JUNE 2017

THESSALONIKI, GREECE

17th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (HSMC-17)

www.hsmc.gr

11 - 14 JUNE 2017

COPENHAGEN, DENMARK

1st RSC Anglo-Nordic Medicinal Chemistry Symposium

<http://www.rsc.org/events/detail/23370/1st-rsc-anglo-nordic-medicinal-chemistry-symposium>

25 - 28 JUNE 2017

DUBROVNIK, CROATIA

Joint Meeting on Medicinal Chemistry

<http://www.jmmc2017.hr/>

31 AUGUST - 1 SEPTEMBER 2017

VIENNA, AUSTRIA

EFMC-YMCS 2017 - 4th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium

[EFMC-YMCS website](#)

5 - 8 SEPTEMBER 2017

BRATISLAVA, SLOVAKIA

46th EuroCongress on Drug Synthesis and Analysis

<https://sites.google.com/site/cfph2017>