

Extraits de livre et articles

1) **Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie**

Marie-Claude Martini (ISBN : 2743005912), page 331

2) **Actifs et additifs en cosmétologie : Les antioxydants**

Marie-Claude Martini, Monique Seiller Coordonnatrices

Éditions Tec & Doc

ISBN : 2-7430-0191-7 (2^{ième} édition)

Pages 337 à 352 du chapitre 18 Les antioxydants

par Jean-Paul Helme, Jean-Bernard Chazan, Jean-Louis Perrin.

3) **Understanding free radicals and antioxidants**

Article extracted from: NutraCos January/February 2004 Antioxydants directory, page 68

4) **Polyphenols extraits de co-produits végétaux**

Article tiré de : Arômes Ingrédients Additifs No 51 – Avril/Mai 2004-08-26, page 12 Actualité

Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie

Marie-Claude Martini (ISBN : 2743005912)

Page 331

Antioxydants

Les antioxydants présents dans les produits cosmétiques et les préparations de dermatopharmacie sont soit d'origine synthétique, soit d'origine naturelle. Ce sont tous des réducteurs capables d'interrompre la réaction de peroxydation et d'empêcher la formation des hydroperoxydes et des peroxydes à partir des huiles insaturées en particulier. Ils sont introduits dans toutes les formulations contenant des corps gras insaturés et parfois aussi dans des phases aqueuses où se trouvent des extraits végétaux riches en oxydases. Leur concentration d'utilisation est généralement dix fois plus faible que celle des conservateurs et se situe entre 0,02 et 0,05 %. Ce sont :

► POUR LES SYNTHÉTIQUES

- le dibutylhydroxytoluène (BHT) ;
- le butylhydroxyanisole (BHA) ;
- les gallates de propyle, octyle, dodécyle.

► POUR LES NATURELS

- l' α -tocophérol et son acétate ;
- l'acide ascorbique et le palmitate d'ascorbyle ;
- les extraits de romarin, de *gingko biloba* ;
- l'orizanol.

Ils sont tous liposolubles, à l'exception du propyl gallate et de l'acide ascorbique.

Ils ne sont pas soumis à une législation quelconque ni en pharmacie, ni en cosmétique.

Actifs et additifs en cosmétologie

Marie-Claude Martini, Monique Seiller Coordonnatrices

Éditions Tec & Doc

ISBN : 2-7430-0191-7 (2^{ème} édition)

Pages 337 à 352 du chapitre 18

Les antioxydants

par Jean-Paul Helme, Jean-Bernard Chazan, Jean-Louis Perrin.

3. Antioxydants utilisés en cosmétique

Les antioxydants utilisés en cosmétique devront répondre à des critères de choix sévères. En effet, ils doivent protéger de l'oxydation due à l'air, mais aussi des dégradations photo-induites, ne pas altérer l'aspect, l'odeur ou la couleur du produit, ne pas être toxique ou allergisant (3) (7).

3.1. Tocophérols (vitamine E) (8)

Les tocophérols et tocotriénols représentent une famille très homogène de produits, constitués d'un reste hydroquinone substitué par un ou plusieurs groupes méthyles, et d'une chaîne polyisoprénique plus ou moins saturée (figure 4). Tous les tocophérols et tocotriénols naturels présentent la même configuration 2R au niveau du cycle chromane, qui s'interprète par la biogenèse de ces substances à partir d'un équivalent du phytol. Deux autres centres d'asymétrie de configuration R existent en 4' et 8' de la chaîne phytyle tandis que les tocotriénols présentent la configuration E (*trans*) en 3', 4' et 7', 8' au niveau de la chaîne polyisoprénique.

Les huit tocophérols et tocotriénols naturels isolés diffèrent entre eux par le nombre et la position relative des méthyles sur le cycle aromatique, mais la chaîne isoprénoïde est identique dans chacune des sous-familles. On les appelle α , β , γ et δ -tocophérols et tocotriénols.

L'all-*rac*- α -tocophérol est un isomère de l' α -tocophérol obtenu par une condensation non stéréospécifique entre la triméthylhydroquinone, et une chaîne polyisoprénique de synthèse. On le trouvera également sous le nom de (dl)- α -tocophérol ainsi que son dérivé monoacétylé, l'acétate de (dl)- α -tocophérol.

Il est important de bien préciser à quel isomère on a affaire, car l'activité antioxydante est fortement tributaire de la structure.

Il existe d'ailleurs une controverse quant à l'activité antioxydante de l' α -tocophérol, et à l'échelle d'activité des produits homologues. En effet, il a été montré, notamment par Cillard (9), qu'une concentration dans l'huile de soja supérieure à 0,1 % (1 000 ppm), l' α -tocophérol joue le rôle de pro-oxydant. Il semble que des quatre principaux tocophérols, l' α -tocophérol soit plus rapidement oxydé à l'air et formerait un excès de radicaux libres tocophéroxyles susceptibles de relancer le mécanisme de l'autoxydation. Les professionnels admettent généralement une échelle d'activité antioxydante de l'ordre $\delta > \gamma > \alpha > \beta$ (10).

Disons en conclusion que les tocophérols sont largement utilisés en cosmétique, et principalement en association avec d'autres antioxydants.

Parmi les tocols, les seuls qui aient une importance pratique sont :

- l' α -tocophérol, principal tocophérol de l'huile de tournesol ou de l'huile d'olive, et considéré comme le plus actif du point de vue biologique ;
- le β -tocophérol, présent dans l'huile de germe de blé ;
- le γ -tocophérol, principal tocophérol de l'huile de soja, de colza et de maïs ;
- l' α -tocotriénol, présent dans l'huile de maïs et de palme.

