



Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Chemii

Pracownia Chemii Stosowanej

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Alicja Śliwowska

***Badanie właściwości fizykochemicznych i aplikacyjnych formułacji
kosmetycznych zawierających jasmonidy wraz z oceną kinetyki
ich przenikania przez bariery imitujące skórę***

***Evaluation of physicochemical and application properties of cosmetic formulations
containing jasmonates together with assessment of kinetics of their diffusion through skin
imitating barriers***

Promotor naukowy: prof. dr hab. Izabela Nowak

Promotor pomocniczy: dr Anna Olejnik

Poznań 2017

Pragnę serdecznie podziękować mojej promotor prof. dr hab. Izabeli Nowak

Za poświęcony mi czas, cenne rady, zaangażowanie, wsparcie
i merytoryczną pomoc w ciągu pięciu lat współpracy.

*Pani Profesor, dziękuję za to, że mimo tak wielu zajęć i obowiązków zawsze znalazła Pani czas, by
służyć mi dobrą radą i pomocą.*

Pragnę serdecznie podziękować mojej promotor pomocniczej dr Annie Olejnik
Za cierpliwość, życzliwość, poświęcony czas, nieocenioną pomoc i wsparcie.
*Aniu, dziękuję za wszystko! Słowa nie są w stanie oddać mojej wdzięczności
za Twój wkład w mój rozwój naukowy.*

Pragnę serdecznie podziękować moim najbliższym – Mamie i Mężowi
*Dziękuję za to, że każdego dnia jesteście dla mnie ogromnym wsparciem.
Dziękuję za cierpliwość, miłość i dobre słowo.*

To Wam pragnę zadedykować swoją Pracę Doktorską

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów oraz symboli stosowanych w pracy.....	13
Wstęp.....	17
Przegląd literatury.....	18
1. Budowa, właściwości i funkcje skóry.....	18
1.1. Anatomia skóry.....	18
2. Penetracja substancji aktywnych przez skórę.....	21
2.1. Czynniki determinujące penetrację substancji aktywnych przez skórę.....	21
2.2. Drogi transportu substancji aktywnych przez skórę.....	22
3. Proces starzenia się skóry.....	24
3.1. Klasyfikacja rodzajów starzenia się skóry.....	24
3.1.1. Starzenie mimiczne.....	24
3.1.2. Starzenie rodnikowe.....	24
3.1.3. Starzenie zewnętrzne.....	25
3.1.4. Starzenie wewnętrzne.....	25
3.2. Obraz kliniczny starzejącej się skóry.....	27
3.3. Obraz histologiczny starzejącej się skóry.....	27
4. Emulsje kosmetyczne.....	29
4.1. Definicja i klasyfikacja emulsji.....	29
4.2. Rodzaje i przyczyny niestabilności emulsji.....	30
4.3. Metody stabilizacji emulsji.....	33
4.4. Organoleptyczna ocena stabilności emulsji kosmetycznych.....	33
5. Badanie właściwości fizykochemicznych formułacji kosmetycznych.....	35
5.1. Określanie typu emulsji.....	35
5.2. Badanie wartości pH.....	35
5.3. Badanie lepkości.....	36
5.4. Badanie stabilności emulsji.....	36
5.4.1. Testy wirówkowe.....	36
5.4.2. Badanie stabilności z wykorzystaniem komór klimatycznych.....	36
5.4.3. Badanie stabilności z wykorzystaniem metody wielokrotnego rozpraszania światła.....	37
5.5. Badanie rozkładu wielkości cząstek formułacji z wykorzystaniem techniki dyfrakcji laserowej.....	38
5.6. Badanie stabilności termicznej z wykorzystaniem analizy termogravimetrycznej.....	39
6. Substancje aktywne stosowane w kosmetyce.....	40
7. Charakterystyka fizykochemiczna substancji aktywnych stosowanych w kosmetyce.....	41
7.1. Analiza struktury związku z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni.....	41
7.2. Potwierdzenie teoretycznej masy cząsteczkowej związku za pomocą spektrometrii mas ESI-MS.....	41
7.3. Potwierdzenie teoretycznej struktury związku za pomocą spektroskopii NMR.....	42
7.4. Badanie zdolności antyoksydacyjnej związku przy użyciu syntetycznego rodnika DPPH•.....	42
7.5. Badanie kompatybilności komponentów formułacji z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej.....	43
7.6. Oznaczanie substancji aktywnych w preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.....	43
7.7. Teoretyczne oszacowanie bezpieczeństwa aplikacyjnego substancji aktywnej.....	44
8. Badanie przenikania substancji aktywnych przez bariery imitujące skórę <i>in vitro</i>	45
8.1. Aparatury wykorzystywane do badania uwalniania substancji aktywnych <i>in vitro</i>	45
8.1.1. Membrany imitujące bariery skórne.....	47
8.1.2. Mechanizm przenikania substancji aktywnej przez naturalne oraz syntetyczne membrany.....	49
8.1.3. Czynniki wpływające na przenikanie substancji aktywnej przez membrany.....	50
8.1.4. Płyn akceptorowy.....	50
8.2. Modele kinetyczne uwalniania substancji aktywnych <i>in vitro</i>	50
9. Ocena działania kosmetyków za pomocą testów aplikacyjnych.....	53
9.1. Testy biodostępności.....	53
9.2. Testy aplikacyjne <i>in vivo</i>	53
10. Fitohormony.....	55

10.1. Definicja i klasyfikacja fitohormonów	55
10.2. Interakcje fitohormonów	55
11. Jasmonidy	58
11.2. Biosynteza kwasu jasmonowego	59
11.3. Formy występowania kwasu jasmonowego w tkankach roślinnych	59
11.4. Wykorzystanie jasmonidów w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym	60
11.5. Badania toksykologiczne jasmonidów	62
12. Peptydy	64
12.1. Peptydy rozkurczające	64
12.2. Peptydy transportujące	64
12.3. Peptydy sygnałowe	64
13. Koniugaty	65
Cel pracy	66
Metodyka pracy	67
14. Jasmonidy wykorzystane do badań	67
15. Synteza oraz charakterystyka fizykochemiczna badanych pochodnych kwasu jasmonowego	67
15.1. Synteza koniugatów kwasu jasmonowego oraz wybranych tetrapeptydów	67
15.2. Oczyszczanie otrzymanych koniugatów	69
15.1. Spektrometria mas ESI-MS	70
15.2. Spektroskopia FTIR	70
15.3. Spektroskopia NMR	70
15.4. Badanie zdolności antyoksydacyjnej kwasu jasmonowego i jego pochodnych z użyciem syntetycznego rodnika DPPH*	71
16. Preparatyka formułacji kosmetycznych zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne	71
16.1. Preparatyka Emulsji 1	72
16.2. Preparatyka Emulsji 2 (typu w/o)	72
16.3. Preparatyka Emulsji 3 (typu o/w)	72
16.4. Preparatyka żelu PAA	72
16.5. Preparatyka żelu HEC	73
17. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych formułacji	73
17.1. Ocena organoleptyczna	73
17.2. Określanie typu emulsji metodą mikroskopii optycznej	74
17.3. Badanie wartości pH otrzymanych formułacji	74
17.4. Badanie lepkości otrzymanych formułacji	74
17.5. Badanie rozkładu wielkości cząstek formułacji z wykorzystaniem techniki dyfrakcji laserowej	75
17.6. Badanie stabilności emulsji z wykorzystaniem metody wielokrotnego rozpraszania światła	76
17.7. Badanie wpływu dodatku jasmonidów na stabilność termiczną formułacji z wykorzystaniem analizy termograwimetrycznej	77
17.8. Badanie kompatybilności koniugatów i przygotowanych formułacji z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej	77
17.9. Oznaczanie kwasu jasmonowego i jego pochodnych w preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej	78
17.9.1. Dobór warunków analizy HPLC	78
17.9.2. Sporządzenie krzywych kalibracyjnych	79
17.9.3. Przygotowanie próbek do analizy HPLC	79
17.9.4. Walidacja metody analitycznej	79
17.9.5. Obliczenie zawartości jasmonidów w analizowanych próbkach	80
17.10. Badanie kinetyki uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych z przygotowanych formułacji kosmetycznych	80
17.10.1. Dobór membrany dializacyjnej	80
17.10.2. Preparatyka płynu akceptorowego	80
17.10.3. Przygotowanie próbek do badań	80
17.10.4. Budowa i przygotowanie aparatury do badania kinetyki uwalniania substancji aktywnych	81
17.10.5. Dopasowanie modelu kinetycznego do profilu uwalniania substancji aktywnych	82

17.11. Badania <i>in vivo</i> efektywności działania przygotowanych formułacji zawierających pochodne kwasu jasmonowego.....	83
Wyniki badań i dyskusja.....	85
18. Badanie struktury otrzymanych pochodnych kwasu jasmonowego	85
18.1. Spektrometria mas ESI-MS	85
18.2. Spektroskopia FTIR	86
18.3. Spektroskopia NMR.....	87
19. Badanie zdolności antyoksydacyjnej kwasu jasmonowego i jego pochodnych z użyciem syntetycznego rodnika DPPH*	90
20. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych formułacji	92
20.1. Ocena organoleptyczna	92
20.2. Określanie typu emulsji metodą mikroskopii optycznej.....	93
20.3. Badanie lepkości oraz wartości pH otrzymanych formułacji.....	94
20.4. Badanie kompatybilności pochodnych kwasu jasmonowego i przygotowanych formułacji z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej	95
20.5. Badanie rozkładu wielkości cząstek formułacji z wykorzystaniem techniki dyfrakcji laserowej.....	99
20.6. Badanie stabilności emulsji z wykorzystaniem metody wielokrotnego rozpraszania światła	105
20.7. Badanie wpływu dodatku kwasu jasmonowego i jego pochodnych na stabilność termiczną formułacji z wykorzystaniem analizy termograwimetrycznej	113
20.8. Oznaczanie kwasu jasmonowego i jego pochodnych w preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej	117
20.8.1. Wyznaczanie czasów retencji badanych związków	117
20.8.2. Sporządzenie krzywych kalibracyjnych oraz walidacja metody	118
20.8.3. Ocena potencjalnego wpływu podłoża kosmetycznego na wyniki analizy	119
20.8.4. Oznaczanie jakościowe oraz ilościowe kwasu jasmonowego i jego pochodnych w preparatach kosmetycznych	119
20.9. Badanie przenikania substancji aktywnych przez bariery imitujące skórę <i>in vitro</i>	122
20.9.1. Wpływ lepkości na ilość uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych z przygotowanych formułacji	125
20.9.2. Wpływ lepkości na współczynnik dyfuzji kwasu jasmonowego i jego pochodnych z przygotowanych formułacji	125
20.9.3. Wpływ lipofilowości cząsteczki kwasu jasmonowego i jego pochodnych na ilość ich uwalniania z przygotowanych formułacji.....	128
20.9.4. Wpływ grupy modyfikującej kwas jasmonowy na ilość jego uwalniania z przygotowanych formułacji	128
20.9.5. Dopasowanie modelu kinetycznego do profilu uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych z przygotowanych formułacji.....	129
20.10. Badanie <i>in vivo</i> efektywności działania przygotowanych formułacji zawierających pochodne kwasu jasmonowego.....	132
20.10.1. Porównywanie wyników w obrębie grupy.....	133
20.10.2. Wpływ żelu HEC (preparat placebo - grupa I) na nawilżenie, elastyczność oraz TEWL.....	134
20.10.3. Wpływ żelu HEC + JA-YPPF-NH ₂ (preparat 1 - grupa II) na nawilżenie, elastyczność oraz TEWL	135
20.10.4. Wpływ żelu HEC + JA-YYKS-NH ₂ (preparat 2 - grupa III) na nawilżenie, elastyczność oraz TEWL	136
20.10.5. Porównywanie wyników pomiędzy grupami.....	141
Podsumowanie i wnioski.....	145
Streszczenie	148
Summary	151
Spis publikacji oraz zgłoszeń patentowych.....	154
Spis załączników.....	158
Literatura.....	167

WYKAZ SKRÓTÓW ORAZ SYMBOLI STOSOWANYCH W PRACY

SKRÓT	ROZWIĘCIE SKRÓTU
% v/v	procent objętościowo-objętościowy
% w/w	procent wagowo-wagowy
13-HPOT	kwas hydroperoksyoktadekatrienowy (<i>ang.</i> hydroperoxyoctadecatrienoic acid), wodoronadtlenek lipidowy
A	absorbancja [j.u.]
AAT	testy przyspieszonego starzenia (<i>ang.</i> accelerated aging test)
AcYPPF	acetylowany tetrapeptyd L-Tyr-L-Pro-L-Phe-L-Phe
Alphaflow 20	uwodniony polideken
AM RAM	żywica polistyrenowa pełniąca rolę podłoża stałego w syntezie peptydów
AOC	cyklaza tlenu allenu (<i>ang.</i> allene-oxide cyclase)
AOS	syntaza tlenu allenu (<i>ang.</i> allene-oxide synthase)
A _p	absorbancja próbki [j.u.]
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (<i>ang.</i> adenosino-5'-triphosphorane)
A _w	absorbancja wzorca [j.u.]
BS	wsteczne rozpraszanie (<i>ang.</i> backscattering)
C	stężenie [mol/L]
CD ₃ OD	metanol-d4 (tetradeuterometanol, <i>ang.</i> deuterated methanol)
CDCl ₃	chloroform-d (deuteriochloroform, <i>ang.</i> deuterated chloroform)
CoA	acetylokoenzym A (<i>ang.</i> acetylcoenzyme A)
C _{okt}	stężenie badanej substancji w fazie oktanolowej [mol/L]
Creagel EZ7	polakrylamid, uwodniony polideken, eter laurylowy polioksyetylenu
CU	jednostka korneometru (<i>ang.</i> corneometer unit)
C _{wo}	stężenie badanej substancji w fazie wodnej [mol/L]
D	współczynnik dyfuzji substancji aktywnej [cm ² /s]
dC	zmiana stężenia dyfundującej substancji
DCM	dichlorometan (<i>ang.</i> dichloromethane)
DIC	<i>N,N</i> -Diizopropylkarbodiimid (<i>ang.</i> <i>N,N</i> '-Diisopropylcarbodiimide)
DIPEA	<i>N,N</i> -Diizopropylloetyloamina (<i>ang.</i> <i>N,N</i> -Diisopropylethylamine)
dM	zmiana masy [g]
DMAP	<i>N,N</i> -Dimetylołpirydyno-4-amina (<i>ang.</i> <i>N,N</i> -Dimethylpyridin-4-amine)
DMF	<i>N,N</i> -Dimetyloformamid (<i>ang.</i> <i>N,N</i> -Dimethylformamide)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (<i>ang.</i> deoxyribonucleic acid)
DPPH*	rodnik 1,1-difenyl-2-pikrylohydrazylu
DSC	skaningowa kalorymetria różnicowa (<i>ang.</i> differential scanning calorimetry)
dt	jednostka czasu, w której zachodzi proces [s]
D _w	rozcieńczenie wzorca
dx	jednostka odległości, na jaką zachodzi dyfuzja [cm]
ECB	Europejskie Biuro Chemiczne (<i>ang.</i> European Chemicals Bureau)
Emulsja o/w	emulsja typu olej w wodzie (<i>ang.</i> oil-in-water emulsion)
Emulsja w/o	emulsja typu woda w oleju (<i>ang.</i> water-in-oil emulsion)
Episkin™	model zrekonstruowanej skóry ludzkiej
ESI	jonizacja przez elektrorozpylanie (<i>ang.</i> electrospray ionization)
Fmoc	osłona fluorenylo-9-metoksykarbonylowa
GHK	tripeptyd Gly-His-Lys
HAT	metoda oceny aktywności antyoksydacyjnej związku, w której wykorzystuje się mechanizm reakcji oparty na transferze pojedynczego atomu wodoru pomiędzy reagentami (<i>ang.</i> hydrogen atom transfer)
HEC	hydroksyetyloceluloza (<i>ang.</i> hydroxyethylcellulose)
HLB	równowaga hydrofilowo-hydrofobowa (<i>ang.</i> hydrophilic-liphophilic balance)



HOBt	hydroksybenzotriazol (<i>ang.</i> hydroxybenzotriazole)
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa (<i>ang.</i> high-performance liquid chromatography)
Ile	izoleucyna (<i>ang.</i> isoleucine)
IVRT	badanie uwalniania (substancji) <i>in vitro</i> (<i>ang.</i> <i>in vitro</i> release test)
J	strumień dyfuzji cząstek [$\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{s}$]
JA	kwask jasmonowy (<i>ang.</i> jasmonic acid)
JA-YPPF-NH ₂	koniugat kwasu jasmonowego oraz tetrapeptydu YPPF (L-Tyr-L-Pro-L-Phe-L-Phe)
JA-YYKS-NH ₂	koniugat kwasu jasmonowego oraz tetrapeptydu YYKS (L-Tyr-L-Tyr-L-Lys-L-Ser)
K	stała szybkości uwalniania
K _H	stała Higuchiego
KK	komora klimatyczna
KVK	tripeptyd Lys-Val-Lys
l	grubość warstwy absorbującej [cm]
LD	dyfrakcja laserowa (<i>ang.</i> laser diffraction)
LD ₅₀	wartość dawki śmiertelnej powodującej zgon połowy badanych osobników (<i>ang.</i> lethal dose)
Leu	leucyna (<i>ang.</i> leucine)
LHA	kwask lipohydroksylowy (<i>ang.</i> lipohydroxy acid)
LOD	granica detekcji (<i>ang.</i> limit of detection)
log ₁₀	logarytm dziesiętny
LOQ	granica oznaczalności (<i>ang.</i> limit of quantification)
LOX	lipooksygenaza (<i>ang.</i> lipooxygenase)
LR2412	sól sodowa kwasu tetrahydrojasmonowego (nazwa handlowa)
Lys	lizyna (<i>ang.</i> lysine)
m/z	stosunek masy do ładunku elektrycznego
MCF-7	oznaczenie linii komórkowej nowotworu piersi
MDA-MB-435	oznaczenie linii komórkowej nowotworu piersi
MeDHJ	dihydrojasmonian metylu (<i>ang.</i> methyl dihydrojasmonate)
MeJ	jasmonian metylu (<i>ang.</i> methyl jasmonate)
MLS	wielokrotne rozpraszanie światła (<i>ang.</i> multiple light scattering)
m _p	masa substancji oznaczanej zawartej w próbce [mg],
MS	spektrometria mas (<i>ang.</i> mass spectrometry)
MTCC-443	oznaczenie szczepu bakterii <i>E.coli</i>
m _w	masa wzorca [mg],
MWCO	graniczna masa molowa (<i>ang.</i> molecular weight cut-off), parametr charakteryzujący selektywność membrany
n	wykładnik dyfuzyjny
NTP	naskórkowe testy płatkowe
OPC:6	kwask 3-okso-2-[2'(Z)-pentenył]-cyklopentano-1-kapronowy (<i>ang.</i> 3-oxo-2-[2'(Z)-pentenył]-cyclopentane-1-hexanoic acid)
OPC:8	kwask 3-okso-2-[2'(Z)-pentenył]-cyklopentano-1-kaprylowy (<i>ang.</i> 3-oxo-2-[2'(Z)-pentenył]-cyclopentane-1-octanoic acid)
OPDA	kwask cis-(+)-12-oksofitodienowy (<i>ang.</i> 12-oxophytodienoic acid)
OPR	reduktaza oksofitodienowa (<i>ang.</i> 12-oxophytodienoate reductase)
PAA	polimer kwasu akrylowego, karbomer (<i>ang.</i> polyacrylic acid)
Phe	fenyloalanina (<i>ang.</i> phenylalanine)
P _{okt-wo}	współczynnik podziału n-oktanol - woda
PP	promotory przenikania
Pro	prolina (<i>ang.</i> proline)
PSD	rozkład wielkości cząstek (<i>ang.</i> particle-size distribution)
P _w	czystość wzorca