Enfin, l'acétate de dl- α -tocophérol, produit de synthèse, et forme habituelle des spécialités pharmaceutiques à base de vitamine E. Notons qu'il n'est pas antioxydant *in vitro*, mais qu'il possède *in vivo* une activité biologique. La principale source de vitamine E est constituée par les huiles végétales. La législation française sur les additifs *alimentaires*, selon le décret de 1982, reconnaît 4 types de tocophérols dont les dénominations européennes sont E 306 à E 309 :

- E 306 (extraits d'origine naturelle riches en tocophérols), admis comme additif dans les margarines et les matières grasses destinées à l'alimentation et vendues par quantités unitaires d'au moins 1 kg à la dose de 500 mg/kg. Les spécifications du décret du 25 mai 1982 imposent la provenance (huiles végétales comestibles et leurs sous-produits) l'obtention par procédé physique, la teneur (pas moins de 34 %), rien en ce qui concerne l'activité de l'extrait ou la mesure de cette activité ;
- E 307 (α -tocophérols de synthèse) pour les mêmes usages et à la même dose, spécifié par sa composition chimique, sans mention de sa stéréochimie, et ses caractéristiques physiques, sans mention non plus de l'activité ;
- E 306 et E 307 sont autorisés dans les gommes à mâcher à 2,5 g/kg de gomme base, ainsi que les deux suivants ;
- E 308 γ -tocophérol de synthèse ;
- E 309 δ -tocophérol de synthèse.

Ces deux derniers sont toutefois beaucoup moins utilisés.

3.2. Autres antioxydants naturels

Dans la nature et en particulier dans le monde végétal, outre les tocophérols de certaines graines et plantes, de nombreuses autres substances présentent des propriétés antioxydantes : polyphénols de l'olivier, du chêne, sésamol des graines de sésame, flavonoïdes des plantes (quercétine, myricétine, etc.), huiles essentielles extraites d'épices et d'herbes : thym, carvi, cumin, clou de girofle, romarin, sauge. Selon Farag *et al.* (11), le pouvoir antioxydant, déterminé par oxydation en émulsion aqueuse du p-carotène par l'acide linoléique, de ces extraits serait par ordre décroissant :

carvi > sauge > cumin > romarin > thym > clou de girofle

Pour ces extraits naturels, certains travaux font état de pouvoirs antioxydant supérieurs à celui du BHT (11) (12).

3.3. Palmitate d'ascorbyle

C'est l'antioxydant de choix en cosmétique (10). En effet, l'acide ascorbique, dont l'activité antioxydante s'exerce à la fois comme capteur d'oxygène et comme antioxydant de rupture de chaîne, n'est utilisable qu'en solution aqueuse.

L'estérification de la fonction alcool primaire en 6 par l'acide palmitique confère au palmitate d'ascorbyle une certaine solubilité dans les graisses qui, quoique faible (500 ppm) lui donne son efficacité. Celle-ci s'exerce surtout en présence des tocophérols par un mécanisme de régénération de ces derniers.

La chaîne palmitique en soi n'a pas d'effet antioxygène et le palmitate d'ascorbyle ou l'acide 5,6-diacétyl ascorbique (E 303) ont pratiquement la même activité antioxydante que l'acide ascorbique sur une base moléculaire. Le palmitate d'ascorbyle s'utilise en général à la dose de 0,01 à 0,05 % (100 à 500 ppm).

3.4. Antioxydants phénoliques de synthèse

Il s'agit du butylhydroxytoluène ou BHT (E 321), du butylhydroxyanisole ou BHA (E 320) et des esters de l'acide gallique : gallate de propyle (E 310), gallate doctyle (E 311), et de dodécyle (E 312) (13).

Le BHT (2,6-ditertiobutyl 4-méthyl phénol) est un solide blanc, soluble dans les graisses et insoluble

dans l'eau. C'est un antioxydant de rupture de chaîne, très efficace et peu coûteux. Le BHA est un mélange de deux isomères de position, le 2-tertiobutyl 4-hydroxyanisole et le 3-tertiobutyl 4-hydroxyanisole, dont l'efficacité est un peu inférieure à celle du BHT. L'association du BHT et du BHA serait synergique.

Les deux produits ne sont pas très appréciés en cosmétique, en dehors même des réserves qui sont faites quant à leur innocuité, car ils peuvent être responsables de problèmes de coloration jaune en surface.

Les gallates ont l'avantage d'être dérivés d'un produit naturel, l'acide gallique, présent dans le clou de girofle. Les gallates d'octyle et de dodécyle sont solubles dans les graisses.

On peut rapprocher de ces produits l'éthoxyquin ou santoquin, qui n'est pas un phénol mais un dérivé de la quinoline. Ce produit d'utilisation encore limitée est cependant autorisé en utilisation alimentaire dans certains pays de l'Union européenne.

Pour être complets, nous citerons encore :

- la 2,4,5-trihydroxybutyrophénone (THBP) ;
- la tertibutylhydroquinone (TBHQ), légèrement soluble dans les graisses et utilisée aux États-Unis pour la conservation des huiles brutes à environ 0,05 g/kg (50 ppm). Il est interdit au sein de l'Union européenne ;
- l'acide nordihydrogualarétique (NDGA) soluble dans les lipides est utilisé aux États-Unis dans les produits à usage topique ;
- le 4-hydroxyméthyl 2,6-ditertibutylphénol ou Ionox 100, dont les propriétés antioxydantes sont voisines de celles du BHT.

Aucun de ces produits n'est autorisé dans l'Union européenne en utilisation alimentaire.

3.5. Antioxydants synergistes

Par définition, ce sont des substances qui ne sont guère actives en tant qu'antioxydants, et dont les propriétés apparaissent surtout en présence des autres antioxydants. Il en est ainsi des lécithines, des acides citrique et tartrique, des acides aminés, de certains flavonoïdes. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer ou le cuivre, dont on connaît bien l'effet pro-oxydant à faible dose. Cependant, ce n'est peut-être pas la seule explication, car plusieurs de ces produits sont d'assez mauvais chélatants. Certains produits ont un effet inhibiteur de la décomposition des hydroperoxydes, et d'autres semblent régénérer des antioxydants, comme les tocophérols ou les dérivés de l'acide ascorbique à partir de leurs formes oxydées. Un exemple d'association d'antioxydants agissant en synergie est donné (tableau 3).

C'est sans doute à ce groupe des synergistes qu'il faut rattacher les lipoaminoacides étudiés par Morelle *et al.* (3), qui trouveraient leurs applications spécifiques en cosmétologie. Ce sont des sels d'acides aminés basiques comme la lysine et l'arginine avec des acides gras. Ils sont commercialisés sous le nom de Lysofat®. Le glutathion a également été proposé en formulation cosmétique.

Tableau 3 ■ Effet synergique de l'association de plusieurs antioxydants (documentation Hoffmann-La Roche).

Echelle	Antioxygènes et synergistes (mg/kg de saindoux)			
	Palmitate d'ascorbyte	dl- α -tocophérol	Lécithine	Durée* (en jours)
Témoin	0	0	0	1
1	250	0	0	4
2	0	50	0	4
3	0	0	700	1
4	250	50	0	17
5	250	50	700	30

* Saindoux stocké à 65 °C en récipients ouverts. Temps mis pour atteindre un indice en peroxyde de 20 meq/kg.

4. Antioxydants en formulation

En cosmétique, les antioxydants seront principalement employés dans les formulations contenant des huiles végétales insaturées (par exemple huile d'amandes douces, de tournesol, de bourrache...). Il conviendra d'abord d'utiliser des huiles sans « passé historique oxydatif », avec un indice de peroxyde chimique (IPC) le plus faible possible et une quantité d'oxygène dissous dans l'huile très faible (si possible moins de 0,5 ppm).

C'est ainsi que, si les huiles raffinées (selon le protocole réglementaire de février 1973 pour les huiles alimentaires) ont en général des IPC très faibles, du fait de la désodorisation sous vide très poussé suivie de saturation à l'azote, certaines huiles vierges, provenant de graisses plus ou moins oxydées naturellement au cours du stockage, n'auront pas ces propriétés.

Nous venons de voir que les principaux antioxydants utilisés dans les formulations cosmétiques sont les tocophérols et les antioxydants phénoliques BHA, BHT et gallates. Nous devons rappeler ici que, si l'efficacité *in vivo* de l' α -tocophérol n'est pas contestée au niveau membranaire, son efficacité «*in vitro*» est en revanche controversée.

De plus, on peut dire qu'il est moins efficace que les autres tocophérols (β , γ et δ). Il est courant de dire que l'activité antioxygène des tocophérols varie dans l'ordre inverse de leur activité vitaminique. La supplémentation n'ajoute rien, surtout avec les huiles végétales qui contiennent des quantités importantes de tocophérols naturels, et si la dose est trop élevée, l'effet antioxydant s'inverse et se transforme en effet pro-oxydant. C'est le cas de l' α -tocophérol au-delà de 1 000 ppm. La littérature est abondante à ce sujet et les résultats sont souvent très contradictoires car ils dépendent de plusieurs paramètres : température, concentration, nature du substrat et principalement de son état oxydatif initial (mesure des absorptions à 232 et 268 nm, indice de carbonyle...), c'est-à-dire de son « histoire ».

Les tests accélérés étant souvent éloignés des conditions normales, le formulateur sera surtout intéressé par des tests empiriques simples : évolution organoleptique de la matière grasse de la crème, de sa couleur, de son odeur après application sur la peau (rancissement). Or, il est bien connu des lipochimistes de l'huilerie que l'on cherche encore le/ou les tests physicochimiques qui seraient corrélés avec les résultats organoleptiques.

Ni l'IPC, ni l'absorption dans l'UV, ni l'étude très fine des produits d'oxydation volatils et non volatils formés (par plusieurs techniques chromatographiques dont la CPG) ne donnent des réponses satisfaisantes. Le formulateur en sera donc réduit, ne disposant pas de règle universelle, à essayer chaque fois les divers

antioxygènes, seuls ou en mélange, dans les conditions d'utilisation. Beaucoup de temps peut être cependant gagné en utilisant des mélanges, pré-testés et proposés par certains fournisseurs, spécialistes de la formulation cosmétique et possédant des laboratoires d'application.

En règle générale, les produits sont des mélanges :

- de gallate de propyle, d'acide citrique et de tocophérol en solution dans un milieu huileux végétal ;
- de BHA, BHT, gallate de propyle, d'acide citrique.

La solubilité dans l'éthanol peut être amenée en utilisant une solution de tricapylocaprate de glycérol, de palmitate d'ascorbyle, de (dl)- α -tocophérol et lécithine. Cette liste n'est pas limitative mais l'idée de mélange et de tests empiriques sur la formule comme de l'utilisateur est en général retenue. S'il n'y a pas, comme nous l'avons dit, de règles universelles d'utilisation, les doses utilisées d'antioxydants base pure, sont faibles, de l'ordre de 0,5 à 1 pour 1000 par rapport au produit à protéger.

5. *Activité biologique et devenir des antioxydants au contact de la peau*

Qu'ils soient présents à l'origine ou ajoutés aux produits dans le but de les préserver contre l'oxydation, les antioxydants subissent le même sort que les autres constituants du cosmétique, celui d'être mis au contact avec la peau ou les muqueuses. Chacun des ingrédients devra présenter les caractères d'acceptabilité cosmétique et innocuité exigés d'une préparation de qualité (14).

5.1. **Absorption des antioxydants par la peau**

De manière générale, l'absorption des substances exogènes par la peau dépend de leur nature chimique, de la formule utilisée (dispersion, émulsion, concentration), du véhicule utilisé, de la présence de surfactifs, et de l'interaction avec d'autres substances éventuellement présentes. L'état de la peau conditionne aussi la pénétration des produits au contact (14) (15) (16).

Ainsi, Marty et Wepierre ont-ils étudié (17) l'absorption du BHA par une peau dont la couche cornée était rendue perméable par lavage et par une peau non lavée. La libération d'une substance exogène au niveau de l'épiderme et éventuellement au niveau du derme et de la circulation générale, est fonction du coefficient de partage de la substance entre le véhicule et la couche cornée. La constance de diffusion des molécules dissoutes au sein de la couche cornée est toujours extrêmement réduite et, compte tenu de la faible concentration des antioxydants dans les formulations, leur absorption est vraisemblablement très faible dans les couches profondes. Le taux d'absorption ne peut être mesuré que par des méthodes radiographiques. En tout état de cause, il y a très peu de risques que l'utilisation d'un produit cosmétique protégé contre l'oxydation par un antioxydant entraîne une diffusion systémique et une absorption supérieure à la dose journalière admissible (à supposer qu'elle ait été déterminée pour une utilisation comme antioxydant alimentaire). Le cas très particulier d'un talc contenant de l'hexachlorophène a montré que ce n'était que dans des circonstances très spécifiques (présence de lésions, concentrations accidentellement très élevées de la substance toxique), que la toxicité était apparue.