Q ₀	początkowa ilość substancji czynnej
Q _t	ilość uwolnionej substancji aktywnej po czasie t
ROS	reaktywne formy tlenu (<i>ang.</i> reactive oxygen species)
RP-HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (<i>ang.</i> reversed phase - high performance liquid chromatography)
r-r	roztwór
S	jednostkowy przekrój bariery [cm ²]
SA	substancja aktywna
Ser	seryna (<i>ang.</i> serine)
SET	metoda oceny aktywności antyoksydacyjnej związku, w której wykorzystuje się mechanizm reakcji oparty na transferze pojedynczego elektronu pomiędzy reagentami (<i>ang.</i> single electron transfer)
Spektroskopia FTIR	spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (<i>ang.</i> Fourier transform infrared)
Spektroskopia MIR	spektroskopia wykorzystująca promieniowanie z zakresu średniej podczerwieni (4000 - 650 cm ⁻¹ , <i>ang.</i> mid-infrared)
Spektroskopia NIR	spektroskopia wykorzystująca promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni (10000 - 4000 cm ⁻¹ , <i>ang.</i> near-infrared)
Spektroskopia NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (<i>ang.</i> nuclear magnetic resonance)
T	transmisja (<i>ang.</i> transmission)
tBu	grupa <i>tert</i> -butylowa
TEWL	przezskórkowa (transepidermalna) utrata wody (<i>ang.</i> transepidermal water loss)
TFA	kwas trifluorooctowy (<i>ang.</i> trifluoroacetic acid)
TGA	analiza termogravimetryczna (<i>ang.</i> thermogravimetric analysis)
TIS	triizopropylosilan (<i>ang.</i> triisopropylsilane)
TSI	parametr sumujący wszystkie rodzaje niestabilności próbki badanej metodą MLS (<i>ang.</i> Turbiscan Stability Index) [-]
TTC	próg zagrożenia toksykologicznego (<i>ang.</i> threshold of toxicological concern)
Tweeny	polietoksylenowane estry sorbitanu
Tyr	tyrozyna (<i>ang.</i> tyrosine)
UVA	promieniowanie ultrafioletowe o długości fali 320-400 nm
UVB	promieniowanie ultrafioletowe o długości fali 280-320 nm
UVC	promieniowanie ultrafioletowe o długości fali 200-280 nm
UVR	promieniowanie ultrafioletowe (<i>ang.</i> ultraviolet radiation)
UV-Vis	promieniowanie w zakresie światła widzialnego oraz bliskim nadfiolecie o długości fali 200-1100 nm (<i>ang.</i> ultraviolet-visible)
Val	walina (<i>ang.</i> valine)
VDC	pionowa komora dyfuzyjna (<i>ang.</i> vertical diffusion cell)
VGAPG	heksapeptyd Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly
VOCs	organiczne związki lotne (<i>ang.</i> volatile organic compounds)
V _p	objętość medium [mL]
V _w	objętość roztworu wzorcowego [mL]
x	odległość, na jaką zachodzi dyfuzja [cm]
α-LA	kwas α-linolenowy (<i>ang.</i> α-linolenic acid)
δ ¹³ C	przesunięcie chemiczne sygnału na widmie węglowym NMR
δ ¹ H	przesunięcie chemiczne sygnału na widmie wodorowym NMR
ε	molowy współczynnik absorpcji [L/mol × cm]
λ	długość fali [nm]
λ _{max}	analityczna długość fali [nm]

WSTĘP

Skóra (*fac. cutis*) stanowi największy organ ludzkiego ciała, bowiem jej powierzchnia wynosi od 1,5 do 2 m². *Cutis* jest organem najbardziej narażonym na szkodliwe działanie czynników zewnętrznych, dlatego starzeje się szybciej w porównaniu z organami wewnętrznymi. Starzenie się całego organizmu człowieka to naturalny i nieodwracalny proces, który postępuje wraz z wiekiem. W związku z powyższym ważne jest, aby stosować pielęgnację skóry, mającą na celu spowolnienie tego procesu i redukcję jego widocznych oznak, takich jak zmarszczki, przebarwienia, spadek jej nawilżenia oraz elastyczności [1,2].

Pielęgnacja skóry jest związana nie tylko z prawidłową dietą, ale również stosowaniem odpowiednich preparatów kosmetycznych oraz dermatologicznych. Obowiązkiem producenta kosmetyków jest wprowadzenie na rynek produktu o przebadanej i udokumentowanej stabilności. Dynamiczny rozwój technologii umożliwia szybką identyfikację procesów destabilizacji badanego preparatu. Ponadto, każdy komercyjnie dostępny preparat powinien być przebadany pod kątem bezpieczeństwa oraz skuteczności działania [3,4]. W tym celu prowadzone są badania *in vitro* oraz *in vivo*, których wyniki mogą stanowić kluczowy etap oceny preparatu i decydować o możliwości jego dopuszczenia do obrotu na rynku kosmetycznym lub farmaceutycznym [5,6].

W celu nadania produktowi pielęgnacyjnemu pożądanego działania, do podłoża preparatu dodaje się substancje o ukierunkowanej aktywności kosmetycznej. Substancje te nazywane są składnikami aktywnymi kosmetyków i wykazują określone działanie fizyczne, chemiczne lub biochemiczne na fizjologię oraz/lub funkcje skóry [7]. Naukowcy wciąż poszukują innowacyjnych substancji aktywnych, które wykazywałyby dużą skuteczność w zwalczaniu oznak starzenia się skóry.

W ostatnich czasach odnotować można rosnące zainteresowanie wykorzystaniem naturalnych substancji pielęgnacyjnych oraz leczniczych w preparatach komercyjnych. Substancje roślinne o określonej aktywności biologicznej umożliwiają obniżenie stężenia lub całkowitą substytucję stosowanych dotychczas substancji syntetycznych. Związki te mogą także wykazywać synergizm działania z określoną substancją chemiczną, dlatego mogą być wykorzystane w celu intensyfikacji jej działania. Nowością na rynku farmaceutycznym oraz kosmetycznym są fitohormony, będące związkami pochodzenia roślinnego. Związki te regulują wzrost i rozwój roślin [8]. Niektóre fitohormony wykazują interesującą aktywność biologiczną na organizm ludzki. Przykład stanowi kwas jasmonowy i jego pochodne, zwane także jasmonidami. Związki te przyspieszają regenerację naskórka [9], redukują przebarwienia skóry [10] oraz łagodzą jej podrażnienia wywołane m.in. działaniem czynników zewnętrznych, takich jak promieniowanie UV oraz dym tytoniowy [11]. Ponadto, redukują one widoczne oznaki starzenia się skóry oraz zwiększają jej elastyczność [12]. Dużym zainteresowaniem konsumentów cieszą się również preparaty kosmetyczne oraz farmaceutyczne zawierające w swoim składzie niskocząsteczkowe peptydy. Preparaty te są przeznaczone do pielęgnacji skóry z widocznymi oznakami starzenia [13].

Nowe zagadnienie w kosmetologii oraz farmacji stanowią koniugaty substancji aktywnych. Koniugacja ma na celu stworzenie związku, który cechowałby się aktywnością biologiczną, charakterystyczną dla wchodzących w jego skład cząsteczek substancji aktywnych [14].

Z tego względu przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej jest charakterystyka fizykochemiczna nowych pochodnych kwasu jasmonowego w postaci jego koniugatów z wybranymi tetrapeptydami. Zaprezentowano także wyniki oceny właściwości fizykochemicznych oraz stabilności opracowanych receptur zawierających jasmonidy i ich pochodne. Ponadto, przedstawiono wyniki analizy kinetyki uwalniania badanych związków z przygotowanych preparatów przez półprzepuszczalne membrany. Zaprezentowano także wyniki badań *in vivo*, mających na celu determinację aktywności biologicznej koniugatów.

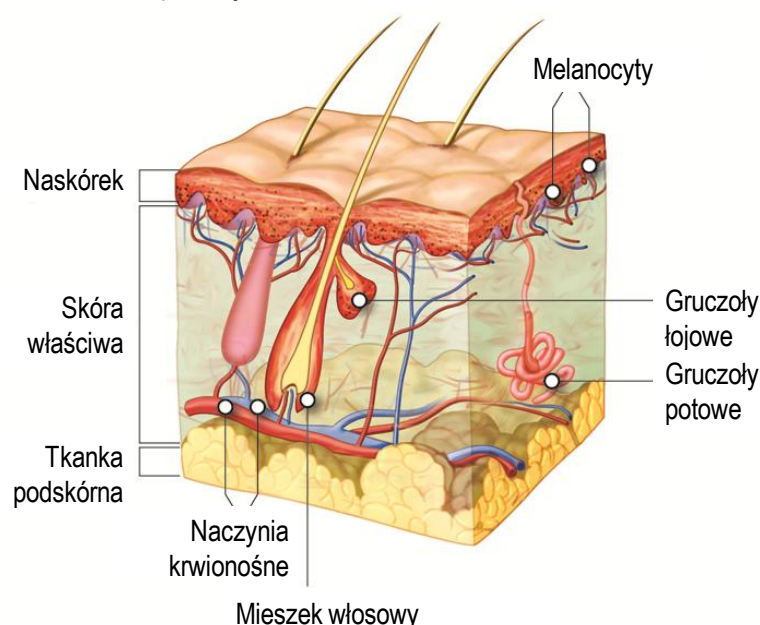
PRZEGLĄD LITERATURY

1. Budowa, właściwości i funkcje skóry

Skóra to największy organ człowieka o łącznej powierzchni 1,5-2 m², który pełni wiele istotnych funkcji w ludzkim organizmie. Do jej zadań należy bowiem izolacja ustroju od zewnętrznych czynników środowiskowych, takich jak temperatura, urazy mechaniczne czy drobnoustroje. Ponadto, skóra pełni ważną rolę w termoregulacji ustroju i gospodarce wodno-elektrolitowej [15]. Dzięki obecności receptorów, skóra umożliwia percepcję bodźców pochodzących ze środowiska zewnętrznego (uczucie zimna, ciepła, dotyku oraz bólu) [16]. Należy wspomnieć, że powłoki skórne są także miejscem syntezy witaminy D₃ z 7-dehydrocholesterolu, a także stanowią ważną drogę transportu niektórych substancji aktywnych [17].

1.1. Anatomia skóry

Skóra człowieka składa się z trzech głównych warstw: naskórka, skóry właściwej oraz tkanki podskórnej (rys. 1). Każda z tych warstw ma złożoną budowę oraz różnorodne funkcje, które zostały przedstawione poniżej.



Rys. 1. Schemat budowy skóry człowieka (zaadaptowano z [18]).

❶ **Naskórek** (*łac. epidermis*) - zewnętrzna warstwa skóry zbudowana z pięciu warstw komórek zróżnicowanych pod względem budowy oraz funkcji (rys. 2). Naskórek buduje warstwa podstawna, kolczysta, ziarnista, jasna oraz rogowa [19].



Warstwa podstawna

Warstwa podstawna (*łac. stratum basale; s. basale*) stanowi najniższą położoną warstwę komórek, charakteryzujących się obecnością wydłużonych, zasadochłonnych jąder komórkowych. *S. basale* zwana jest również warstwą rozrodczą, bowiem zachodzą w niej podziały komórkowe. Komórki macierzyste naskórka dzielą się mitotycznie z zachowaniem pewnej asymetrii, bowiem jedna komórka potomna wędruje ku powierzchni naskórka, przechodząc przez kolejne jego warstwy, natomiast druga pozostaje w warstwie podstawnej. U zdrowego człowieka okres przejścia (*ang. turn-over time*) keratynocytu z warstwy podstawnej do warstwy zrogowaciałej wynosi 28 dni [20]. Komórki *s. basale*



połączone są z błoną podstawną za pomocą hemidesmosomów. Połączenia występujące zarówno pomiędzy komórkami tej warstwy, jak również położonymi wyżej komórkami warstwy kolczystej to desmosomy mające postać uwypukleń błony komórkowej. W obrębie warstwy podstawnej znajdują się komórki Merkela (receptory dotyku), komórki Langerhansa (reakcja odpornościowa w obrębie skóry) oraz melanocyty (komórki produkujące i magazynujące melanicę, czyli barwnik skóry) (rys. 2) [21,22].



Warstwa kolczysta

Warstwa kolczysta (*łac. stratum spinosum*) stanowi najgrubszą warstwę naskórka i jest położona pomiędzy warstwą podstawną i ziarnistą. Komórki warstwy kolczystej ulegają spłaszczeniu w miarę migracji w kierunku warstwy ziarnistej. *S. spinosum* wraz z *s. basale* tworzą tzw. żywy naskórek (warstwę Malphigiego), powyżej którego rozpoczyna się proces keratynizacji (rogowacenia) komórek naskórka (rys. 2) [21].



Warstwa ziarnista

Warstwa ziarnista (*łac. stratum granulosum*) jest zbudowana z kilku rzędów wrzecionowatych komórek ze spłaszczonymi jądrami (rys. 2). Nazwa *s. granulosum* pochodzi od obecności w jądrami komórkowych ziaren keratohialiny biorących udział w procesie syntezy białka keratynowego [23]. W warstwie ziarnistej ma również miejsce synteza glikolipidów (głównie acyloglukocyloceramidu) wydzielanych następnie na zewnątrz komórki. Glikolipidy gromadzą się na granicy warstwy ziarnistej oraz warstwy rogowej i chronią skórę przed nadmierną, przeznaskórkową (transepidermalną) utratą wody, określanej jako TEWL (*ang. transepidermal water loss*) [24].



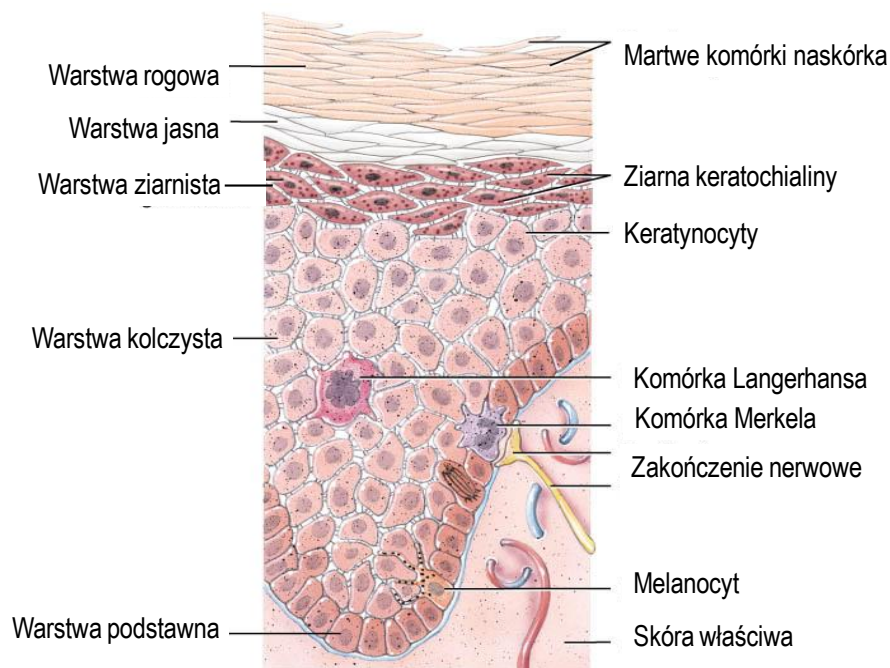
Warstwa jasna

Warstwa jasna (*łac. stratum lucidum*) jest położona pomiędzy warstwą rogową a ziarnistą. *S. lucidum* występuje tylko tam, gdzie skóra ma większą w porównaniu do reszty ciała grubość (podeszwy stóp, wewnętrzna część dłoni). Warstwa ta jest zbudowana z trzech do pięciu warstw silnie spłaszczonych i ściśle do siebie przylegających komórek keratynocytów (rys. 2) [25].



Warstwa rogowa

Warstwa rogowa (*łac. stratum corneum*) jest najbardziej zewnętrzną warstwą naskórka. *S. corneum* jest zbudowana z płaskich, bezjądrzastych (a więc niezdolnych do podziałów) komórek wypełnionych keratyną. Przestrzenie między keratynocytami warstwy rogowej wypełnia lipidowe spoiwo, zwane „cementem międzykomórkowym”. Główne składniki spoiwa komórkowego (ceramidy - 40%, sterole - 25%, wolne kwasy tłuszczowe - 18% oraz węglowodory - 11%) uszczelniają warstwę rogową naskórka i tworzą barierę nieprzepuszczalną dla wody [26]. Na powierzchni warstwy rogowej znajduje się płaszcz hydrolipidowy będący mieszaniną wody oraz sebum wytwarzanego przez gruczoły łojowe skóry [27]. Warstwa rogowa zbudowana jest z części zbitej (keratynocyty dachówkowato zachodzące na siebie) oraz złuszczonej (keratynocyty luźno ułożone) (rys. 2).



Rys. 2. Schemat budowy naskórka człowieka (zaadaptowano z [28]).

❷ **Skóra właściwa (*łac. cutis vera*)** - środkowa tkanka skórna zbudowana z trzech kolejnych warstw: brodawkowej (wpalającej się do naskórka tworząc brodawki), podbrodawkowej (utworzonej z tkanki łącznej luźnej) oraz siateczkowatej (utworzonej z tkanki łącznej zbitnej, zawierającej liczne włókna). Istotnym elementem budulcowym tkanki łącznej są fibroblasty odpowiedzialne za produkcję włókien oraz istoty międzykomórkowej [29]. W skórze właściwej występują włókna kolagenowe, głównie typu I oraz III, jak również typu V (występujące zawsze jako dopełnienie kolagenu typu I), które warunkują odporność skóry na urazy mechaniczne, jak również włókna elastynowe, warunkujące sprężystość skóry [30]. Istota międzykomórkowa ma charakter bezpostaciowego koloidu, w którego skład wchodzi przede wszystkim enzymy, glukoza oraz sole mineralne. W skórze właściwej znajdują się także liczne naczynia krwionośne (odpowiedzialne za doprowadzanie tlenu i składników odżywczych do komórek naskórka) oraz zakończenia nerwowe (odpowiedzialne za uczucie dotyku, ucisku, zimna, ciepła oraz bólu) [31].