5.2. **Toxicité topique des antioxydants**

Pour les raisons exposées ci-dessus, le principal risque d'utilisation d'antioxydants en cosmétique est celui de réactions d'hypersensibilisation au contact du derme. On sait que les réactions sont fréquemment idiosyncrasiques et qu'il est possible de les mettre en évidence chez le sujet sensibilisé.

Dans le domaine alimentaire, des réactions d'hypersensibilité ont été recensées avec les gallates (surtout le gallate d'octyle), le BHA, le BHT et l'éthoxyquin (18). Il existe une très abondante littérature sur les effets biologiques des BHA/BHT, qui tourne autour de leur action au niveau du métabolisme énergétique de la

cellule - ce sont des agents découplants -, au niveau du foie où ils provoquent une hypertrophie à faible dose chez le rat qui s'accompagne de modifications biochimiques, au niveau des poumons chez la souris. Ces actions seraient dues non pas au BHT, mais à ses métabolites. Les effets cancérigènes directs ou promoteurs de la carcinogénicité d'autres molécules ont été recherchés avec des résultats contradictoires selon les modèles. Rien ne prouve que les études réalisées, où les antioxydants étaient administrés par voie générale, puissent être transposées à des produits pour usage externe. Il n'est pas certain, en particulier que les antioxydants qui ne sont absorbés qu'au niveau de la couche cornée soient l'objet d'une transformation métabolique.

En ce qui concerne les réactions allergiques aux antioxydants, on peut dire qu'elles sont peu nombreuses. Tous ces produits sont non irritants et peu sensibilisants. Des réactions de type urticaire ont été démontrées chez des sujets sensibilisés par le BHT ou BHA (19), ainsi que des dermatites de contact avec le gallate de propyle qui montre par ailleurs une forte capacité à sensibiliser le cobaye (20).

Dans le domaine cosmétique, on a également relevé des accidents allergiques avec les mêmes substances, mais ceci est également le cas de la vitamine E (20). En effet, des cas d'hypersensibilisation avec des cosmétiques contenant une concentration élevée de vitamine E ont été décrits, malgré la faible antigénicité des tocophérols (21).

5.3. Utilisation de la vitamine E en traitement topique

La vitamine E présente dans les produits cosmétiques possède à côté de son activité antioxydante l'activité biologique de la vitamine E. On sait que l'échelle d'activité biologique, mesurée sur l'animal carencé, ne se confond pas avec le pouvoir antioxydant des tocophérols, bien que le mécanisme d'action soit essentiellement le même (8).

L'habitude a été prise de considérer une échelle d'activité vitaminique des tocophérols où le produit de référence est l'acétate de (dl)- α -tocophérol (1 mg = 1 UI vitamine E), le (dl)- α -tocophérol ayant une bioéquivalence de 1,1, et le RRR- α -tocophérol (naturel) une bioéquivalence de 1,49. Selon cette même échelle, le β -tocophérol n'aurait que 40 % et le γ -tocophérol 10 % de cette activité. L'acétate de tocophérol après son passage à travers le stratum corneum est hydrolysé en tocophérol, ainsi que cela a été démontré en utilisant des produits marqués (21).

Il existe un grand nombre d'études cliniques décrivant l'usage de la vitamine E en traitement topique. Ces travaux ont été répertoriés par K. Furuse en 1987 (21), et les chercheurs du groupe Henkel ont présenté leurs recherches dans le cadre d'un congrès portant sur la vitamine E et son utilisation topique (22) (23). On attribue les effets de la vitamine E à deux types de mécanismes, son rôle antioxydant, parfaitement documenté, et sa capacité à stabiliser les membranes biologiques, insertion entre les molécules de phospholipides. La signification biologique de cette dernière propriété nous paraît moins bien établie. Les applications de la vitamine E en topique sont les suivantes (21).

5.3.1. Augmentation du flux sanguin capillaire au niveau de la peau

Cet effet est mesuré par l'augmentation de la température locale après application dix jours de suite d'une crème à 2 % d' α -tocophérol. Il ne serait pas dû à un effet vasodilatateur direct, ou relaxant de la paroi vasculaire, tel qu'on l'obtient, par exemple avec le dérivé nicotinique de la vitamine E.

5.3.2. Effet anti-inflammatoire

Il a été mis en évidence chez le lapin par la prévention des lésions dues à une application externe d'huile de croton. En l'absence d'essais biologiques plus classiques, les hypothèses formulées concernent la stabilisation de la membrane des mastocytes évitant la libération d'histamine et d'autres médiateurs de l'inflammation, et l'inhibition de l'activité de la phospholipase A2.

5.3.3. Effet sur la pousse des cheveux et prévention de leur décoloration par le soleil

L'effet sur la pousse des cheveux est attribué à l'amélioration de la circulation locale, effet exalté par l'utilisation du dérivé nicotinique. L'effet protecteur au soleil est attribué à l'action retardatrice de la vitamine E sur la peroxydation des pigments mélaniques. Un essai sur diverses formes d'alopécie semble avoir montré un effet positif au Japon.

5.3.4. Prévention des effets délétères des rayons ultraviolets

L'une des explications des effets de l'irradiation est la fragilisation des lysosomes, sur laquelle pourrait intervenir la vitamine E. L'autre est en relation avec la peroxydation des lipides, par l'action de l'oxygène singulet. Quoi qu'il en soit, le traitement préventif chez la souris par une crème à 0,5 % d'acétate d' α -tocophérol éviterait les effets d'une irradiation ultraviolette (à 254 nm), en plus de son action anti-inflammatoire. Des activités comparables ont été trouvées sur des modèles utilisant le lapin, et une étude récente chez la souris « hairless » (25) montre que les homologues de l' α -tocophérol sont légèrement moins actifs, avec une courbe dose-réponse non linéaire.

5.3.5. Autres effets

En clinique humaine, des émulsions à 20 mg de (dl) α -tocophérol et 5 000 UI de vitamine A par gramme ont été administrées avec un certain succès dans des affections de la peau.

Les odeurs de transpiration axillaire seraient combattues avec succès par une solution hydroalcoolique à 3 % de tocophérol, qui empêche l'oxydation des sécrétions.

L'acné serait mieux contrôlée sans effets secondaires par une combinaison de vitamines A (5 000 UI) et E (400 UI) que par l'acide rétinoïque.

Enfin, la vitamine E trouverait de nombreuses applications en périodontie de fait de son action anti-inflammatoire.

En conclusion, les nombreux effets thérapeutiques non démontrés de la vitamine E en topique mériteraient des études plus complètes et contrôlées, faute de quoi la thérapie par la vitamine E resterait controversée. Cependant, la bonne tolérance locale, et l'innocuité de la vitamine E font que le précepte du « primum non nocere » est respecté.

6. Rôle de l'analyse dans le domaine des antioxydants

L'ajout d'antioxydants dans les produits cosmétiques doit pouvoir être contrôlé, même en l'absence de réglementation stricte. En conséquence, l'analyste doit être en mesure de donner l'identité de l'antioxydant utilisé et sa teneur dans le produit. Compte tenu de la diversité des antioxydants, de la complexité des matrices organiques dans lesquelles ils sont incorporés, leur dosage n'est pas toujours aisé.

La phase grasse qui constitue bien souvent la partie la plus importante des émulsions cosmétiques contient, en général, tous les additifs liposolubles et notamment les antioxydants. Il est donc, dans la plupart des cas, nécessaire d'isoler cette phase grasse. Ceci peut être réalisé après rupture de l'émulsion qui peut se faire soit par hydrolyse acide puis extraction liquide-liquide au moyen d'hexane soit en milieu solvant par extraction avec un solvant apolaire de la solution obtenue par agitation de l'émulsion cosmétique en milieu hydroalcoolique.

Cette séparation de la phase grasse est une manipulation délicate car la présence d'émulsifiants perturbe, bien souvent, l'extraction. Quel que soit le type d'extraction utilisée, la solution hexanique contenant la phase grasse doit être séchée et l'hexane est évaporé précautionneusement. Pour l'examen des antioxydants, la technique de rupture de l'émulsion en milieu solvant est préférable, car les risques de dégradation des substances thermolabiles sont minimisés.

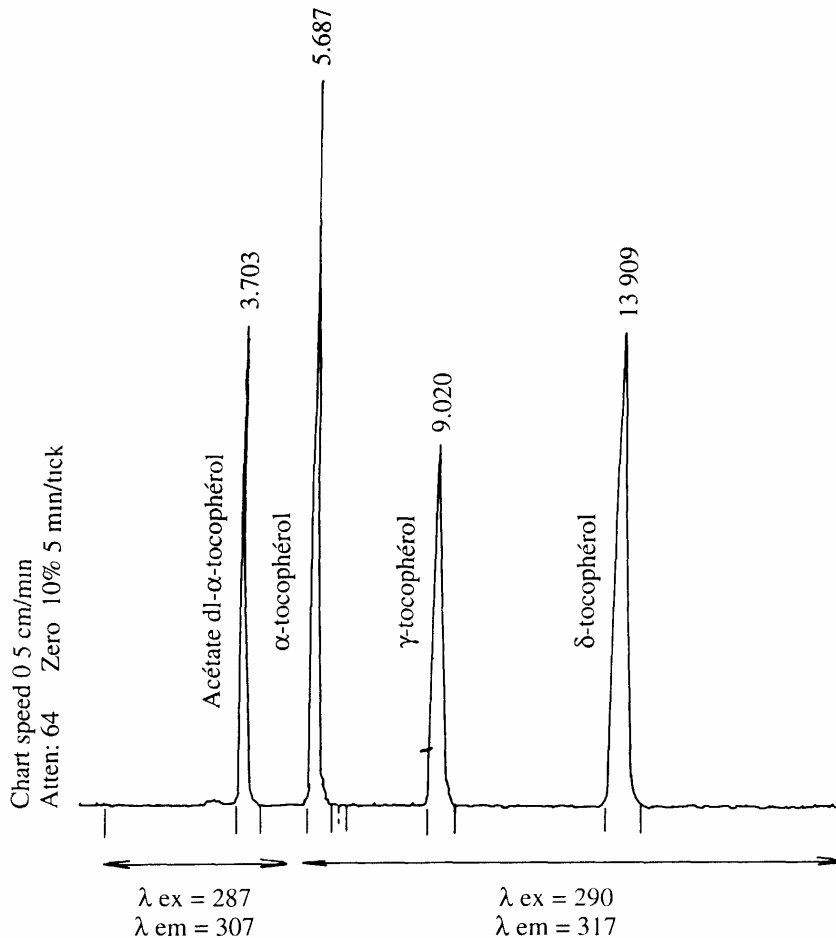


Figure 6 ■ Séparation des tocophérols par CLHP avec détection fluorimétrique
 Colonne lichrosorb Si 60 – L = 250 mm – d_c = 4,6 mm – d_p = 5 μm Phase mobile hexane-isopropanol
 99,5:0,5 (v/v) – 1 ml/min

6.1. Dosage des tocophérols

Pour le dosage des tocophérols, la chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP) est préférée à la chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour les raisons déjà évoquées, à savoir, la sensibilité des antioxydants à la température.

La méthode est normalisée au niveau de l'AFNOR (T 60-doc 324) et de l'IUPAC (méthode 2.432) (26). Le principe repose sur une chromatographie d'adsorption sur colonne de silice microparticulaire des différents tocophérols. La phase mobile utilisée est un mélange constitué d'hexane et disopropanol dans les proportions 99,5:0,5 (v/v). Le système de détection recommandé est la fluorimétrie en raison de sa très grande spécificité qui autorise l'injection directe des huiles ou des extraits liquides. Les longueurs d'onde optimales à l'excitation et à l'émission sont 290/320 nm. L'acétate d'α-tocophérol qui est plus stable que la forme libre est, quant à lui, détecté au couple de longueurs d'onde 287/307 nm. La figure 6 présente un chromatogramme de tocophérols (figure 6).

L'injection de solutions standard de tocophérols dont la concentration est parfaitement connue, permet l'analyse quantitative.