❸ **Tkanka podskórna (*łac. subcutis*)** - warstwa znajdująca się pod skórą właściwą składająca się ze zrazików tłuszczowych porozidzielanych tkanką łączną włóknistą. Tkanka podskórna pełni rolę warstwy izolacyjnej i stanowi rezerwuuar energetyczny dla organizmu (rys.1).



2. Penetracja substancji aktywnych przez skórę

Proces przenikania cząsteczki substancji przez barierę naskórkowo - skórną zachodzi głównie na drodze dyfuzji biernej opisanej przez pierwsze prawo Ficka (podrozdział 8.1.2) i przebiega w następujących etapach [32]:

- ❶ partycja cząsteczek substancji aktywnej pomiędzy formę aplikacyjną (podłoże kosmetyczne) a *stratum corneum* naskórka,
- ❷ dyfuzja cząsteczek substancji przez lipofilową warstwę rogową naskórka,
- ❸ partycja cząsteczek substancji pomiędzy *stratum corneum* a warstwę ziarnistą naskórka,
- ❹ dyfuzja cząsteczek substancji przez kolejne warstwy naskórka o wzrastającej hydrofilowości,
- ❺ partycja cząsteczek substancji pomiędzy warstwę podstawną naskórka a górną część skóry właściwej,
- ❻ dyfuzja cząsteczek substancji do skóry właściwej [33,34].

2.1. Czynniki determinujące penetrację substancji aktywnych przez skórę

Istnieje wiele istotnych czynników wpływających na efektywną penetrację substancji aktywnych przez skórę. Wśród nich wymienia się między innymi właściwości substancji penetrującej (jej rozmiar, lipofilowość, polarność, rozpuszczalność w lipidach i w wodzie), właściwości podłoża kosmetycznego (lepkość, pH, wartość parametru HLB emulgatorów), obecność promotorów przenikania oraz stan zdrowotny skóry [35].

❶ **Rozmiar cząsteczki substancji aktywnej** - w przypadku transportu przez warstwę rogową nie powinien być zbyt duży. W nawiązaniu do tzw. „reguły 500 Daltonów”, przedstawionej w 2000 roku przez Bosa i Meinardiego [21], cząsteczka o rozmiarze powyżej 500 Da nie ma zdolności penetracji w głębsze warstwy skóry. Reguła ta powstała w oparciu o analizę masy cząsteczkowej alergenów, najczęściej powodujących kontaktowe zapalenie skóry. Wywnioskowano bowiem, że alergen musi wykazywać zdolność do penetracji skóry, aby wywołać odpowiedź immunologiczną [36]. Przykładem cząsteczki niewielkich rozmiarów, łatwo penetrującej warstwę skóry, jest kwas retinowy o masie 300 Da [37]. Z kolei wielocząsteczkowy kwas hialuronowy (5-200 kDa) nie ma zdolności przenikania przez skórę, w związku z czym może wykazywać działanie pielęgnacyjne jedynie na górną część warstwy rogowej [38]. W późniejszych latach zaprezentowano wyniki badań podważające regułę 500 Da. W 2006 roku Chen i wsp. [39] opublikowali pracę naukową, w której opisali transepidermalną penetrację cząsteczek białka o masie 6000 Da.

❷ **Lipofilowość cząsteczki substancji aktywnej** - wielkość charakteryzująca powinowactwo cząsteczki do fazy lipidowej i wodnej. Miarą lipofilowości substancji chemicznej jest stosunek jej równowagowych stężeń w układzie dwóch, niemieszających się rozpuszczalników. W warunkach równowagi termodynamicznej, przy stałym ciśnieniu i w stałej temperaturze stosunek ten ma stałą wielkość i jest nazywany współczynnikiem podziału. Jego wartość jest charakterystyczna dla danej substancji oraz danego układu dwóch rozpuszczalników [40]. Do określenia współczynnika podziału kosmetycznych oraz farmaceutycznych substancji aktywnych wykorzystuje się n-oktanol i wodę. Taki układ rozpuszczalników stanowi model bariery błonowej [41]. Wartość współczynnika podziału jest obliczana zgodnie z równaniem (1):

$$P_{\text{okt-wo}} = \frac{C_{\text{okt}}}{C_{\text{wo}}}, \quad (1)$$

gdzie:

$P_{\text{okt-wo}}$ - współczynnik podziału n-oktanol - woda,

C_{okt} - stężenie badanej substancji w fazie oktanolowej [mol/L],

C_{wo} - stężenie badanej substancji w fazie wodnej [mol/L].



Lipofilowość związku jest prezentowana w postaci logarytmu dziesiątego ze współczynnika podziału ($\log_{10} P_{\text{okt-wo}}$). Substancje o wysokiej wartości $\log_{10} P_{\text{okt-wo}}$ ($>3,0$) cechują się dużą lipofilowością, dzięki czemu z łatwością penetrują bariery imitujące naskórek. Z kolei substancje hydrofilowe o niskiej wartości $\log_{10} P_{\text{okt-wo}}$ ($<1,0$) wykazują słabą zdolność dyfuzji transbłonowej [42,43]. Wśród metod służących do określania lipofilowości substancji wyróżnia się metody teoretyczne (teoretyczne kalkulacje, m.in. w oparciu o wzór strukturalny cząsteczki) oraz metody eksperymentalne (analiza ekstrakcyjna, wysokosprawna chromatografia cieczowa) [44]. W celu zwiększenia zdolności penetracyjnych cząsteczek hydrofilowych stosuje się ich modyfikację za pomocą łańcuchów alkilowych i arylowych. Ponadto, hydrofilowe substancje aktywne są „zamykane” w lipofilowych nośnikach, takich jak liposomy, nanocząstki lipidowe, co ułatwia ich transport przez bariery biologiczne [34,45].

❸ **Lepkość podłoża kosmetycznego** - parametr regulujący ilość substancji uwalnianej z podłoża do skóry. Wyniki badań dowodzą, że obniżenie lepkości formy aplikacyjnej pozytywnie wpływa na zwiększenie ilości substancji aktywnej przenikającej w głąb skóry [46]. Stahl i wsp. [47] przeprowadzili badania uwalniania metronidazolu *in vitro* z różnych form aplikacyjnych (żel, krem oraz maść zawierające w swoim składzie 1% w/w substancji czynnej). W oparciu o wyniki badań największą ilość substancji aktywnej uwalnia się z żelu o najmniejszej lepkości, natomiast najmniej - z maści, cechującej się największą lepkością spośród badanych preparatów. Podobne wnioski przedstawili Gendy i wsp. [48], którzy przeprowadzili analizę uwalniania *in vitro* flurbiprofenu z maści oraz żelu.

❹ **Obecność promotorów przenikania** - promotory przenikania (PP) to substancje chemiczne zwiększające przenikanie substancji aktywnej przez skórę. PP mogą zwiększać permeację substancji aktywnych poprzez usuwanie płaszcza hydrolipidowego oraz częściowe rozpuszczanie lipidów cementu międzykomórkowego naskórka. Do najczęściej stosowanych PP zalicza się niskocząsteczkowe alkohole (etanol, gliceryna), związki powierzchniowo czynne (Tween, laurylosiarczan sodu), α - i β -hydroksykwas (kwas salicylowy, kwas cytrynowy), a także mocznik [49,50,51]. Należy pamiętać, że promotory przenikania stanowią składnik podłoża kosmetycznego, mogą więc wpływać na jego właściwości fizykochemiczne (pH, lepkość, stabilność) [52].

❺ **Stan zdrowotny skóry** - parametr, który również determinuje przenikanie substancji aktywnych z form aplikacyjnych. Zaobserwowano, że proces dyfuzji cząsteczek substancji przebiega szybciej przez ciekłą bądź uszkodzoną skórę [53]. Zaobserwowano również, że wysoki stopień nawilżenia skóry ułatwia transport substancji aktywnych [54]. W związku z powyższym, przed aplikacją preparatu pielęgnacyjnego zaleca się złuszczenie martwych komórek warstwy rogowej [55]. Ponadto, stosuje się również opatrunki okluzyjne, redukujące przeznaskórkową (transepidermalną) utratę wody oraz zwiększającą przenikanie substancji aktywnej do skóry [56].

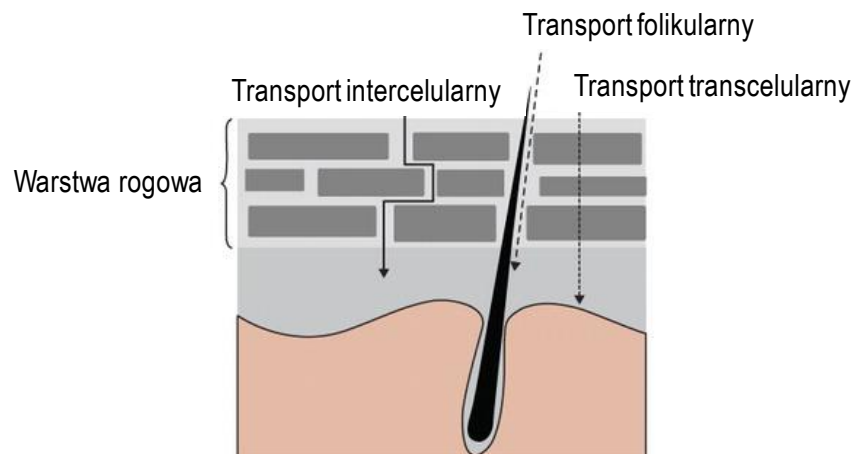
2.2. Drogi transportu substancji aktywnych przez skórę

Jak już wcześniej wspomniano, głównym mechanizmem przenikania substancji aktywnych przez bariery naskórkowe jest dyfuzja. Wśród możliwych dróg przenikania substancji czynnych przez skórę wyróżnia się transport transepidermalny oraz transport transfolikularny (rys. 3) [57].

❶ **Transport transepidermalny** - polega na dyfuzji substancji przez naskórek do skóry właściwej. Transport transepidermalny można podzielić na transport intercelularny (międzykomórkowy, typowy dla rozpuszczalnych w cemencie międzykomórkowym substancji lipofilowych) oraz transcelularny (przezkomórkowy, typowy dla nierozpuszczalnych w cemencie komórkowym substancji hydrofilowych) [58].



❷ **Transport transfolikularny** - polega na wnikaniu substancji aktywnych do skóry wzdłuż torebek włosowych. Ten rodzaj transportu zachodzi w przypadku substancji lipofilowych, dobrze rozpuszczalnych w zawartości gruczołów łojowych, usytuowanych w pobliżu mieszka włosowego [59].



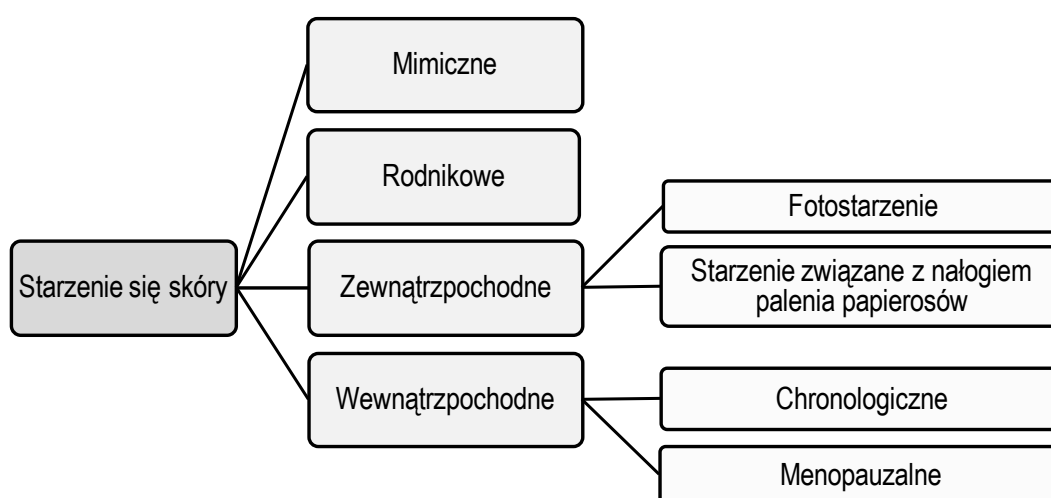
Rys. 3. Schemat dróg przenikania substancji aktywnych do skóry (zaadaptowano z [60]).

3. Proces starzenia się skóry

Starzenie się całego organizmu człowieka to naturalny i nieodwracalny proces, który postępuje wraz z wiekiem. Jest on uwarunkowany zarówno czynnikami wewnętrznymi, jak i czynnikami środowiskowymi. Starzenie się organizmu polega m.in. na zmniejszeniu biologicznej aktywności komórek, obniżeniu odporności i odpowiedzi na czynniki stresowe, jak również spowolnieniu procesów regeneracyjnych. Proces starzenia dotyczy także skóry - organu najbardziej narażonego na szkodliwe działanie czynników zewnętrznych, w związku z czym starzejącego się szybciej w porównaniu z organami wewnętrznymi [61].

3.1. Klasyfikacja rodzajów starzenia się skóry

Starzenie się skóry jest związane z działaniem zarówno czynników wewnętrznych (starzenie wewnątrzpochodne), jak i zewnętrznych (starzenie zewnątrzpochodne). Wyróżnia się także starzenie mimiczne oraz starzenie rodnikowe [62]. Na rys. 4 przedstawiono klasyfikację rodzajów starzenia się skóry ze względu na ich genezę.



Rys. 4. Klasyfikacja rodzajów starzenia się skóry ze względu na ich genezę.

Starzenie mimiczne oraz rodnikowe generują dylemat w związku z ich klasyfikacją, bowiem są skutkiem działania zarówno czynników zewnętrznych, jak i wewnętrznych.

3.1.1. Starzenie mimiczne

Miostarzenie jest związane z wolicjonalnym lub niewolicjonalnym poruszaniem mięśniami twarzy, co powoduje spadek elastyczności skóry w obszarach mimicznych i powstawanie tzw. „zmarszczek mimicznych”. Mimika twarzy jest związana z reakcją organizmu na różne bodźce zewnętrzne (zewnątrzpochodny aspekt mimicznego starzenia się skóry) i jest możliwa dzięki złożonej współpracy układu nerwowego i mięśniowego człowieka (wewnątrzpochodny aspekt mimicznego starzenia się skóry) [62].

3.1.2. Starzenie rodnikowe

Ten typ starzenia jest wywołany przez reaktywne formy tlenu (*ang.* reactive oxygen species, ROS), zwane także wolnymi rodnikami. Są to indywidualne chemiczne, które charakteryzują się obecnością atomów tlenu z niesparowanym elektronem [63]. Niektóre ROS są naturalnymi produktami metabolizmu komórkowego, inne powstają w układach nieożywionych, dlatego właśnie analogicznie do miostarzenia, rodnikowe starzenie się skóry jest powodowane zarówno przez czynniki wewnętrzne, jak i zewnętrzne.



❶ **Wewnątrzpochodne starzenie rodnikowe** - rodzaj starzenia się organizmu powodowany powstawaniem ROS jako produktów ubocznych metabolizmu komórki. Mitochondria są organellami cytoplazmatycznymi odpowiedzialnymi za oddychanie komórkowe. Wykorzystują one niemalże 90% tlenu komórkowego w reakcjach enzymów oddechowych, w związku z czym mitochondrialny łańcuch oddechowy jest uważany za główne wewnątrzkomórkowe źródło ROS [64]. Uboczne metabolity oddychania komórkowego indukują uszkodzenia oksydacyjne samych komórek, jak również lipidów, białek oraz kwasu deoksyrybonukleinowego (*ang.* deoxyrybonucleic acid, DNA) [65,66]. Wewnętrzne starzenie rodnikowe jest tożsame z opisywaną w dalszej części podrzdziału teorią mitochondrialną, jednakże kładzie większy nacisk na znaczenie ROS w procesach starzenia. Należy podkreślić, że mitochondrialny łańcuch oddechowy jest głównym, ale nie jedynym źródłem wewnątrzustrojowego powstawania reaktywnych form tlenu. Promieniowanie ultrafioletowe jest również kluczowym stymulatorem powstawania ROS w tkankach, co z kolei jest tożsame z teorią fotostarzenia się skóry [67].

❷ **Zewnątrzpochodne starzenie rodnikowe** - rodzaj starzenia się organizmu, powodowany powstawaniem ROS w środowisku zewnętrznym, w którym bytuje organizm. ROS powstają w atmosferze na skutek oddziaływania promieniowania ultrafioletowego (*ang.* ultraviolet radiation, UVR) z cząsteczkami związków obecnych w atmosferze [68]. Skóra jest najbardziej narażonym organem na zewnątrzpochodne starzenie rodnikowe, dlatego zarówno suplementacja, jak i stosowanie preparatów kosmetycznych zawierających antyoksydanty jest bardzo ważnym aspektem pielęgnacji przeciwstarzeniowej [69].

3.1.3. Starzenie zewnątrzpochodne

❶ **Fotostarzenie** - rodzaj starzenia zewnątrzpochodnego związany z nadmierną ekspozycją skóry na promieniowanie ultrafioletowe. Ze względu na długość fali promieniowania, UVR można podzielić na promieniowanie UVA ($\lambda = 320-400$ nm), UVB ($\lambda = 280-320$ nm) oraz UVC ($\lambda = 200-280$ nm). Główną przyczyną fotostarzenia się skóry jest promieniowanie UVA, które dociera aż do skóry właściwej i może powodować poważne uszkodzenia w funkcjonowaniu i wyglądzie skóry [70,71]. Promieniowanie to powoduje uszkodzenie struktury kwasów nukleinowych oraz białek i lipidów, m.in. wskutek generowania powstawania ROS w skórze [67]. Skutkiem oddziaływania promieniowania UV na skórę jest powstawanie przebarwień skórnych, mutacji DNA oraz kancerogenezy w obrębie komórek skóry [72,73]. Funkcję ochronną skóry przed UVR pełni melanina wykazująca zdolność rozpraszania i absorpcji promieniowania UV oraz zamieniania energii promieniowania na energię cieplną [74].

❷ **Starzenie związane z nałogiem palenia papierosów** - rodzaj starzenia zewnątrzpochodnego związany z paleniem wyrobów tytoniowych i dymem tytoniowym. Nikotyna to alkaloid naturalnie występuje w liściach i korzeniach tytoniu szlachetnego, *Nicotiana tabacum* [75], który oddziałuje z receptorem nikotynowym $\alpha-3$, zlokalizowanym m.in. na fibroblastach, obniżając ich zdolności syntezy kolagenu. Ponadto, u nałogowych palaczy stwierdzono podwyższenie aktywności metaloproteiny-1, enzymu odpowiedzialnego za degradację kolagenu. Tak zwana „skóra palacza” charakteryzuje się szarym odcieniem, małą elastycznością i obecnością zmarszczek mimicznych w okolicy ust [76].