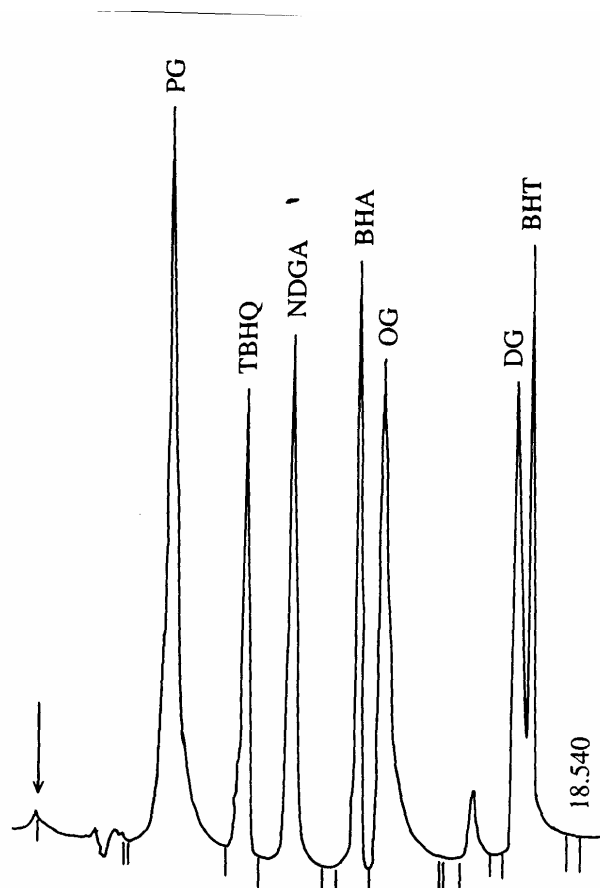


Figure 7 ■ Séparation des antioxydants synthétiques par CLHP.

Colonne : hichrom RP 18 – L = 205 mm – $d_c = 4,6$ mm – $d_p = 10$ μ m. Phase mobile : solvant A : eau 5 % d'acide acétique, solvant B : acétonitrile à 5 % d'acide acétique/gradient : de 70 % de A à 100 % de B en 16 minutes – débit 1,5 ml/min, détection UV à 280 nm.

6.2. Dosage des antioxydants de synthèse

Comme pour les antioxydants naturels, l'analyse des produits de synthèse est presque toujours réalisée par CLHP car cette technique n'est pas altérante et ne nécessite qu'une extraction sommaire du produit à doser même dans le cas de substrats complexes. Les méthodes de dosage sont plus ou moins complexes selon que les antioxydants sont seuls ou en mélange.

Une méthode générale (27) permet l'identification et le dosage des antioxydants les plus utilisés : gallate de propyle (PG), 2,4,5-trihydroxybutyrophénone (THBP), tert-butylhydroquinone (TBHQ), acide nordihydrogualarétique (NDGA), 2 et 3-tert-butyl 4-hydroxyanisole (BHA), 2,6 di-tert-butyl 4- hydroxyméthylphénol (Ionox 100), 3,5-di-tert-butyl 4-hydroxytoluène (BHT), gallate d'octyle (OG) et gallate de dodécyle (DG). Un certain nombre de ces produits ne sont autorisés ni en France, ni en Europe (par exemple, le TBHQ n'est autorisé qu'aux Etats-Unis).

Après rupture de l'émulsion en milieu solvant, ces antioxydants sont extraits à plusieurs reprises de la phase hexanique par de l'acétonitrile. Après évaporation du solvant et reprise de l'extrait dans un mélange isopropanol/acétonitrile, les constituants sont séparés par chromatographie à polarité de phases inversée sur silice greffée octadécyle. Un gradient de solvants variant de 70 % d'eau dans l'acétonitrile jusqu'à l'acétonitrile pur est nécessaire. La détection est réalisée en lumière ultraviolette à 280 nm. L'injection de solutions standard de concentrations connues permet leur dosage. La figure 7 présente un chromatogramme des principaux antioxydants de synthèse.

6.3.3 Mesure de l'état d'oxydation et du pouvoir antioxydant

Il est relativement difficile de comparer l'activité des antioxydants entre eux, ce qui permettrait de les classer selon une échelle unique.

En pratique, leur utilisation est bien souvent empirique, et l'on se base sur les indices chimiques permettant d'apprécier l'état d'oxydation d'un corps gras. Ce sont :

- surtout l'indice de peroxyde IP ;
- d'autres indices, indice de p-anisidine, permettant d'apprécier les aldéhydes α -éthyléniques, le test à l'acide thiobarbiturique qui mesure le dialdéhyde inalonique, l'indice de carbonyle, l'indice d'oxygène oxirane, etc. ;
- l'analyse des produits volatils en chromatographie en phase gazeuse, par la technique de l'espace de tête dynamique, et en particulier le dosage du pentane qui paraît être un bon traceur ;
- la tenue au Rancimat, appareil commercialisé depuis quelques années, et qui réalise un test d'oxydabilité accélérée est très utile pour apprécier l'effet de l'addition d'un antioxydant.

Pour mesurer l'activité antioxydante proprement dite, telle que celle d'un extrait naturel, on dispose d'une méthode décrite par Pratt (28), et basée sur l'autoxydation du (3-carotène par l'acide linoléique oxydé par l'air *in situ*. On mesure au spectrophotomètre la diminution de la densité optique à 470 nm en présence ou non de l'antioxydant à doser.

7. Aspects réglementaires

La réglementation française et européenne concerne les matières premières et additifs utilisés en cosmétique. Elle est régie en France par plusieurs arrêtés qui fixent une liste positive des substances pouvant entrer dans la composition des produits cosmétiques et d'hygiène corporelle, des colorants et des agents conservateurs, bactéricides et fongicides. Le dernier texte paru est l'arrêté du 14 novembre 1988. Au niveau européen, le texte fondamental est la directive du Conseil n° 76/768/CEE du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des législations des pays membres relatifs aux produits cosmétiques. Ce texte distingue clairement les produits cosmétiques des produits pharmaceutiques, et définit des listes positives et négatives. Les substances autorisées peuvent comprendre les antioxydants, les teintures capillaires, les agents conservateurs et les filtres ultraviolets. Cependant, la classe des antioxydants n'est nulle part représentée dans les annexes à ce texte.

On peut donc dire qu'à ce jour, aucun texte ne mentionne ni ne réglemente l'utilisation des antioxydants. Dans le cadre des réflexions engagées actuellement sur la législation cosmétique en France et au niveau communautaire, la probabilité est grande de voir apparaître une réglementation restreignant l'emploi des BHA et BHT en cosmétique, alors que les gallates et les tocophérols ne seraient pas concernés. Un projet d'amendement à la directive 76/768/CEE (29) prévoit la création d'un inventaire de tous les composants utilisés dans les produits cosmétiques, qui comprendrait des indications sur leur sécurité d'emploi. La Commission se réserverait la possibilité de demander des compléments d'études toxicologiques. Depuis le 1^{er} janvier 1993, toute substance ajoutée à cette liste est « nouvelle ».

Des listes positives existent déjà dans certains pays. Ainsi, au Japon, il existe une liste positive de substances autorisées en cosmétique, qui comprend le BHA à la dose de 0,2 % (*Japanese standards of cosmetic ingredients*, JSCI).

Il nous semble que l'on peut toutefois se baser sur la réglementation bien établie qui concerne les antioxydants en alimentation, ou dans les substances au contact des produits alimentaires (matières plastiques par exemple), puisque l'absorption par voie topique est en principe moins efficace que par voie orale, du moins sur peau saine, et les quantités absorbées bien inférieures.

Bibliographie

1. Radicaux libres. Incidences nutritionnelles et physiopathologiques. Conférences présentées à la réunion de la Société de nutrition et diététique de langue française à Bordeaux les 26 et 27 septembre 1986. Cahiers de Nutrition et de Diététique, février 1987, 22, n° 1, pp. 12- 81.
2. Crastes de Paulet (A.). Les lipides membranaires : une cible privilégiée pour les radicaux libres, *ibid.*, pp. 23-33.
3. Morelle (J.). Peroxydes lipidiques, radicaux libres, vieillissement et lipoaminés acides 1^{re} partie, Parfums, Cosmétiques, Arômes, 1988, n°79, pp. 71-78. 2^e partie *ibid.*, 1988, n° 80, pp. 91-104.
4. Nguyen (Q.L.) et al. Évaluation de l'oxydation aldéhydique dans les cosmétiques, in : Les corps gras végétaux et animaux en cosmétologie. Actes du Symposium de Bordeaux, 16-18 mai 1984, AFECG-SFC, Paris, 1984, p. 353.
5. Helme (J.P.). Lipides et cosmétologie. Rev. Fr. Corps Gras, 1990, 37, pp. 379-388.
6. Pokorny (J.). Major Factors Affecting the Autoxydation of Lipids. In: Autoxydation of unsaturated lipids, W.S. Chan, éd. Académie Press, London, 1987, p. 192.
7. Bourgeois (CF.) et al. Les antioxygènes dérivés de vitamines en cosmétologie. In : Les corps gras végétaux et animaux en cosmétologie. Actes du Symposium de Bordeaux, 16-18 mai 1984, AFECG-SFC, Paris, 1984, p. 317.
8. Chazan (J.B.) et Szulc (M.). Radicaux libres et vitamine E. Cahiers de Nutrition et de Diététique, février 1987, 22, n° 1, pp. 66-76.
9. Cillard (J.), Cillard (P.) et Cormier (M.). Effect of Experimental Factors on the Prooxidant Behavior of α -Tocopherol. J. Am. OU. Chem. Soc, 1980, 57, 255-261.
10. Bourgeois (J.F.). Propriétés antioxygènes des tocophérols et du palmitate d'ascorbyle dans les matières grasses. Rev. Fr. Corps Gras, 1981, 28, n° 9, 353-356.
11. Farag (R.S.), Badei (A.Z.M.A.) et Elbaroty (G.S.A.). Antioxidant Activity of Some Spice Essential Oils on Linoleic Acid Oxidation in Aqueous Media. J. Am. OU. Chem. Soc, 1989, 66, 792.
12. Chevolleau (S.). Étude de l'activité antioxydante des plantes : importance de α -tocophérol. Thèse de doctorat en Sciences de l'Université de Droit et d'Économie et des Sciences d'Aix Marseille III, novembre 1990.
13. Johnson (D.R.) et Gu (L.C.). In: Autoxydation and Antioxydants, John Wiley, New York, 1988, pp. 433-448.
14. Kaufmann (P.J.) et Rappaport (M.J.). Skin Care Products In: Cosmetic Safety, éd. J.A. Whitham, 1987, pp. 179-204.
15. Wepierre (J.). Facteurs physiques et physiologiques intervenant dans l'absorption percutanée des médicaments. Actualités pharmaceutiques, 3^e série, éd. Masson, Paris, 1979, pp. 169-202.
16. Schaefer (H.) et al. Skin permeability, chap. V, Pharmacy of topical drugs. In: Stiittgen, Spier et Schwarz, Normal Pathologische Physiologie des Haut, SpingerVerlag, 1981.
17. Marty (J.P.), Wepierre (J.) et al. Biopharm, Pharmacokined. Europ, Comp. 2nd, 1984, 1, 272-278.
18. Pascal (G.). Additifs antioxygènes. In : additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires, J.-L. Multon, Lavoisier - Tec. & Doc. - Apria, Paris, 1984, pp. 161-185.
19. Meyler's Side Effects of Drugs. M.N.G. Dukes, 1^{er} éd., Elsevier, 1988.
20. Adverse Reactions to Drug Formulation Agents. A Handbook of excipients, Murray Weiner et I. Léonard Bernstein, éd. Marcel Dekker, New York and Basel, 1980, pp. 181-183 et 312-314.
21. Furuse (K.). Vitamine E : Biological and Chemical Aspects of Topical Treatment, Cosmetic & Toiletries, 1987, 102, n° 11, pp. 99-116.
22. Möller (H.) et al. Topical Application of Vitamine E and its Effects on the Skin. Fett, Wass. Tech., 1989, 91, n° 8, pp. 295-304.
23. Kästner (W.). Safety of Vitamine E Use In: Externa, *ibid.*, 305-313.
24. Förster (Th.) et al. The Protection of Hair Against Weathering with Vitamine E. *Ibid.*, 313-316.
25. Potokar (M.) et al. Effectiveness of Vitamin E Protecting against UV Light. Comparative Testing of the Natural Tocopherols on the Skin of the Hairless Mouse. Fett Wiss. Tech., 1990, 92, n° 10, 406-410.
26. Pocklington (W.D.) et Dieffenbacher (A.). Determination of Tocopherols and Tocotrienol In: Vegetable Oils and Fats by HPLC. Pure and Applied Chemistry, 1988, 60, n° 6, 877-892.
27. Page (B.D.). J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1983, 62, 727.
28. Taga (M.S.), Miller (E.E.) et Pratt (D.E.). Chia Seeds as a Source of Natural Lipid Antioxidants. J. Amer. OU. Chem. Soc, 1984, 61, 928- 931.
29. Draft 6th Amendment to the EEC. Cosmetic Directive, Seifen Ole Fette Wachsen, 1990, 116, n° 14, p. 531-533