3.1.4. Starzenie wewnątrzpochodne

❶ **Starzenie chronologiczne** - rodzaj starzenia wewnątrzpochodnego, związany z naturalnym upływem czasu. Tzw. „chronostarzenie” skóry rozpoczyna się już po 20 roku życia i ma charakter indywidualny. Istnieje kilka teorii i hipotez, które wyjaśniają przyczyny i mechanizmy chronologicznego starzenia się skóry. Wśród nich wymienić można teorię



genową, teorię Hayflicka, teorię zaburzeń białkowych, teorię mitochondrialną oraz teorię membranową [77].



Teoria genowa

W oparciu o założenia genowej teorii starzenia się skóry, w każdym jądrze komórkowym znajdują się geny odpowiedzialne za regulację szybkości i charakteru starzenia się komórki. Wskutek starzenia się organizmu następuje tzw. „stopniowy zanik pamięci komórkowej”, czyli utrata zdolności komórek do wykonywania szeregu zaprogramowanych genetycznie zadań [78]. Następuje zmniejszenie ekspresji genów odpowiedzialnych za proliferację oraz zwiększenie ekspresji genów supresorowych, dlatego w starzejącej się skórze obserwuje się spadek procesów wzrostowych. Efektem tego zjawiska jest osłabienie zdolności regeneracyjnych naskórka, jak również spowolnienie wytwarzania przez fibroblasty nowych włókien podporowych i spadek elastyczności skóry [70].



Teoria Hayflicka

Teoria Hayflicka, zwana również teorią ograniczonej liczby podziałów komórki, zakłada spadek aktywności telomerazy wraz z wiekiem. Telomeraza jest enzymem regulującym proces replikacji telomerów (końcowych fragmentów chromosomów), które ulegają skróceniu przy każdym podziale komórkowym wskutek braku ich transkrypcji na nowo powstałe nici DNA. Zgodnie z założeniem tej teorii zjawisko skracania telomerów prowadzi do uszkodzenia komórki oraz utrudnia jej prawidłowy podział, wskutek czego dochodzi do jej śmierci. W związku z powyższym zjawisko skracania telomerów można porównać do „wewnętrznego zegara komórki”, odliczającego czas jej funkcjonowania. Teoria Hayflicka zakłada więc, że komórki ludzkie mogą ulegać określonej liczbie podziałów, po czym dochodzi do ich apoptozy [79,80].



Teoria zaburzeń białkowych

Zgodnie z założeniem teorii zaburzeń białkowych, upośledzenie syntezy białek może również prowadzić do starzenia się organizmu. Oprócz funkcji budulcowej, białka pełnią funkcję receptorową i regulują komunikację wewnątrz- i zewnątrzkomórkową oraz działanie systemów naprawczych i obronnych. Wraz z wiekiem zdolność komórek do syntezy białek znacznie spada, co upośledza sprawne funkcjonowanie poszczególnych organów, a co za tym idzie całego organizmu. Prawdopodobną przyczyną zaburzeń białkowych jest ekspresja genów promujących „mechanizmy samobójcze” wraz z osłabieniem ekspresji genów kodujących określony aminokwas [81,82].



Teoria mitochondrialna

Według teorii mitochondrialnej wraz z wiekiem maleje zarówno liczba, jak i aktywność mitochondriów, co skutkuje zmniejszeniem wytwarzania adenozy-5'-trifosforanu (ATP, cząsteczka magazynująca energię komórki) [83]. Niski poziom ATP z kolei upośledza zdolności regeneracyjne komórki, w wyniku czego zwiększa się liczba uszkodzeń komórki prowadząca do jej śmierci. Spadek zdolności komórek do regeneracji prowadzi do starzenia się całego organizmu, w tym również skóry [84,85].



Teoria membranowa

Teoria membranowa, zwana również teorią błonową zakłada, że proces starzenia się organizmu ma wpływ na skład błon komórkowych. Według tej teorii wraz z upływem czasu dochodzi do zwiększenia zawartości lipidów oraz obniżenia zawartości związków hydrofilowych w błonie komórkowej, co upośledza transcelularny transport substancji. Efektem takiej zmiany jest nagromadzenie się toksycznych metabolitów we wnętrzu komórki, co może prowadzić do jej uszkodzenia oraz śmierci. Ponadto, teoria ta zakłada wzrost stężenia glikoprotein umiejscowionych w błonach komórkowych, co powoduje niekorzystny i nieodwracalny wzrost lepkości i sztywności błon komórkowych [86,87].

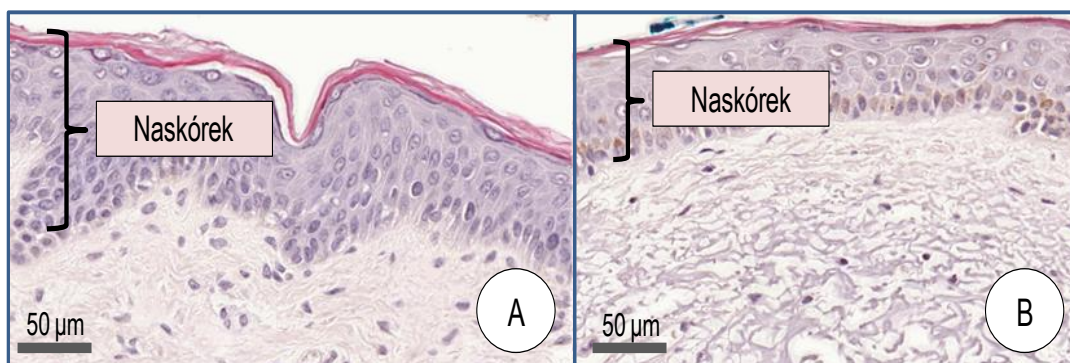
❷ **Starzenie menopauzalne** - rodzaj starzenia wewnątrzpochodnego zwany także starzeniem hormonalnym. Menopauza to naturalny i nieunikniony etap w życiu każdej kobiety następujący pomiędzy wiekiem prokreacyjnym a początkiem starzenia się [88]. Hormonalne starzenie się skóry jest związane ze spadkiem stężenia estrogenów we krwi. Estrogeny nazywane są hormonami młodości, ponieważ mają wpływ na prawidłową pigmentację skóry, jej unaczynienie, elastyczność i sprężystość oraz zdolność do hamowania nadmiernej transepidermalnej utraty wody [89].

3.2. Obraz kliniczny starzejącej się skóry

Istnieje wiele klinicznych zmian skórnych świadczących o postępującym procesie starzenia się największego organu ludzkiego ciała. Starzejąca się skóra traci elastyczność, nawilżenie i równomierny kolor. Wraz z wiekiem pojawiają się przebarwienia skórne (w tym tzw. „plamy starcze”) i zaburzenia rogowacenia, jednak to zmarszczki są najbardziej charakterystyczną oznaką starzenia się skóry. Zmarszczki definiuje się jako liniowe zmiany skórne, powstające na skutek spadku nawilżenia i elastyczności skóry [90]. Jeżeli głębokość zmarszczek nie przekracza wartości 0,05 mm zmiany te nazywane są powierzchniowymi zmarszczkami, które występują najczęściej w okolicy oczu i są nazywane „kurzymi łapkami” [91]. Liniowe zmiany skórne, których głębokość przekracza wspomnianą wartość, to zmarszczki głębokie występujące w postaci bruzd na czole, policzkach, dolnej części twarzy oraz szyi [92]. Ponadto, nieustanna praca mięśnia okrężnego ust powoduje utratę sprężystości skóry okalającej usta, co wiąże się z powstawaniem pionowych zmarszczek - tzw. „zmarszczek palacza”. Długotrwałe działanie grawitacji, jak również ścieńczenie skóry i stopniowa delokalizacja i degradacja włókien kolagenowych i elastynowych powodują utratę jędrności skóry i utratę owalu twarzy [93].

3.3. Obraz histologiczny starzejącej się skóry

Obraz histologiczny starzejącej się skóry pozwala określić mechanizmy i przyczyny starzenia się skóry na poziomie komórkowym. Wraz z upływem czasu obserwuje się regresję aktywności podziałowej komórek warstwy podstawnej naskórka, wskutek czego dochodzi do spłaszczenia i horyzontalnego (spoczynkowego) ułożenia komórek s. *basale*. Ponadto, obserwuje się również atrofię warstwy kolczystej oraz ziarnistej naskórka, co powoduje stopniowe zmniejszanie jego grubości. Na skutek tych procesów następuje spłaszczenie granicy pomiędzy naskórkiem a skórą właściwą (rys. 5). Procesowi starzenia się skóry towarzyszy również słabnięcie adhezji naskórka i skóry właściwej, co prowadzi do ograniczenia powierzchni ich kontaktu, pogorszenia ukrwienia warstwy podstawnej naskórka, a w efekcie - zmniejszenia i ograniczenia wymiany metabolicznej oraz substancji odżywczych między tymi warstwami [94,95].



Rys. 5. Obraz histologiczny naskórka oraz skóry właściwej u młodej (A) oraz starszej (B) osoby (zaadaptowano z [96]).

Zmiany histologiczne związane z procesem starzenia się organizmu dotyczą także skóry właściwej. Stopniowy spadek zawartości włókien kolagenowych typu I, III oraz V prowadzi do zmian w sieciowaniu nowo powstałych włókien podporowych, które ulegają twardnieniu i delokalizacji [97]. Wraz z wiekiem dochodzi do redukcji zawartości lipidów w cemencie międzykomórkowym oraz obniżenia aktywności gruczołów łojowych, co prowadzi do pogłębiającej się suchości skóry i powstawania zmarszczek. Spadek nawilżenia naskórka i skóry właściwej jest wynikiem osłabienia bariery lipidowej naskórka i nadmiernej, transepidermalnej utraty wody [98].

4. Emulsje kosmetyczne

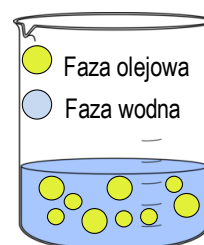
Jak już wspomniano, skóra człowieka jest narażona na działanie wielu czynników zewnętrznych, mogących przyspieszać procesy jej starzenia. W celu zachowania jak najlepszej kondycji skóry stosuje się formułacje kosmetyczne zawierające różne substancje aktywne. Większość preparatów pielęgnacyjnych dostępnych na rynku to różnego typu emulsje.

4.1. Definicja i klasyfikacja emulsji

Emulsję definiuje się jako układ dwóch niemieszających się cieczy, spośród których jedna ma charakter hydrofilowy (tzw. faza wodna emulsji), a druga - charakter hydrofobowy (tzw. faza olejowa emulsji) [99]. Emulsja to rodzaj układu dyspersyjnego, w którym cząstki fazy wewnętrznej (stanowiącej mniejszość układu) ulegają rozproszeniu w fazie zewnętrznej (stanowiącej większość układu) na skutek mieszania obu faz. Faza wewnętrzna emulsji nazywana jest także fazą zdyspergowaną lub rozproszoną, natomiast faza zewnętrzna - fazą dyspergującą lub rozpraszającą [100].

Ze względu na układ faz emulsje można podzielić w następujący sposób:

❶ **emulsja typu olej w wodzie (o/w)** - układ, w którym cząstki fazy olejowej stanowią mniejszość i są rozproszone w zewnętrznej fazie wodnej. Emulsja o/w może być bazą kosmetyczną do produkcji lekkich kremów nawilżających, maseczek oraz szamponów (zawartość fazy tłuszczowej < 30% w/w całości), jak również cold kremów, mleczek i odżywek do włosów (zawartość fazy tłuszczowej > 30% w/w całości) (rys. 6),



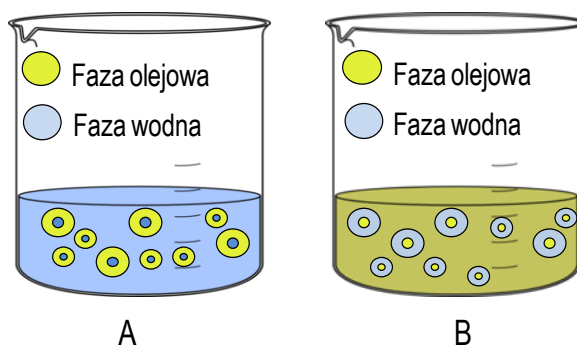
Rys. 6. Schemat emulsji typu o/w.

❷ **emulsja typu woda w oleju (w/o)** - układ, w którym cząstki fazy wodnej stanowią mniejszość i są rozproszone w zewnętrznej fazie olejowej. Tego typu formułacja może stanowić bazę kosmetyczną do produkcji kremów tłustych oraz mleczek do demakijażu (zawartość fazy tłuszczowej 20 do 40 % w/w całości) (rys. 7),



Rys. 7. Schemat emulsji typu w/o.

❸ **emulsja wielofazowa** - nazywana również emulsją podwójną. To układ dyspersyjny, w którym faza zewnętrzna emulsji jest dodatkowo rozproszona w kroplach fazy wewnętrznej emulsji. Przykładem emulsji podwójnej jest emulsja o/w/o, w której cząstki oleju rozproszone w fazie wodnej tworzą kroplę, które są dodatkowo rozproszone w zewnętrznej fazie olejowej. Do emulsji wielofazowych zalicza się również emulsję w/o/w (faza wodna rozproszona w oleju, zdyspergowanego dodatkowo w wodzie) (rys. 8). Zaletą takich układów jest możliwość ochrony nietrwałych substancji aktywnych w rdzeniu cząstek fazy rozproszonej emulsji [99,100,101].



Rys. 8. Emulsja wielofazowa typu w/o/w (A) oraz o/w/o (B).

Ze względu na rozmiar cząstek fazy wewnętrznej emulsje można podzielić w następujący sposób:

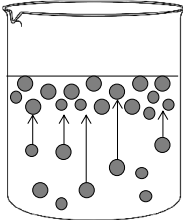
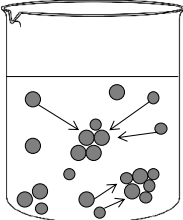
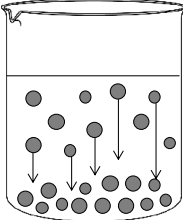
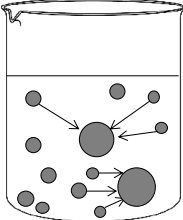
- ❶ **mikroemulsje** - układy, w których rozmiar cząstek fazy zdyspergowanej emulsji mieści się w zakresie 10-100 nm,
- ❷ **nanoemulsje** - układy, w których rozmiar cząstek fazy zdyspergowanej emulsji mieści się w zakresie 20-500 nm,
- ❸ **makroemulsje** - układy, w których rozmiar cząstek fazy zdyspergowanej emulsji mieści się w zakresie 1-100 μm [102].

4.2. Rodzaje i przyczyny niestabilności emulsji

Ze względu na trwałość fizyczną, emulsje mogą tworzyć układy stabilne termodynamicznie lub kinetycznie. Emulsje trwałe termodynamicznie charakteryzują się dobrą dyspersją fazy wewnętrznej i tworzą układ o możliwie najniższej energii swobodnej (mikroemulsje). Przeciwnie, emulsje trwałe kinetycznie charakteryzują się występowaniem cząstek fazy wewnętrznej o nieco większych rozmiarach (makroemulsje), w związku z czym nie tworzą układu o możliwie najniższej energii swobodnej. Trwałość kinetyczna nie jest jednoznaczna z trwałością termodynamiczną, w związku z czym emulsje trwałe kinetycznie z czasem ulegają procesom destabilizacji [103].

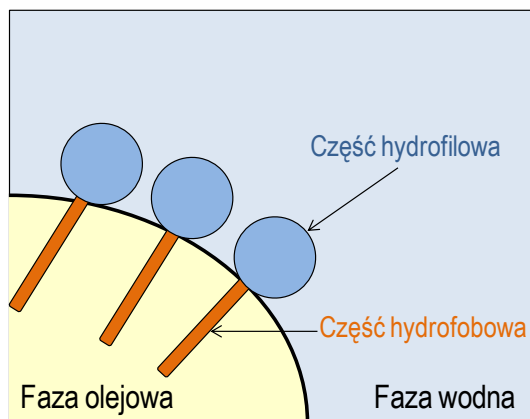
Rodzaje niestabilności emulsji można klasyfikować ze względu na mechanizmy fizykochemiczne; wówczas należy wyróżnić niestabilność odwracalną i nieodwracalną. Niestabilność odwracalna jest definiowana jako szereg niekorzystnych zmian zachodzących w układzie, które można cofnąć poprzez wymieszanie i homogenizację układu. Do zjawisk powodujących tego typu niestabilność zalicza się śmietanowanie oraz sedymentację. W teorii flokulacja jest uznawana za odwracalne zjawisko destabilizacji emulsji. W praktyce natomiast bardzo często dochodzi do agregacji fazy rozproszonej emulsji w większe krople, czyli do koalescencji - zjawiska powodującego niestabilność nieodwracalną emulsji oraz prowadzącego do tzw. złamania emulsji. Flokulacja jest więc uznawana za zjawisko częściowo odwracalne. Niestabilność nieodwracalna stanowi szereg niekorzystnych zmian zachodzących w układzie, których nie można cofnąć poprzez wymieszanie i homogenizację układu. W tabeli 1 przedstawiono schematy oraz definicje procesów destabilizacji emulsji [101,104].

Tabela 1. Klasyfikacja, definicje oraz schematy procesów destabilizacji emulsji [101,104].

NIESTABILNOŚĆ EMULSJI	
Związana z migracją cząstek fazy wewnętrznej (●) emulsji	Związana ze zmianą rozmiaru cząstek fazy wewnętrznej (●) emulsji
<i>Odwracalna</i>	<i>Częściowo odwracalna</i>
Śmietanowanie emulsji	Flokulacja emulsji
 <p>Polega na gromadzeniu się cząstek fazy wewnętrznej emulsji o niezmiennych rozmiarach na górze naczynia, w którym znajduje się emulsja. Jest wynikiem przemieszczania się drobin fazy zdyspergowanej o mniejszej gęstości w kierunku powierzchni, dlatego może zachodzić częściej w emulsjach typu o/w.</p>	 <p>Polega na agregacji cząstek fazy zdyspergowanej w większe skupiska, bez ich zlewania się w większe krople oraz znacznej migracji cząstek w naczyniu wypełnionym emulsją. Jest wynikiem ruchu cząstek fazy wewnętrznej ku sobie na skutek oddziaływań Van der Waalsa.</p>
<i>Odwracalna</i>	<i>Nieodwracalna</i>
Sedymentacja emulsji	Koalescencja emulsji
 <p>Polega na gromadzeniu się cząstek fazy wewnętrznej emulsji o niezmiennych rozmiarach na dnie naczynia, w którym znajduje się emulsja. Jest wynikiem oddziaływania grawitacji ziemskiej na drobinę fazy zdyspergowanej i może zachodzić we wszystkich rodzajach emulsji.</p>	 <p>Polega na agregacji cząstek fazy zdyspergowanej w większe skupiska, bez ich znacznej migracji w naczyniu wypełnionym emulsją. Zagregowane cząstki zlewają się w większe krople, co prowadzi do całkowitego rozdziału faz emulsji (złamania emulsji). Jest wynikiem oddziaływań van der Waalsa oraz zjawiska Ostwalda.</p>

Destabilizacja emulsji w czasie jest złożonym procesem, który zależy od wielu czynników, m.in. temperatury przechowywania oraz kompozycji formułki, jak również stopnia homogenizacji układu. Należy podkreślić, że połączenie dwóch, niemieszających się faz w jednorodną całość jest możliwe dzięki emulgatorowi. Jest to substancja o charakterze amfifilowym (posiada jednocześnie część hydrofobową i hydrofilową), dzięki czemu wykazuje powinowactwo zarówno do hydrofilowej, jak i hydrofobowej fazy emulsji (rys. 9). Budowa

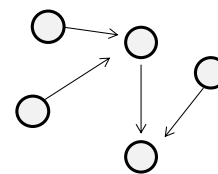
emulgatora umożliwi obniżenie napięcia międzyfazowego wskutek adsorpcji na granicy dwóch, niemieszających się faz [105].



Rys. 9. Schemat adsorpcji cząsteczek emulgatora na granicy fazy hydrofilowej i hydrofobowej.

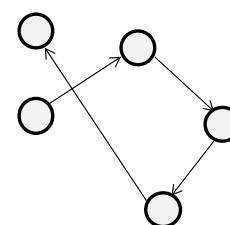
Pomimo dodatku emulgatora, większość emulsji tworzy układy niestabilne termodynamicznie i ich destabilizacja w czasie jest procesem naturalnym. Najistotniejszy wpływ na procesy destabilizacji emulsji mają takie zjawiska fizykochemiczne, jak ruchy Browna, oddziaływania van der Waalsa, Ostwaldowskie dojrzewanie emulsji oraz prostoliniowy ruch cząstek fazy zdyspergowanej emulsji [101]:

❶ **ruchy Browna** - nieuporządkowany ruch cząstek fazy zdyspergowanej zachodzący w wyniku ich zderzeń z cząstkami fazy dyspergującej (rys. 10). Ruchy Browna słabną wraz ze wzrostem spadku temperatury układu, można je więc minimalizować poprzez przechowywanie emulsji w niskich temperaturach. Chaotyczne ruchy cząstek fazy rozproszonej słabną również ze wzrostem rozmiarów tych cząstek, czyli destabilizacją układu [106].



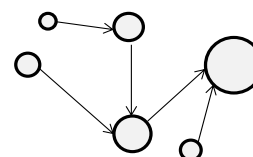
Rys. 10. Schemat ruchów Browna.

❷ **oddziaływania van der Waalsa** - oddziaływania międzycząsteczkowe wywołujące zjawisko ruchu cząstek fazy wewnętrznej emulsji ku sobie. Siły te oddziałują pomiędzy elektrycznie obojętnymi cząstkami lub atomami. Oddalenie od siebie cząstek fazy wewnętrznej powoduje polaryzację ich ładunków elektrycznych, co skutkuje przyciąganiem się cząstek (rys. 11). Zbyt mała odległość między tymi cząstkami (emulsja niejednorodna, ulegająca destabilizacji), powoduje z kolei wzajemne odpychanie cząstek, co prowadzi do flokulacji i koalescencji emulsji [107].



Rys. 11. Schemat oddziaływań van der Waalsa.

❸ **ostwaldowskie dojrzewanie emulsji** - zjawisko zlewania się kropli fazy rozproszonej na skutek różnicy ich rozmiaru, a co za tym idzie, energii wewnętrznej. Ostwaldowskie dojrzewanie emulsji jest analogiczne do zjawiska koalescencji, jednak mechanizm tego zjawiska jest nieco inny. Zjawisko Ostwalda powoduje ruch mniejszych cząstek w kierunku większych, nigdy odwrotnie (rys. 12) [108]. Migracja cząstek w fazie dyspergującej może zachodzić bezpośrednio (migracja samych cząstek fazy rozproszonej) bądź też pośrednio (migracja miceli złożonej z cząstki fazy rozproszonej oraz kilku cząsteczek emulgatora).



Rys. 12. Schemat zjawiska Ostwalda.



Migracja bezpośrednia jest możliwa jedynie wówczas, gdy cząstki fazy wewnętrznej są częściowo rozpuszczalne w fazie zewnętrznej [109].

④ **prostoliniowy ruch cząstek fazy zdyspergowanej emulsji** - zjawisko dotyczące procesów śmietanowania i sedymentacji emulsji. Jest ono opisywane z wykorzystaniem prawa Stokesa, określającego siłę oporu, jaką musi pokonać kulista cząstka, aby mogła poruszać się w sposób prostoliniowy w ośrodku dyspersyjnym (ciecz lub gaz) z określoną prędkością. Prawo Stokesa jest przydatne w analizie niestabilności emulsji jedynie przy założeniu, że cząstki fazy rozproszonej mają kształt kulisty [110].

4.3. Metody stabilizacji emulsji

Jak już wcześniej wspomniano (paragraf 4.1), emulsja jest układem dwóch, niemieszających się cieczy, znacząco różniących się polarnością. W celu zmieszania tych faz niezbędne jest użycie emulgatora, którego zadaniem jest obniżenie napięcia powierzchniowego na granicy fazy wodnej i olejowej. Należy jednak wspomnieć, że nawet najlepiej dobrany emulgator nie jest w stanie obniżyć wartości napięcia międzyfazowego do zera, w związku z czym każdy układ emulsyjny będzie wykazywał tendencję do destabilizacji. Dyspersja fazy wewnętrznej emulsji na skutek mieszania i homogenizacji układu powoduje wzrost jego entropii, która jest miarą nieuporządkowania układu [111]. Jak wiadomo, każdy układ w przyrodzie, w tym układ emulsyjny, dąży do uzyskania możliwie najniższej entropii, co jest podstawową przyczyną niestabilności emulsji [101].

Emulsje można stabilizować przez:

① homogenizację układu i obniżenie temperatury środowiska przechowywania - wzrost stabilności emulsji na skutek osłabienia ruchów Browna, sił van der Waalsa, Ostwaldowskiego dojrzewania emulsji [112],

② modyfikację powierzchni międzyfazowej ładunkiem elektrycznym - wzrost stabilności emulsji na skutek wprowadzenia ładunku elektrycznego (cząstki emulgatora z grupy anionowych środków powierzchniowo czynnych) na powierzchnię kropli fazy wewnętrznej. Ładunek ten utrudnia koalescencję i flokulację kropli powodując ich wzajemne odpychanie. Skuteczność tej metody zależy od doboru fazy zewnętrznej, bowiem musi ona posiadać zdolność przewodzenia ładunku (emulsje typu o/w). Metoda ta jest rzadko stosowana ze względu na podwyższone ryzyko rozwarstwiania się faz emulsji na skutek wysokiego stężenia elektrolitów w układzie [101].

③ wzmocnienie powierzchni międzyfazowej emulsji - wzrost stabilności emulsji na skutek „wzmocnienia” powierzchni kropli fazy zdyspergowanej za pomocą adsorpcji cząsteczek emulgatora, amfifilowych polimerów syntetycznych i naturalnych (białka) oraz proszków nierozpuszczalnych w obu fazach emulsji. Średnica cząstek ciał stałych stabilizujących emulsje powinna być znacznie mniejsza niż średnica cząstek fazy zdyspergowanej [113,114].

4.4. Organoleptyczna ocena stabilności emulsji kosmetycznych

Stabilność preparatów pielęgnacyjnych to jeden z najważniejszych parametrów decydujący w dużej mierze o zdatności preparatu do jego użytku zewnętrznego. Najbardziej podstawową metodą oceny stabilności produktu kosmetycznego jest badanie organoleptyczne mające na celu ocenę jego następujących właściwości:

① wygląd produktu - gładka, jednolita masa, bez obecności grudek i mechanicznych zanieczyszczeń. Obecność fazy wodnej na powierzchni formacji jest oznaką rozwarstwiania się jej faz (złamania emulsji) i świadczy o jej niezdatności do użycia [115].

② zapach produktu - przyjemny, analogiczny do zapachu produktu tuż po jego otwarciu [115]. Nieprzyjemny zapach kosmetyku wyczuwany przez konsumenta może świadczyć



m.in. o jęczeniu fazy tłuszczowej będące wynikiem utleniania kwasów tłuszczowych lub hydrolizy wiązań estrowych występujących w lipidach [116].

☉ kolor produktu – emulsja niezawierająca w swoim składzie naturalnych oraz syntetycznych substancji barwiących powinna mieć białą lub śmietankową barwę. Wynika to z faktu, że układ dyspersyjny, jakim jest emulsja, powoduje równomierne rozpraszanie światła widzialnego. Wyjątek stanowią emulsje o rozmiarach cząstek poniżej 100 μm . Światło widzialne (390 – 750 nm) jest rozpraszane wyłącznie przez cząstki, których rozmiar przekracza około $\frac{1}{4}$ długości wiązki padającego światła. Ze względu na niewielki rozmiar, promieniowanie widzialne jest częściowo rozpraszane, a częściowo transmitowane przez cząstki mikro- oraz nanoemulsji. W związku z powyższym, układy te są przezroczyste lub mają mleczną barwę [117,118]. Zmiana koloru emulsji w czasie może świadczyć o jej destabilizacji. Żółknięcie początkowo białych preparatów jest zwykle spowodowane oksydacją lub termicznym rozkładem komponentów, podczas gdy bielenie mikro- oraz nanoemulsji może oznaczać powstawanie aglomeratów cząstek fazy rozproszonej [119].

Obowiązkiem producenta kosmetyków jest wprowadzenie na rynek produktu o przebadanej i udokumentowanej stabilności. Należy jednak pamiętać, że w wyniku otwarcia opakowania, w którym znajduje się preparat dochodzi do nieuniknionego i postępującego w czasie starzenia się produktu.



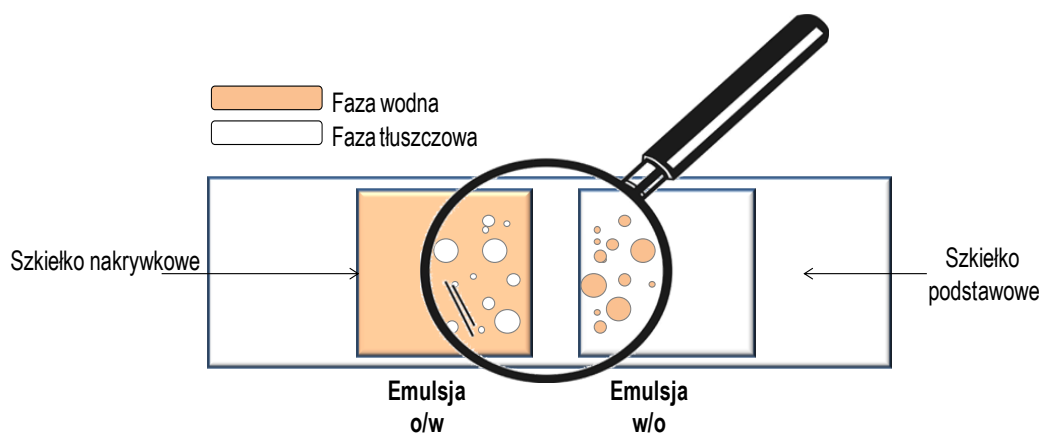
5. Badanie właściwości fizykochemicznych formulacji kosmetycznych

Producenci preparatów kosmetycznych są prawnie zobligowani do zapewnienia bezpieczeństwa i stabilności oferowanego produktu. W chwili obecnej przemysłem kosmetycznym kierują: z ramienia Unii Europejskiej - Dyrektywa Rady 76/768/WE z dnia 21 lipca 1976 roku wraz ze wszystkimi poprawkami, zaś w Polsce - Ustawa o kosmetykach Dz. U. z 2001 r. Nr 42 poz. 473 [120,121]. W związku z powyższym przed wprowadzeniem preparatu kosmetycznego na rynek należy zbadać jego właściwości fizykochemiczne, czyli określić m.in. pH, lepkości oraz stabilność preparatu.

5.1. Określanie typu emulsji

Typ emulsji kosmetycznej zależy przede wszystkim od jej kompozycji i może być analizowany za pomocą kilku metod. Jedną z nich jest metoda przewodnictwa elektrycznego polegająca na pomiarze zdolności przewodnictwa elektrycznego badanej próbki. Parametr ten jest mierzony za pomocą omiornika. Emulsje typu o/w charakteryzują się dobrą przewodnością prądu ze względu na obecność fazy wodnej bogatej w elektrolity (pochodzące m.in. z dysocjacji emulgatora rozpuszczonego w fazie wodnej emulsji). Emulsje typu w/o natomiast charakteryzują się słabą przewodnością prądu [122].

Inną, znacznie popularniejszą metodą wykorzystywaną do określenia typu emulsji kosmetycznych jest mikroskopia optyczna. Analiza emulsji polega na dodaniu barwnika do badanej formulacji, a następnie jej obserwacji pod mikroskopem optycznym. Wybarwieniu ulega faza rozpuszczająca dany barwnik. Do wybarwienia fazy wodnej wykorzystuje się barwniki o charakterze hydrofilowym, np. oranż metylowy (rys. 13), natomiast fazę tłuszczową wybarwia się najczęściej lipofilowym barwnikiem Sudan IV [100].



Rys. 13. Schemat obrazu mikroskopowego emulsji zabarwionej rozpuszczalnym w wodzie oranżem metylowym.

5.2. Badanie wartości pH

Wartość pH zdrowej skóry waha się w granicach 5,5-6 [123]. Lekko kwasowe środowisko skóry chroni ją przed nadmiernym namnażaniem i rozwojem chorobotwórczych patogenów. Wartość pH preparatów kosmetycznych jest bardzo istotnym parametrem, ponieważ ma wpływ na bezpieczeństwo stosowania kosmetyku na skórę. Stosowanie preparatów o zbyt niskim lub zbyt wysokim odczynie pH może powodować uszkodzenia naturalnej bariery ochronnej naskórka oraz podrażnienie skóry. Ponadto, preparaty alkalinizujące powierzchnię naskórka (np. mydła) powodują uszkodzenie naturalnej mikroflory bakteryjnej naskórka, tym samym zwiększając ryzyko chorób skóry wywołanych przez wzmożone namnażanie się drobnoustrojów chorobotwórczych. W nawiązaniu do źródeł literaturowych [124], bakteria



Propionibacterium acnes (będąca głównym czynnikiem etiologicznym trądziku młodzieńczego) jest naturalnym składnikiem mikroflory skóry człowieka. Wzrost pH na powierzchni skóry stymuluje namnażanie się komórek bakteryjnych *P. acnes* powodując powstawanie niepożądanych zmian skórnych [125].

5.3. Badanie lepkości

Lepkość substancji jest definiowana jako właściwość substancji płynnych oraz plastycznych ciał stałych charakteryzująca ich tarcie wewnętrzne, będące skutkiem przesuwania się względem siebie warstw płynu podczas przepływu. Lepkości nie należy mylić natomiast z oporem przeciw płynięciu powstającym na granicy płynu i ścianek naczynia. Lepkość to bardzo istotny parametr formulacji kosmetycznych i farmaceutycznych, ponieważ to od niej zależy smarowność preparatów oraz kinetyka dyfuzji substancji aktywnych z badanej formulacji w głąb skóry [126]. Pomiar lepkości wykonuje się z wykorzystaniem wiskozymetrów, zwanych również lepkościomierzami. Spośród dostępnych na rynku lepkościomierzy wyróżnia się lepkościomierze kapilarne, kulkowe oraz najczęściej stosowane lepkościomierze rotacyjne. Ocena lepkości z wykorzystaniem wiskozymetru rotacyjnego polega na pomiarze oporu lepkościowego na kręcącym się wrzecionie, umieszczonym w badanym preparacie. Rotacja wrzeciona powoduje ścinanie się próbki. Miarą lepkości formulacji jest prędkość obrotowa wrzeciona ustalająca się po przyłożeniu określonego momentu obrotowego [127].

5.4. Badanie stabilności emulsji

Stabilność preparatu kosmetycznego to jeden z kluczowych parametrów decydujących o możliwości jego wprowadzenia na rynek kosmetyczny. Podstawową metodą oceny stabilności formulacji są testy wirówkowe prowadzone bezpośrednio po przygotowaniu i po odpowiednim czasie. Złożone metody analizy stabilności kosmetyków wykorzystują m.in. zjawisko wielokrotnego rozpraszania światła oraz dyfrakcję laserową. Określenie wpływu warunków otoczenia na stabilność preparatów jest możliwa dzięki ich przechowywaniu w komorach klimatycznych (zgodnie z [128] oraz [129]).

5.4.1. Testy wirówkowe

Jedną z podstawowych metod oceny stabilności produktu kosmetycznego są testy wirówkowe wykorzystujące działanie siły odśrodkowej. Badanie polega na umieszczeniu fiołki typu Eppendorf wypełnionej analizowanym preparatem w wirówce. Wskutek obrotów niestabilne preparaty ulegają rozwarstwieniu na tworzące je fazy. Testy wirówkowe mogą być łączone z testami temperaturowymi. W tym celu należy wykorzystać wirówki z możliwością regulacji temperatury [130,131].

5.4.2. Badanie stabilności z wykorzystaniem komór klimatycznych

Komory klimatyczne (KK) pozwalają na wytworzenie oraz monitorowanie warunków otoczenia (temperatura, wilgotność, promieniowanie UV) w ustalonych zakresach i w określonej jednostce czasu. Większość KK dostępnych na rynku cechuje szeroki zakres temperatury (0-70°C) oraz wilgotności (10-80%). Komory klimatyczne są wykorzystywane do badania wpływu wyżej wspomnianych parametrów na stabilność m.in. preparatów kosmetycznych. Możliwość regulacji wartości wyżej wspomnianych parametrów umożliwia precyzyjną ocenę ich wpływu na procesy starzenia się badanych produktów. Przechowywanie preparatu w podwyższonej temperaturze oraz wilgotności powietrza umożliwia przeprowadzenie przyspieszonych testów starzenia, znacznie skracających czas analizy stabilności. Zależność szybkości starzenia preparatów w wysokiej temperaturze jest opisywane prawem Arrheniusa, zgodnie z którym wzrost temperatury o 10°C podwaja

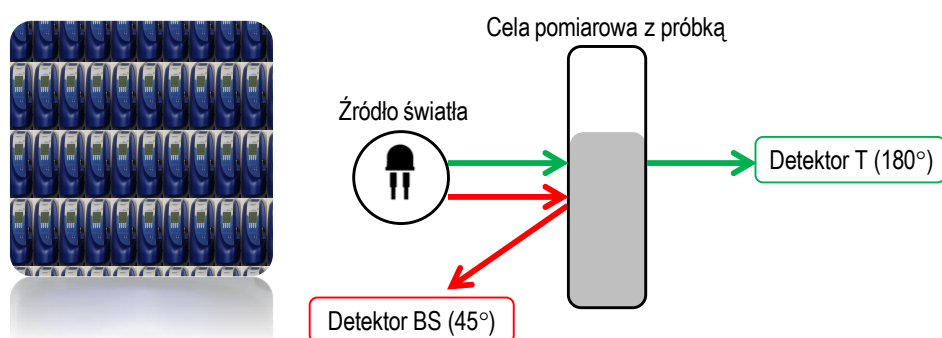


szybkość reakcji. Wnioskować można zatem, że stabilność preparatów przechowywanych w temperaturze 40°C przez okres 3 miesięcy odpowiada ich stabilności po okresie 12 miesięcy przechowywania w temperaturze 20°C [132]. Wyposażenie KK w lampy UV daje dodatkową możliwość kontrolowanej ekspozycji preparatu na działanie promieni ultrafioletowych i umożliwia badanie jego fotodegradacji. Preparaty przechowywane w KK mogą być dodatkowo analizowane pod kątem stabilności z wykorzystaniem przedstawionych w podrozdziale 5.4.3, zaawansowanych metod analizy instrumentalnej [133,134].