Understanding free radicals and antioxidants

Extracted from: NutraCos January/February 2004 Antioxydants directory, page 68

What are free radicals? Why are they damaging to the human body? And how do vitamin E and the other antioxidant nutrients help protect the body against free radical damage? We'll attempt to answer these questions and help you understand why **eating** 5-8 servings per day of antioxidant rich fruits and vegetables can benefit your health. But first, a little background.

A BRIEF LOOK AT CHEMICAL BONDING

To understand the way that free radicals and antioxidant interact, you must first understand a bit about cells and molecules. So here's a (very) brief refresher course. The human body is composed of many different types of cells. Cells are composed of many different types of molecules. Molecules consist of one or more atoms of one or more elements joined by chemical bonds.

As you probably remember from your old high school days, atoms consist of a nucleus, neutrons, protons and electrons. The number of protons (positively charged particles) in the atom's nucleus determines the number of electrons (negatively charged particles) surrounding the atom. Electrons are involved in chemical reactions and are the substance that bonds atoms together to form molecules. Electrons surround, or "orbit" an atom in one or more shells. The innermost shell is full when it has two electrons. When the first shell is full, electrons begin to fill the second shell. When the second shell has eight electrons, it is full, and so on.

The most important structural feature of an atom for determining its chemical behavior is the number of electrons in its outer shell. A substance that has a full outer shell tends not to enter in chemical reactions (an inert substance). Because atoms seek to reach a state of maximum stability, an atom will try to fill its outer shell by:

- Gaining or losing electrons to either fill or empty its outer shell;
 - Sharing its electrons by bonding together with other atoms in order to complete its outer shell.
- Atoms often complete their outer shells by sharing electrons with other atoms. By sharing electrons, the atoms are bound together and satisfy the conditions of maximum stability for the molecule.

HOW FREE RADICALS ARE FORMED

Normally, bonds don't split in a way that leaves a molecule with an odd, unpaired electron. But when weak bonds split, free radicals are formed. Free radicals are very unstable and react quickly with other compounds, trying to capture the needed electron to gain stability. Generally, free radicals attack the nearest stable molecule, "stealing" its electron. When the "attacked" molecule loses its electron, it becomes -a free radical itself, beginning a chain reaction. Once the process is started, it can cascade, finally resulting in the disruption of a living cell.

Some free radicals arise normally during metabolism. Sometimes the body's immune system's cells purposefully create them to neutralize viruses and bacteria. However, environmental factors such as pollution, radiation, cigarette smoke and herbicides can also spawn free radicals. Normally, the body can handle free radicals, but if antioxidants are unavailable, or if the free-radical production becomes excessive, damage can occur. Of particular importance is that ***free radical damage accumulates with age.***

HOW ANTIOXIDANTS MAY PREVENT AGAINST FREE RADICAL DAMAGE

The vitamins C and E are thought to protect the body against the destructive effects of free radicals. Antioxidants neutralize free radicals by donating one of their own electrons, ending the electron-"stealing" reaction. The antioxidant nutrients themselves don't become free radicals by donating an

electron because they are stable in either form. They act as scavengers, helping to prevent cell and tissue damage that could lead to cellular damage and disease.

Vitamin E

The most abundant fat-soluble antioxidant in the body. One of the most efficient chain-breaking antioxidants available. Primary defender against oxidation. Primary defender against lipid peroxidation (creation of unstable molecules containing more oxygen than is usual).

Vitamin C

The most abundant water-soluble antioxidant in the body. Acts primarily in cellular fluid. Of particular note in combating free radical formation caused by pollution and cigarette smoke. Also helps return vitamin E to its active form.

THE ANTIOXIDANTS AND DISEASE PREVENTION

Heart Disease

Vitamin E may protect against cardiovascular disease by defending against LDL oxidation and artery-clogging plaque formation.

Cancer

Many studies have correlated high vitamin C intakes with low rates of cancer, particularly cancers of the mouth, larynx and esophagus.

THE LESSON: EAT YOUR FRUITS AND VEGETABLES

The antioxidants are believed to help protect the body from free-radical damage. But before you go out and stock your pantry with mega-doses of these vitamins, be warned: more is not always better. The long-term effect of large doses of these nutrients has not been proven. Other chemicals and substances found in natural sources of antioxidants may also be responsible for the beneficial effects. So for now, the best way to ensure adequate intake of the antioxidant nutrients is through a balanced diet consisting of 5-8 servings of fruits and vegetables per day.

Article tiré de :

Arômes Ingrédients Additifs No 51 – Avril/Mai 2004-08-26, page 12 Actualité

Polyphenols extraits de co-produits végétaux

- Scalime, entreprise spécialisée à l'origine dans le transfert international de technologie 4^e gamme (salades et légumes en sachets prêts à consommer), a développé et breveté en partenariat avec l'INRA et avec le soutien financier de PANVAR Rhône-Alpes, la technologie ScanOLine™. Ce procédé innovant consiste à extraire et purifier des polyphenols à partir d'écarts de tri de végétaux frais, permettant ainsi une valorisation nutritionnelle de ces déchets. Aujourd'hui appliqué sur les déchets de salade et d'oignon, il sera à terme applicable aux brocoli, artichaut, tomate, carotte... Les extraits de salade et d'oignon ont une teneur en polyphenols supérieure à 50 % et 40 % respectivement (acide hydroxycinnamique et flavonols pour la salade, quercétine sous forme glycosylée pour l'oignon). L'entreprise cible les ingrédients alimentaires, la nutraceutique et la cosmétique.