5.4.3. Badanie stabilności z wykorzystaniem metody wielokrotnego rozpraszania światła

Do analizy stabilności formulacji kosmetycznych wykorzystuje się także zjawisko wielokrotnego rozpraszania światła (*ang.* multiple light scattering, MLS). Jak już wcześniej wspomniano (paragraf 4.1) emulsje mają charakter układów dyspersyjnych, których stabilność maleje w czasie wskutek występowania różnorodnych mechanizmów fizykochemicznych. Zarówno odwracalne (śmietanie, sedymentacja), częściowo odwracalne (flokulacja), jak i nieodwracalne (koalescencja) rodzaje niestabilności emulsji nie są widoczne dla ludzkiego oka. Wykorzystanie zjawiska MLS umożliwia detekcję wszystkich rodzajów niestabilności próbki we wczesnej fazie procesu jej destabilizacji [135].

Aparatem wykorzystującym zjawisko MLS do analizy stabilności formulacji jest Turbiscan Lab Expert (Formulation SA, L'Union, Francja) (rys. 14). Źródłem światła w urządzeniu Turbiscan jest dioda elektroluminescencyjna emitująca światło z zakresu bliskiej podczerwieni o długości fali $\lambda=880$ nm. Urządzenie to jest również wyposażone w dwa zsynchronizowane detektory, które odbierają światło wstecznie rozproszone przez próbkę (*ang.* backscattering, BS), padające pod kątem 45° od wiązki światła emitowanej przez źródło, jak również światło przechodzące przez próbkę (*ang.* transmission, T), padające pod kątem 180° od źródła światła (rys. 14). Detekcja promieniowania, które uległo transmisji bądź też wstecznemu rozproszeniu, umożliwia identyfikację oraz analizę ilościową procesu destabilizacji badanej formulacji. Wybór analizowanego parametru zależy od rodzaju badanej próbki. Dla próbek nieprzezroczystych analizowanym parametrem jest wsteczne rozpraszanie światła, natomiast stabilność próbek przezroczystych i mętnych jest oceniana w oparciu o analizę transmisji światła [136].



Rys. 14. Budowa oraz zasada działania aparatu Turbiscan Lab Expert.

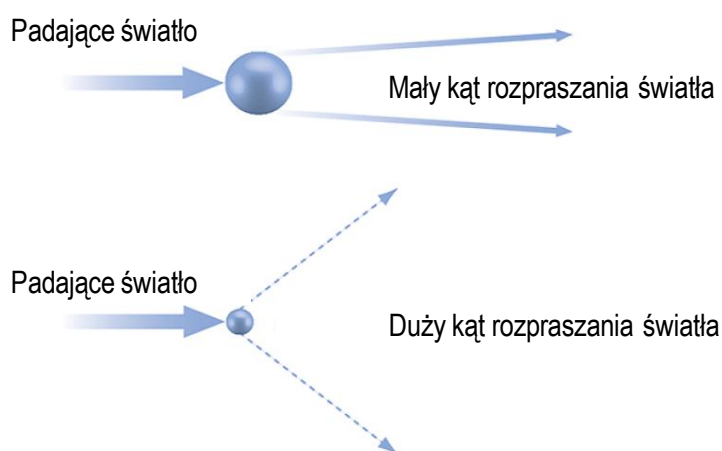
Turbiscan Lab Expert to urządzenie, które może pracować w trybie skanowania oraz trybie jednopozycyjnym. W trybie skanowania głowica optyczna aparatu skanuje całą wysokość próbki (do 55 mm) zbierając światło transmisyjne i wstecznie rozproszone co 40 μm . Wzorzec stanowi zawiesina kuleczek monodispersyjnych w oleju silikonowym [137,138].



5.5. Badanie rozkładu wielkości cząstek formulacji z wykorzystaniem techniki dyfrakcji laserowej

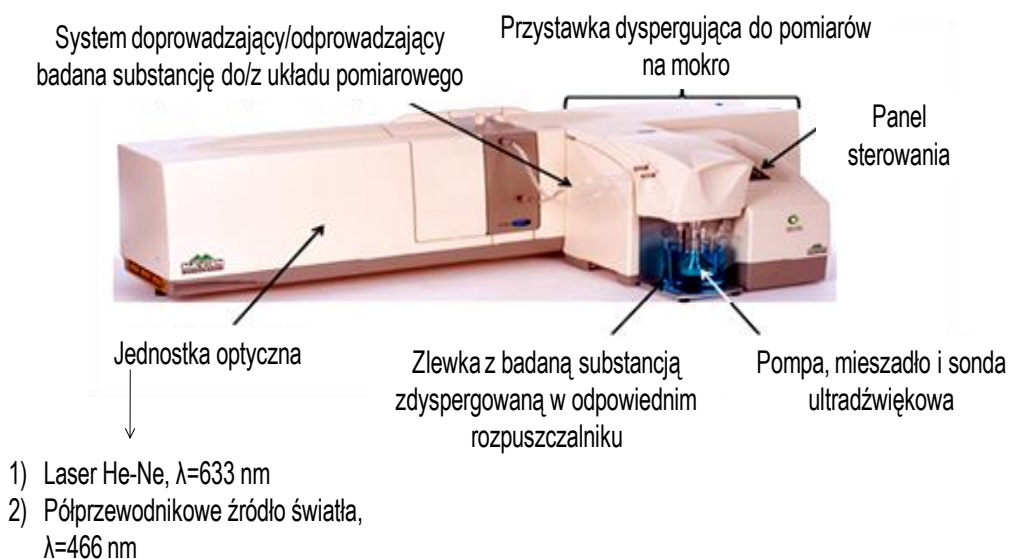
Jak wspomniano w paragrafie 4.2, flokulacja i koalescencja to rodzaje niestabilności formulacji związane ze zmianą wielkości cząstek fazy rozproszonej emulsji. Obserwacja zmian w rozkładzie wielkości cząstek emulsji (*ang.* particle size distribution, PSD) w czasie ma więc duże znaczenie w detekcji procesów destabilizacji formulacji. Do analizy parametru PSD formulacji kosmetycznych wykorzystuje się zjawisko dyfrakcji laserowej (*ang.* laser diffraction, LD) [139].

Aparatem wykonującym pomiary PSD w oparciu o zjawisko LD jest analizator wielkości cząstek Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Wielka Brytania). Aparat ten jest zbudowany z jednostki optycznej, w której znajduje się jednoobiektywowy analizator optyczny. Źródłem światła w analizatorze optycznym jest laser He-Ne, emitujący wiązkę światła czerwonego o długości fali $\lambda=633$ nm. Oprócz lasera He-Ne zastosowano także półprzewodnikowe źródło światła niebieskiego ($\lambda=466$ nm) w celu poszerzenia zakresu pomiarowego (od 0,02 do 1000 μm). Wiązka światła emitowanego przez źródło ulega dyfrakcji na powierzchni cząstek zgodnie z teorią rozpraszania Mie. Teoria ta opisuje model rozpraszania elastycznego pola elektromagnetycznego na powierzchni jednorodnej, kulistej cząstki zgodnie z międzynarodową normą dotyczącą dyfrakcji laserowej [140], zwłaszcza, gdy mierzone cząstki są mniejsze niż 50 μm . Zgodnie z założeniem tej teorii, każdy rozmiar cząstek prezentuje unikatowy, charakterystyczny wzór rozpraszania światła, bowiem kąt rozpraszania wiązki promieniowania przez cząstki emulsji jest odwrotnie proporcjonalny do rozmiaru tej cząstki (rys. 15). Rozproszone światło jest następnie kierowane w stronę układu detektorów [141,142].



Rys. 15. Schemat zależności kąta rozpraszania światła od wielkości cząstek (zaadaptowano z [143]).

Analizator wielkości cząstek Mastersizer 2000 jest wyposażony w przystawkę półautomatyczną, która służy do pomiarów wszystkich materiałów o dużej gęstości i/lub polidispersyjnym rozkładzie. Elementem przystawki jest mieszadło, które umożliwia dyspergowanie badanej substancji w wybranym rozpuszczalniku. Zintegrowana z mieszadłem sonda ultradźwiękowa służy do rozbijania powstałych aglomeratów cząstek. Aparat jest także wyposażony w pompę ułatwiającą przepływ zdyspergowanej próbki do układu pomiarowego. Mechanizm podnoszący zintegrowane mieszadło, sondę ultradźwiękową oraz głowicę pompy ułatwia wymianę cieczy dyspergującej oraz czyszczenie układu (rys. 16).



Rys. 16. Analizator wielkości cząstek Mastersizer 2000.

5.6. Badanie stabilności termicznej z wykorzystaniem analizy termograwimetrycznej

Stabilność termiczna preparatu kosmetycznego to parametr, który odgrywa istotną rolę przy doborze warunków przechowywania gotowych produktów. W celu oceny stabilności termicznej kosmetyków wykorzystuje się analizę termograwimetryczną (*ang.* thermogravimetric analysis, TGA). Badana próbka poddana analizie TGA ulega przemianom fizycznym lub chemicznym. Analiza TGA polega na ocenie zmiany masy próbki w funkcji temperatury lub w stałej temperaturze w funkcji czasu [144]. Zmiany w masie próbki są rejestrowane za pomocą wagi termograwimetrycznej (termowagi) [145]. W przypadku formulacji kosmetycznych masa próbki ulega zmniejszeniu w trakcie trwania analizy prowadzonej w przepływie powietrza. Jest to związane z utratą wody oraz składników lotnych kosmetyku wskutek wzrostu temperatury otoczenia próbki. Dalsze przechowywanie próbki w wysokiej temperaturze powoduje spalanie pozostałych składników preparatu (m.in. komponentów fazy tłuszczowej), co prowadzi do całkowitego spopielenia próbki [146]. Analiza termograwimetryczna może być wykorzystywana w przemyśle kosmetycznym do badania wpływu addycji poszczególnych składników aktywnych na stabilność termiczną bazy kosmetyku.



6. Substancje aktywne stosowane w kosmetyce

W świetle ustawy z dnia 30 marca 2001 o kosmetykach, "kosmetykiem jest każda substancja przeznaczona do zewnętrznego kontaktu z ciałem człowieka: skórą, (...), którego wyłącznym lub podstawowym celem jest utrzymanie ich w czystości, pielęgnowanie, ochrona, perfumowanie, zmiana wyglądu ciała (...)." [147]. W celu nadania kosmetykowi pożądanego i ukierunkowanego działania pielęgnacyjnego do podłoża kosmetycznego (tak zwanej „bazy kosmetycznej”) dodaje się wybrane składniki (substancje) aktywne. Kosmetyczne substancje aktywne są definiowane jako substancje pochodzenia naturalnego lub syntetycznego, które wykazują określone działanie na fizjologię oraz/lub funkcje skóry [148]. W przemyśle kosmetycznym istnieje wiele związków chemicznych, które mogą pełnić rolę aktywnych składników preparatów przeznaczonych do pielęgnacji skóry.

W tabeli 2 przedstawiono klasyfikację substancji aktywnych ze względu na ich działanie pielęgnacyjne wraz z przykładami.

Tabela 2. Klasyfikacja oraz przykłady wybranych kosmetycznych substancji aktywnych.

DZIAŁANIE PIELĘGNACYJNE	PRZYKŁADOWE SUBSTANCJE	WYBRANE ŹRÓDŁA LITERATUROWE
Substancje nawilżające	kwasy hialuronowy	149, 150
	gliceryna	151, 152
Substancje przeciwzapalne	pantenol	153, 154
	azulen	155, 156
Substancje antybakteryjne	kwasy salicylowy	157, 158
	tlenek cynku (II)	159, 160
Substancje złuszczone	kwasy glikolowy	161, 162
	kwasy azelainowy	163, 164
Substancje rozjaśniające przebarwienia	witamina C	165, 166
	arbutyna	167, 168
Substancje redukujące zmarszczki	kwasy tetrahydrojasmonowy	169, 170
	niskocząsteczkowe peptydy (transportujące, sygnałowe, rozkurczające)	171, 172, 173
Substancje przeciwutleniające	witamina E	174, 175
	likopen	176, 177



7. Charakterystyka fizykochemiczna substancji aktywnych stosowanych w kosmetyce

Przed wprowadzeniem substancji aktywnej do preparatu kosmetycznego należy przeprowadzić analizę jej stabilności oraz kompatybilności z danym podłożem. W celu oceny stabilności substancji czynnych wykorzystuje się m.in. metody chromatograficzne. Ocena kompatybilności składników kosmetyku jest z kolei możliwa m.in. dzięki skaningowej kalorymetrii różnicowej. Większość kosmetycznych substancji aktywnych stanowią związki organiczne, do analizy których wykorzystuje się również metody spektroskopowe. Poniżej przedstawiono wybrane metody analityczne stosowane w analizie chemicznej preparatów kosmetycznych.

7.1. Analiza struktury związku z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni

W celu analizy struktury badanych substancji aktywnych wykorzystuje się spektroskopię w średniej podczerwieni (*ang.* mid infrared, MIR) oraz spektroskopię w bliskiej podczerwieni (*ang.* near infrared, NIR). Analiza związków z wykorzystaniem promieniowania podczerwonego bazuje na zjawisku jego absorpcji przez oscylujące cząsteczki i pozwala na identyfikację charakterystycznych grup funkcyjnych cząsteczek, jak i ich oddziaływania z otoczeniem [178]. Istnieje kilka różnic pomiędzy spektroskopią MIR oraz NIR. Pierwszą z nich jest zakres widma. Analiza NIR wykorzystuje promieniowanie w zakresie 10000-4000 cm^{-1} , podczas gdy analiza MIR - promieniowanie w zakresie 4000-650 cm^{-1} . Ponadto, spektroskopia w zakresie NIR dostarcza informacji na temat właściwości fizykochemicznych oraz stanu fizycznego badanej próbki, natomiast spektroskopia w zakresie MIR jest wykorzystywana do analizy charakterystycznych grup funkcyjnych analizowanego związku (tzw. analiza tożsamościowa) [179,180]. W związku z powyższym, spektroskopia NIR może być wykorzystywana w przemyśle kosmetycznym oraz farmaceutycznym do analizy homogeniczności oraz wielkości cząstek formułacji, jak również oznaczania poziomu zawartości wody w próbce [181].

W analizie produktów kosmetycznych oraz farmaceutycznych najczęściej wykorzystywaną metodą jest spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (*ang.* Fourier-transform infrared, FTIR). W porównaniu z tradycyjną spektroskopią w podczerwieni, w metodzie fourierowskiej nie wykorzystuje się monochromatora pozwalającego na wybór określonej długości fali. Spektroskopia FTIR polega na prześwietleniu próbki wiązką promieniowania z całego badanego zakresu podczerwieni. Po przejściu tej wiązki przez próbkę następuje jej interferencja z wiązką pochodzącą z tego samego źródła, która wcześniej nie przeszła przez próbkę. Dzięki analizie fourierowskiej otrzymana zależność natężenia promieniowania od różnicy dróg optycznych wiązek promieniowania (widmo interferencyjne) zostaje przekształcona cyfrowo z zastosowaniem transformację Fouriera w widmo prezentujące zależności natężenia promieniowania od długości fali [182].

7.2. Potwierdzenie teoretycznej masy cząsteczkowej związku za pomocą spektrometrii mas ESI-MS

W celu potwierdzenia teoretycznej masy cząsteczkowej analizowanych związków wykorzystuje się spektrometrię mas (*ang.* mass spectrometry, MS). W zależności od rodzaju badanego związku stosuje się różne metody jonizacji próbki. Jedną z nich jest jonizacja przez elektrozrospylenie (*ang.* electrospray ionization, ESI) polegająca na rozpylaniu roztworu badanej substancji z igły, do której przyłożono wysokie napięcie (zazwyczaj rzędu 1-5 kV). ESI zwykle nie powoduje fragmentacji badanych cząsteczek, w związku z czym jest często stosowana w badaniach biomolekuł [183,184]. Jonizację próbki przeprowadza się w komorze jonizacyjnej spektrometru mas. Podstawą spektrometrii mas jest pomiar stosunku masy do ładunku elektrycznego (m/z) danego jonu pseudomolekularnego lub molekularnego. Jon pseudomolekularny powstaje w wyniku przyłączenia prostego jonu (najczęściej H^+ , K^+ , Na^+) do cząsteczki analizowanego związku, bądź też jej deprotonowania. Jon molekularny

natomiast powstaje w wyniku oderwania (rzadziej przyłączenia) elektronu, a jego masa jest równa masie badanego związku [185].

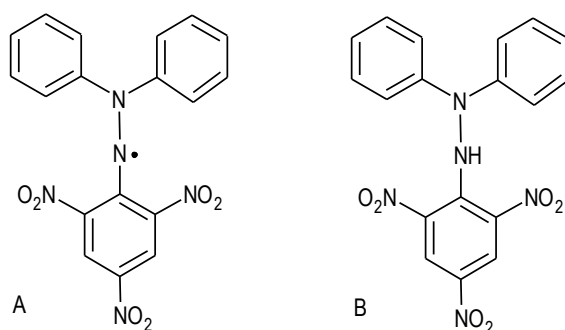
7.3. Potwierdzenie teoretycznej struktury związku za pomocą spektroskopii NMR

W celu potwierdzenia teoretycznej struktury związku wykorzystuje się spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (*ang.* nuclear magnetic resonance, NMR). Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego jest oparte na oddziaływaniu pomiędzy zewnętrznym polem magnetycznym a dipolem magnetycznym jądra. Spektrometry NMR są wyposażone w nadprzewodzące magnesy o określonej wartości pola magnetycznego (wytwarzające tzw. „zewnętrzne pole magnetyczne”). Metoda analizy związków z wykorzystaniem spektroskopii NMR polega na wzbudzeniu spinów jądrowych znajdujących się w zewnętrznym polu magnetycznym wskutek szybkich zmian pola magnetycznego. Na skutek powrotu układu spinów jądrowych do stanu równowagi termodynamicznej (relaksacji) powstaje promieniowanie elektromagnetyczne, które jest następnie rejestrowane przez detektor [186,187].

7.4. Badanie zdolności antyoksydacyjnej związku przy użyciu syntetycznego rodnika DPPH•

Reaktywne formy tlenu odgrywają istotną rolę w metabolizmie i starzeniu się organizmów żywych. Skóra to organ ludzki, który jest najbardziej narażony na oddziaływanie ROS (podrozdział 3.1.2). W związku z powyższym preparaty kosmetyczne aplikowane na skórę powinny zawierać w swoim składzie substancje aktywne o działaniu przeciwrodnikowym [188]. Istnieje wiele metod umożliwiających ocenę aktywności antyoksydacyjnej związków chemicznych. Ze względu na mechanizm reakcji pomiędzy oksydantem oraz antyoksydantem wyróżnia się metodę HAT (*ang.* hydrogen atom transfer) oraz metodę SET (*ang.* single electron transfer). Mechanizm reakcji w metodzie HAT polega na transferze pojedynczego atomu wodoru, natomiast w metodzie SET - na transferze pojedynczego elektronu pomiędzy reagentami [189]. Analiza aktywności antyoksydacyjnej związku metodą SET polega na pomiarze zmian wartości absorbancji roztworu oksydanta wskutek redukcji jego cząsteczki elektronami pochodzącymi z cząsteczki antyoksydanta. Zmiana wartości absorbancji roztworu utleniacza w funkcji stężenia przeciwutleniacza w próbce ma charakter liniowy [190].

Jedną z częściej wykorzystywanych metod SET jest tzw. „metoda rodnika DPPH•. Metoda ta wykorzystuje rodnik 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH•) posiadający niesparowany elektron na powłoce walencyjnej jednego z atomów azotu tworzących mostek azotowy. Oznaczanie metodą rodnika DPPH• (rys. 17A) polega na jego reakcji z badaną substancją, wskutek czego powstaje zredukowana forma rodnikowa (rys. 17B). Jako skutek wygaszania rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu przez substancje wykazujące zdolności antyoksydacyjne, obserwuje się stopniowe zanikanie fioletowej barwy alkoholowego roztworu DPPH•. Potencjał antyoksydacyjny substancji w oparciu o metodę z wykorzystaniem rodnika DPPH• może więc zostać oznaczony ilościowo z wykorzystaniem spektrofotometrii w całym zakresie światła widzialnego oraz bliskim nadfiolecie (*ang.* ultraviolet-visible, UV-Vis) [191,192].



Rys. 17. Wolny rodnik DPPH• (A) oraz jego zredukowana forma (B).



7.5. Badanie kompatybilności komponentów formulacji z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej

Kompatybilność komponentów formulacji kosmetycznych jest kluczowym parametrem podczas ustalania ich składu. Krystaliczna substancja aktywna (SA), będąca komponentem określonej formulacji, powinna cechować się dobrą rozpuszczalnością w określonej fazie. W przypadku emulsji lipofilową SA należy dodawać do fazy tłuszczowej, natomiast substancje o charakterze hydrofilowym - do fazy wodnej emulsji przed zmieszaniem obu jej faz. Większość emulsji kosmetycznych jest przygotowywana poprzez ogrzanie obu faz do wysokiej temperatury (70 ± 5 °C), a następnie ich zmieszanie. Ogrzewanie fazy emulsji po dodaniu do niej substancji aktywnej może być stosowane jedynie dla stabilnych termicznie związków. Natomiast termolabilną SA dodaje się do gotowej, niegorącej formulacji kosmetycznej, w związku z czym powinna się ona cechować dobrą rozpuszczalnością w przygotowanym podłożu kosmetycznym [101]. Dla podłoża w postaci żelu, krystaliczna substancja aktywna powinna być dobrze rozpuszczalna w rozpuszczalniku wykorzystywanym do produkcji bazy, bądź też, jak w przypadku termolabilnej SA, w gotowym podłożu kosmetycznym [193].

W celu określenia kompatybilności substancji aktywnych z bazami formulacji kosmetycznych wykorzystuje się metodę skaningowej kalorymetrii różnicowej (*ang.* differential scanning calorimetry, DSC). Jest to rodzaj analizy termicznej polegający na pomiarze temperatury oraz ciepła przepływu związanych z przemianami termicznymi w badanym materiale [194]. Skaningowa kalorymetria różnicowa jest wykorzystywana do badania charakterystycznych temperatur (topnienia, krystalizacji, przejścia polimorficznego, procesu zeszklenia) oraz wartości energetycznych (entalpie) przemian fazowych, procesów topnienia i krystalizacji badanej próbki zgodnie z międzynarodowym standardem pomiarowym [195]. Metoda DSC może być także wykorzystywana zarówno do badania czystości chemicznej substancji krystalicznych, jak również do badania kompatybilności tych substancji z określonymi formulacjami [196].

7.6. Oznaczanie substancji aktywnych w preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Stabilność substancji aktywnych będących komponentami formulacji stanowi istotny aspekt oceny efektywności działania preparatu kosmetycznego. W celu oznaczania ilościowego oraz jakościowego substancji aktywnych preparatów kosmetycznych wykorzystuje się wysokosprawną chromatografię cieczową (*ang.* high-performance liquid chromatography, HPLC) [197]. Jest to metoda analityczna wykorzystująca różnice w powinowactwie składników rozdzielanej mieszaniny do fazy stacjonarnej (wypełnienia kolumny) oraz fazy ruchomej (eluentu). HPLC różni się od zwykłej chromatografii cieczowej ciśnieniem (nawet powyżej 100 mPa), pod jakim podawany jest eluent na kolumny. Wysokie ciśnienie w układzie wynika między innymi z kapilar o wąskim przekroju, będących elementem składowym pompy [198]. W literaturze istnieje wiele doniesień na temat wykorzystania HPLC w analizie ilościowej oraz jakościowej kosmetycznych substancji aktywnych (tabela 3).

Tabela 3. Przykłady oznaczania wybranych kosmetycznych substancji aktywnych metodą HPLC.

PRZYKŁADOWA SUBSTANCJA AKTYWNA	WYBRANE ŹRÓDŁA LITERATUROWE
witamina C	199, 200
witamina E	199, 132
likopen	201, 202
kwas glikolowy	203, 204
pantenol	205, 206



7.7. Teoretyczne oszacowanie bezpieczeństwa aplikacyjnego substancji aktywnej

Przed przystąpieniem do testów na żywym organizmie należy oszacować potencjalne szkodliwe działanie badanych związków na skórę. W tym celu wykorzystuje się aplikację Toxtree (*ang.* Toxtree - Toxic Hazard Estimation by decision tree approach), która w oparciu o wzór strukturalny związku może oszacować jego potencjalne działanie toksyczne lub korozyjne względem ludzkich tkanek. Analiza z wykorzystaniem Toxtree bazuje na koncepcji tzw. progu zagrożenia toksykologicznego (*ang.* threshold of toxicological concern, TTC), mającej na celu określenie poziomu bezpieczeństwa ekspozycji ludzkich tkanek na określoną substancję chemiczną [207]. Wykorzystanie aplikacji Toxtree do szacowania bezpieczeństwa aplikacji substancji chemicznych jest rekomendowane przez Europejskie Biuro Chemiczne (*ang.* European Chemicals Bureau, ECB) [208].



8. Badanie przenikania substancji aktywnych przez bariery imitujące skórę *in vitro*

Efektywność działania formułacji kosmetycznych zależy m.in. od zdolności penetracji do głębszych warstw naskórka poszczególnych składników aktywnych. Teoretyczna ocena przenikania składników czynnych jest możliwa dzięki badaniu ich uwalniania z formułacji kosmetycznych (*ang.* *in vitro* release test, IVRT) wskutek dyfuzji cząstek substancji aktywnej przez bariery imitujące naskórek ludzki. W tabeli 4 przedstawiono przykłady substancji aktywnych, których uwalnianie z preparatów aplikowanych na skórę zostało zbadane z wykorzystaniem IVRT.

Tabela. 4. Wybrane substancje aktywne, których uwalnianie z preparatów stosowanych na skórę zostało zbadane z wykorzystaniem IVRT.

PRZYKŁADOWA SUBSTANCJA AKTYWNA	WYBRANE ŹRÓDŁA LITERATUROWE
arbutyna	209
kwasy salicylowy	210
witamina C	211
witamina E	212
likopen	213
izotretynoina ¹	214
tetrapeptyd GEKG ²	215
kwasy tetrahydrojasmonowy	170

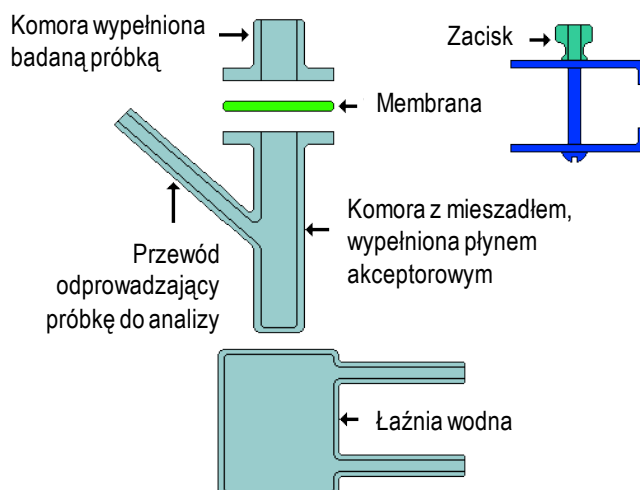
8.1. Aparatury wykorzystywane do badania uwalniania substancji aktywnych *in vitro*

Wybór aparatury do badania uwalniania substancji czynnych *in vitro* jest zależny od rodzaju formy aplikacyjnej tejże substancji. Dla półstałych form aplikacyjnych (np. maści, kremów, żeli) podstawowym aparatem wykorzystywanym do badań uwalniania substancji jest dyfuzyjna komora statyczna (komora Franza) [216]. W badaniach uwalniania *in vitro* wykorzystywane są również aparaty przepływowe oraz łopatkowe. Należy wspomnieć, że każdy element wykorzystywanej aparatury mający bezpośredni kontakt z badaną formacją oraz płynem akceptorowym, powinien być bierny chemicznie [217].

❶ **Komora dyfuzyjna Franza** - aparat zbudowany łaźni wodnej (mającej na celu utrzymanie stałej temperatury układu podczas trwania analizy), jak również komory z mieszadłem magnetycznym, wypełnionej płynem akceptorowym (rys. 18). W trakcie badania płyn akceptorowy jest pobierany do analizy w określonych interwałach czasowych [218]. Badany preparat należy umieścić w górnej części membrany, przez którą zachodzi dyfuzja składników aktywnych do płynu akceptorowego. Membrany dializacyjne stosowane do badań z wykorzystaniem komory Franza mogą zostać zastąpione przez odpowiednio spreparowane wycinki ludzkiej skóry, co pozwala uzyskać lepszą imitację warunków *in vivo* [216].

¹ Stereoizomer kwasu all-trans-retinowego (tretynoiny), stosowany w leczeniu różnych postaci trądziku

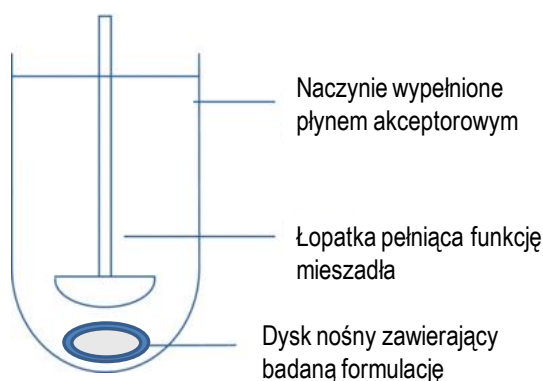
² Peptyd o działaniu spłycającym zmarszczki



Rys. 18. Schemat komory dyfuzyjnej Franza (zaadoptowano z [219]).

❷ **Aparat przepływowy** - aparat zbudowany z komory przepływowej (umieszczonej w łaźni wodnej), pompy oraz zbiornika zawierającego płyn akceptorowy. Po wypełnieniu zbiornika na próbkę badaną formacją, całość należy zabezpieczyć membraną oraz nakrętką, a następnie umieścić w komorze przepływowej. Na dnie komory znajdują się szklane kulki o średnicy 1 mm, zapewniające laminarny przepływ pompowanego płynu akceptorowego. Roztwór zawierający uwolnioną substancję jest pobierany z komory przepływowej do osobnego zbiornika w celu analizy ilościowej. Aparat przepływowy jest rekomendowany do analizy produktów oraz substancji słabo rozpuszczalnych w wybranym płynie akceptorowym [220,221].

❸ **Aparat łopatkowy z dyskiem nośnym** - aparat zbudowany z naczynia szklanego, łopatki oraz dysku nośnego wykonanego ze stali nierdzewnej (rys. 19). Dysk nośny, do wnętrza którego wprowadza się badaną formację, należy umieścić na dnie naczynia wypełnionego płynem akceptorowym. Wskutek ruchu obrotowego łopatki (50 obrotów na minutę), umieszczonej 2,5 cm nad powierzchnią dysku, następuje mieszanie płynu akceptorowego. Aparat łopatkowy z dyskiem nośnym jest polecany do badania uwalniania substancji czynnej z preparatów słabo rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych w wybranym płynie akceptorowym, w związku z czym zastosowanie membran dializacyjnych nie jest konieczne [222,223].



Rys. 19. Schemat aparatu łopatkowego z dyskiem nośnym (zaadoptowano z [224]).

❹ **Aparat łopatkowy z komorą ekstrakcyjną (typu VanKel)** - aparat zbudowany z ośmiu szklanych naczyń, mieszadeł łopatkowych oraz teflonowych komór ekstrakcyjnych.

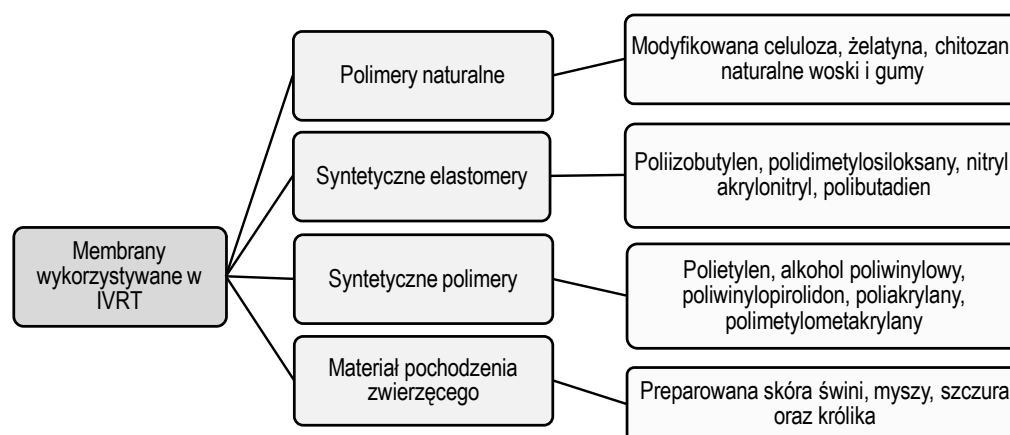
Próbki do analizy przygotowuje się poprzez wypełnienie komór ekstrakcyjnych badanym preparatem, zabezpieczenie preparatu membraną dializacyjną, pierścieniem typu O-ring oraz nakrętką. Następnie należy umieścić komorę ekstrakcyjną na dnie naczynia wypełnionego roztworem akceptorowym oraz uruchomić mieszadła obrotowe umieszczone nad powierzchnią próbki. Standardowy aparat łożatkowy połączony z jest ze spektrofotometrem UV-Vis [225,226].

⑤ **Pionowa komora dyfuzyjna VDC** - komora wykonana z pleksglasu powstała w wyniku modyfikacji aparatu dyfuzyjnego Franza. Pionowa komora dyfuzyjna jest zbudowana ze zbiornika z płynem akceptorowym, zbiornika z próbką oraz szklanego mieszadła. W przeciwieństwie do komory Franza badany preparat należy umieścić pod membraną dializacyjną [227,228].

⑥ **Komora z wirującym cylindrem** - komora dyfuzyjna wyposażona w rotujący cylinder wykonany ze stali nierdzewnej. Po wypełnieniu komory płynem akceptorowym należy umieścić w niej cylinder zawierający badany preparat. Aparat ten jest polecany do badania formułacji nierozpuszczalnych w wybranym płynie akceptorowym, dzięki czemu użycie membrany dializacyjnej nie jest konieczne [222].

8.1.1. Membrany imitujące bariery skórne

Uwalnianie substancji aktywnej z badanej formułacji zależy w dużej mierze od grubości i porowatości membrany. Membrana oddziela badany preparat od medium i chroni przed przedostawaniem się substancji wielkocząsteczkowych do płynu akceptorowego. Dodatkowym zadaniem membrany jest utrzymanie formułacji kosmetycznej na miejscu w ciągu trwania całego procesu uwalniania. Błona dializacyjna imitująca skórę powinna być cienka i wysoce porowata. Powinna być także bierna chemicznie względem badanej emulsji oraz płynu akceptorowego [222]. Membrany wykorzystywane w badaniach uwalniania substancji aktywnych z formułacji kosmetycznych oraz farmaceutycznych można klasyfikować ze względu na materiał, z jakiego zostały wykonane (rys. 20).



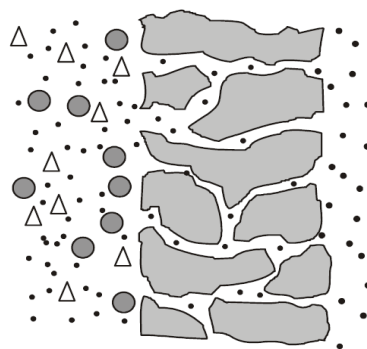
Rys. 20. Klasyfikacja oraz przykłady membran wykorzystywanych w IVRT [222,229].

Najpopularniejsze i najczęściej stosowane są błony utworzone z polimerów naturalnych (azotan celulozy, octan celulozy oraz regenerowana celuloza) oraz polimerów syntetycznych (polietylen, polichlorek winylu) [222]. W badaniach IVRT wykorzystuje się również preparowaną skórę zwierzęcą (świni, królika, szczura) [229,230], jednakże syntetyczne membrany cechują się komercyjną dostępnością, jednorodnością oraz łatwością użycia. W tabeli 5 przedstawiono przykłady oraz parametry fizykochemiczne wybranych membran stosowanych w badaniach uwalniania substancji aktywnych *in vitro*.

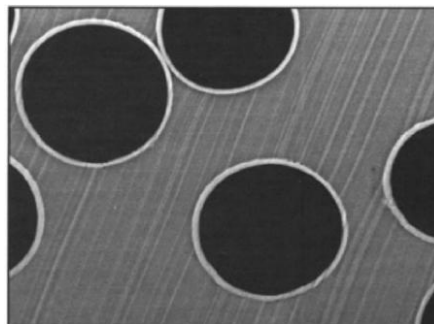
Tabela 5. Przykłady oraz parametry fizykochemiczne wybranych membran stosowanych w badaniach uwalniania substancji aktywnych *in vitro* [222, 231, 232, 233].

MEMBRANA	POLIMER	GRUBOŚĆ (μm)	WIELKOŚĆ PORÓW (μm)
Membrany z polimerów naturalnych			
Cuprophane	Regenerowana celuloza	7-17	0,45; 0,50
Visking	Regenerowana celuloza	0,02-0,12	0,0024
Octan celulozy	Octan celulozy	115-140	0,20 - 5,00
Azotan celulozy	Azotan celulozy	105-140	0,025; 0,1; 0,2; 0,45; 0,65; 0,8; 1,0; 1,2; 3,0; 5,0; 8,0; 12,0
Membrany z polimerów syntetycznych			
AN 69	Poliakrylonitryl	20-55	0,45
Biodyne	Poliamid	-	0,2; 0,8
Nylon		50	0,2; 0,45; 0,8; 1,0
Tuffryn	Polisulfon	152	0,2
		145	0,45
Nuclepore	Poliwęglan	7-20	0,1; 0,2; 0,4;
Cyclopore			0,01 - 0,10
Folioxane C6	Silikon	-	-
Celgard 3500	Polipropylen	25	0,064
Silicon	Polidimetylosiloksan	-	-

Najważniejsze parametry fizykochemiczne charakteryzujące membranę to jej grubość, wielkość porów oraz graniczna masa molowa (*ang.* molecular weight cut-off, MWCO), określająca najmniejszą masę cząsteczkową substancji zatrzymywanej przez membranę przy określonym współczynniku retencji (wynoszącym przeważnie 0,9). Można stwierdzić więc, że parametr MWCO wyznacza selektywność membrany [234] (rys 21).

**Rys. 21.** Schemat selektywności membrany (zaadaptowano z [235]).

Na rys. 22 przedstawiono obraz mikroskopowy membrany Cuprophane, potwierdzający jej porowatość i homogeniczną strukturę. Wartość parametru MWCO membrany Cuprophane wynosi 7-17 kDa.



Rys. 22. Obraz membrany Cuprophan uzyskany metodą elektronicznej mikroskopii skaningowej w 250-krotnym powiększeniu (zaadaptowano z [236]).

8.1.2. Mechanizm przenikania substancji aktywnej przez naturalne oraz syntetyczne membrany

W przypadku membran porowatych wykorzystywanych w badaniach uwalniania *in vitro*, przenikanie substancji aktywnych z badanego preparatu do roztworu akceptorowego zachodzi na drodze dyfuzji, zgodnej z gradientem stężeń oraz selektywnością membrany. Zjawisko dyfuzji pojawia się wówczas, gdy badana substancja aktywna oraz płyn akceptorowy mają ze sobą kontakt na granicy, którą stanowi półprzepuszczalna membrana [237]. W trakcie procesu dyfuzji cząsteczki substancji aktywnej przechodzą przez pory membrany z części donorowej (forma aplikacyjna zawierająca badaną substancję) do części akceptorowej (płyn akceptorowy) zgodnie z gradientem stężeń, do momentu osiągnięcia stanu równowagi stężeń po obu stronach membrany [238]. Współczynnik dyfuzji substancji przez półprzepuszczalną membranę może zostać zmierzony z wykorzystaniem metod kinetycznych pod warunkiem, że stężenia tejże substancji w części donorowej i akceptorowej są znane.

Pierwsze i drugie prawo Ficka może być wykorzystywane do określenia współczynnika dyfuzji pod warunkiem, że w układzie, w którym zachodzi dyfuzja, membrana stanowi czynnik kontrolujący szybkość dyfuzji substancji czynnej [222]. Według pierwszego prawa Ficka dyfuzja cząsteczek jest definiowana jako transfer materii (masy) przez jednostkowy przekrój bariery (membrany) w jednostce czasu i jest określana jako strumień dyfuzji cząstek [239]. Pierwsze prawo Ficka jest wyrażane równaniem (2):

$$J = 0,5 \frac{dM}{Sdt}, \quad (2)$$

gdzie:

J - strumień dyfuzji cząstek ($\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{s}$),

dM - zmiana masy (g),

S - jednostkowy przekrój bariery (cm^2),

dt - jednostka czasu, w której zachodzi proces (s).

Istnieje bezpośrednia zależność pomiędzy strumieniem dyfuzji a gradientem stężeń, wyrażona za pomocą równania (3):

$$J = -D \frac{dC}{dx}, \quad (3)$$

gdzie:

D - współczynnik dyfuzji substancji aktywnej (cm^2/s),

dC - zmiana stężenia dyfundującej substancji,

dx - jednostka odległości, na jaką zachodzi dyfuzja (cm).



Z kolei drugie prawo Ficka, zwane także równaniem dyfuzji, określa szybkość zmian stężenia w dowolnym punkcie układu przestrzennego (xyz). Prawo to zakłada, że zmiana stężenia substancji aktywnej w dowolnym punkcie układu i w danej jednostce czasu jest proporcjonalne do zmiany gradientu stężeń w tejże jednostce czasu [240].

Drugie prawo Ficka jest wyrażane równaniem (4):

$$\frac{dC}{dt} = D \left[\frac{d^2C}{dx^2} + \frac{d^2C}{dy^2} + \frac{d^2C}{dz^2} \right], \quad (4)$$

gdzie:

x, y, z - osie opisujące przestrzenny układ współrzędnych.

8.1.3. Czynniki wpływające na przenikanie substancji aktywnej przez membrany

Jak już wspomniano rozmiar cząsteczki substancji aktywnej oraz porów membrany stanowi czynnik determinujący przenikanie tejże cząsteczki przez bariery imitujące naskórek. Ponadto, permeacja transmembranowa substancji aktywnej zależy także od różnicy jej stężeń w części donorowej oraz akceptorowej [241].

8.1.4. Płyn akceptorowy

Płyn akceptorowy, zwany również medium, to ciecz do której następuje transmembranowa dyfuzja substancji aktywnej z badanej formułacji. Przy doborze płynu akceptorowego należy kierować się miarą jego podobieństwa do warunków fizjologicznych (temperatura, wartość pH) skóry. Należy pamiętać, że wartość pH zdrowej skóry mieści się w zakresie 4,5-6,5 [242].

Temperatura medium do badań uwalniania *in vitro* zwykle mieści się w zakresie 32,0-37,0°C. Nie jest zalecane prowadzenie tego typu badań w wyższej temperaturze, ponieważ może to negatywnie wpływać na stabilność samej substancji aktywnej, jak i formułacji ją zawierającej. Wyjątkiem od tej reguły są badania preparatów przeznaczonych do specjalnego użytku (np. kremy oraz maści dopochwowe), których badania *in vitro* są prowadzone w temperaturze 37,0±0,5°C [222]. Chattaraj i Kanfer [243] przeprowadzili analizę wpływu temperatury roztworu akceptorowego na uwalnianie acyklowiru z różnych form aplikacyjnych *in vitro*. Wyniki badań dowiodły, że nawet niewielka zmiana temperatury medium powoduje znaczące zmiany w uwalnianiu substancji aktywnej. Jak powszechnie wiadomo wzrost temperatury powoduje spadek lepkości emulsji oraz maści, co z kolei może powodować wzrost ilości uwalnianej substancji aktywnej i otrzymanie nieprawidłowych wyników analizy [222,243].

Innym ważnym aspektem, który należy rozważyć podczas selekcji medium jest rozpuszczalność badanej substancji czynnej. Dla substancji dobrze rozpuszczalnych w wodzie stosuje się roztwory wodne, natomiast dla substancji trudno rozpuszczalnych w roztworach wodnych należy wybierać roztwory wodno-alkoholowe [222].

8.2. Modele kinetyczne uwalniania substancji aktywnych *in vitro*

Uwalnianie substancji aktywnych z kosmetycznych oraz farmaceutycznych podłoży może zachodzić zgodnie z określonym modelem kinetycznym. Większość zaprezentowanych w literaturze modeli kinetycznych bazuje na prawie dyfuzji Ficka. Do najbardziej powszechnych modeli kinetyki uwalniania substancji aktywnej należą modele kinetyki uwalniania zerowego i pierwszego rzędu, model Higuchiego oraz model Korsmeyera-Peppasa [244].

❶ **Model kinetyki uwalniania zerowego rzędu** - model kinetyczny, zgodnie z którym uwalnianie substancji aktywnej pozostaje na określonym, stałym poziomie w określonej jednostce czasu. Wynika to ze stałej wielkości powierzchni, przez którą zachodzi uwalnianie



badanej substancji. Model zerowego rzędu bazuje na założeniu, że rozmiar cząsteczki uwalnianej substancji jest większy niż rozmiar porów membrany dializacyjnej. Prezentowany model kinetyczny może być wykorzystany do teoretycznej oceny uwalniania substancji trudno rozpuszczalnych w medium, cechujących się dużym rozmiarem cząstek [244]. Jest on wyrażany następującym równaniem (5):

$$Q_t = Q_0 + Kt, \quad (5)$$

gdzie:

Q_t - ilość uwolnionej substancji aktywnej (mg) po czasie t (h),

Q_0 - początkowa ilość substancji czynnej (mg),

K - stała szybkości uwalniania (mg/h).

❷ **Model kinetyki uwalniania pierwszego rzędu** - model kinetyczny, który jest wyrażany następującym równaniem (6):

$$\log Q_t = \log Q_0 - Kt/2,303, \quad (6)$$

gdzie:

Q_t - ilość uwolnionej substancji aktywnej (mg) po czasie t (h),

Q_0 - początkowa ilość substancji czynnej (mg),

K - stała szybkości uwalniania (h^{-1}).

Wyniki uwalniania substancji aktywnej zgodnie z modelem kinetycznym pierwszego rzędu są zaprezentowane w postaci krzywej o nachyleniu $-K/2,303$. Prezentowany model może być wykorzystywany do opisu uwalniania substancji aktywnych rozpuszczalnych w wodzie [244].

❸ **Model Higuchiego** - model kinetyczny powszechnie stosowany do obliczeń szybkości procesu uwalniania substancji aktywnej zgodnie z poniższym równaniem (7):

$$\frac{Q_t}{Q_0} = K_H \times t^{0,5}, \quad (7)$$

gdzie:

Q_t - ilość uwolnionej substancji aktywnej (mg) po czasie t (h)

Q_0 - początkowa ilość substancji czynnej (mg),

K_H - stała Higuchiego ($h^{-1/2}$)

Wykres ilości uwolnionej substancji (obliczany na jednostkę powierzchni membrany, wyrażoną w $\mu g/cm^2$) ma charakter liniowy, a nachylenie prostej charakteryzuje szybkość uwalniania badanej substancji.

❹ **Model Korsmeyera-Peppasa** - model kinetyczny powszechnie stosowany do obliczeń szybkości procesu uwalniania substancji aktywnej zgodnie z poniższym równaniem (8):

$$\frac{Q_t}{Q_0} = K \times t_n, \quad (8)$$

gdzie:

Q_t - ilość uwolnionej substancji aktywnej (mg) po czasie t (h),

Q_0 - początkowa ilość substancji czynnej (mg),

K - stała szybkości uwalniania (h^{-1}),

t - czas (h),

n - wykładnik dyfuzyjny (-).



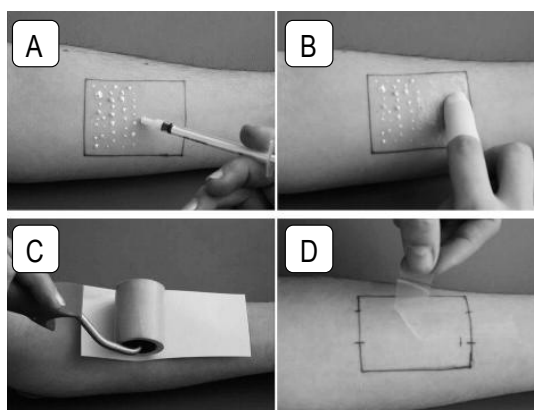
Według modelu Korsmeyera-Peppasa dla $n=0,5$ kinetyka uwalniania substancji czynnej zachodzi zgodnie z kinetyką dyfuzji według prawa Ficka (*ang.* Fickian diffusion), a dla $0,5 < n < 1$ ma charakter anomalny. Wartości wykładnika dyfuzyjnego o wartości równej 1 mechanizm uwalniania substancji zmierza do zerowego rzędu (tzw. przypadek II), natomiast dla $n > 1$ określany jest mianem mechanizmu uwalniania super zerowego rzędu [245].

9. Ocena działania kosmetyków za pomocą testów aplikacyjnych

Teoretyczne oszacowanie bezpieczeństwa aplikacyjnego substancji aktywnej, jak również analiza jej przenikania przez bariery imitujące skórę *in vitro* to badania, które prowadzone są na etapie projektowania preparatu kosmetycznego. Po uzyskaniu zadowalających wyników, a następnie przygotowaniu formułacji należy przeprowadzić testy aplikacyjne, mające na celu ocenę bezpieczeństwa oraz skuteczności działania preparatu *in vivo*.

9.1. Testy biodostępności

Istnieje kilka metod umożliwiających ocenę biodostępności kosmetycznych składników aktywnych. Jedną z nich jest tzw. „test zdzierania” (*ang.* stripping test) polegający na spektralnej analizie ilości substancji aktywnej, przenikającej z aplikowanej formułacji do warstwy rogowej naskórka [246]. *Stripping test* polega na aplikowaniu preparatu (zawierającego dokładnie znaną ilość badanej substancji aktywnej) na skórę (rys. 23A), a następnie usunięciu jego nadmiaru po określonym czasie (rys. 23B). Następnie w miejsce aplikacji zostaje przyklejona taśma adhezyjna (rys. 23C), której zerwanie powoduje usunięcie komórek górnych warstw naskórka wraz z określoną ilością substancji aktywnej (rys. 23D) [247]. Stężenie substancji aktywnej w usuniętej warstwie naskórka jest ustalane w oparciu o pomiar absorbancji roztworu sporządzonego poprzez rozpuszczenie materiału usuniętego z taśmy adhezyjnej w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku.



Rys. 23. Instrukcja przeprowadzania „testu zdzierania” (zaadoptowano z [248]).

9.2. Testy aplikacyjne *in vivo*

Kosmetyki to preparaty przeznaczone do miejscowego stosowania na skórę. W zależności od składu jakościowego i ilościowego kosmetyk wykazuje określone działanie pielęgnacyjne na skórę. Jak już wspomniano, testy *in vitro* uwalniania substancji aktywnych z preparatów kosmetycznych umożliwiają teoretyczną ocenę biodostępności danego składnika. Przed wprowadzeniem gotowego produktu na rynek kosmetyczny należy także ocenić bezpieczeństwo i skuteczność jego działania. W tym celu przeprowadza się badania *in vivo* na skórze ochotników (probandów), stanowiących grupę docelowych konsumentów badanego produktu [249]. Do najczęściej przeprowadzanych testów *in vivo* zalicza się naskórkowe testy płatkowe oraz badania parametrów skóry z wykorzystaniem sond.

❶ **Naskórkowe testy płatkowe (NTP)** - testy wykonywane w diagnostyce kontaktowej alergenicności kosmetyku. NTP wykonuje się na niezmięnionej chorobowo skórze pleców. Potencjalna kontaktowa reakcja alergiczna zachodzi z udziałem limfocytów i ma miejsce po upływie ok. 24 godzin od kontaktu z alergenem. Badany preparat należy umieścić

w komorze i przykleić w miejsce aplikacji za pomocą plastrów. Plastry z badanym preparatem powinny pozostawać w kontakcie ze skórą przez okres 48 godzin. Po upływie tego czasu należy usunąć test z powierzchni skóry i dokonać pierwszego odczytu. Drugi odczyt należy wykonać po upływie doby od chwili usunięcia testu. Wyniki NTP są prezentowane w czterostopniowej skali: brak reakcji (0), rumień (+), rumień i grudki (++) oraz rumień, grudki i pęcherzyki (+++). Za dodatni uznaje się wynik oceniony na przynajmniej (++) [250, 251, 252].

❷ **Badania parametrów skóry z wykorzystaniem sond** - badania mające na celu ocenę skuteczności działania preparatów w oparciu o analizę zmian wartości takich parametrów skóry, jak nawilżenie, elastyczność oraz przeznaskórkowa (transepidermalna) utrata wody. Badanie tychże parametrów przeprowadza się z wykorzystaniem aparatury wyposażonej w sondy do badań dermatologicznych [253].

Badania poziomu przeznaskórkowej utraty wody

W badaniach poziomu TEWL wykorzystuje się tewametr (rys. 24A) wyposażony w czujniki temperatury i wilgotności środowiska badań. Oba wymienione parametry są niezwykle ważne dla pomiaru TEWL, a ich wahania mogą wpływać na jakość uzyskanych wyników. W związku z tym ważne jest, aby prowadzić pomiary zawsze w takich samych warunkach otoczenia (wilgotność 40-60% oraz temperatura powietrza ok. 22°C). Ponadto, w badaniu poziomu TEWL istotny jest czas stabilizacji, czyli czas przebywania probanta w pomieszczeniu, w którym prowadzone są badania, przed ich rozpoczęciem. Czas stabilizacji powinien wynosić co najmniej 30 minut. Wyniki analizy TEWL wyrażane są jako szybkość parowania wody w jednostce czasu z określonej powierzchni skóry [254].

Badania poziomu nawilżenia naskórka

W celu zbadania poziomu nawilżenia naskórka wykorzystuje się korneometr (rys. 24B) mierzący zawartość wody w warstwie rogowej naskórka w oparciu o zmiany przewodnictwa elektrycznego i pojemności elektrycznej na głębokości 10-20 µm naskórka. Im wyższe nawilżenie naskórka, tym lepsza jego przewodność elektryczna. Wyniki badania poziomu nawilżenia skóry podawane są w jednostkach korneometru (CU). Wykazano, że nawilżenie naskórka jest ujemnie skorelowane z parametrem TEWL [254,255].

Badania poziomu elastyczności naskórka

W celu oceny elastyczności skóry wykorzystuje się kutometr (rys. 24C), którego działanie polega na chwilowej, miejscowej deformacji skóry za pomocą wytworzonego przez sondę podciśnienia. Elastyczność skóry jest oceniana w oparciu o szybkość, z jaką zasysana przez sondę skóra wraca do stanu pierwotnego. Ponadto, sonda umożliwia ocenę odporność na odkształcenia skóry (opór skóry względem wytworzonego podciśnienia i zasysania do wewnątrz sondy). Kutometr wyposażony jest w optyczny system pomiarowy złożony ze źródła oraz receptorów światła, a także dwóch pryzmatów ustawionych naprzeciwko siebie. Pryzmaty przekazują światło od transmitera do receptora, a intensywność światła zmienia się w zależności od stopnia zassania skóry przez urządzenie [254].



Rys. 24. Tewametr (A), korneometr (B) oraz kutometr (C) firmy Courage - Khazaka (zadaptowane z [256]).



10. Fitohormony

Rosnąca świadomość konsumentów oraz znajomość bieżących trendów na rynku kosmetycznym skłoniła producentów do całkowitej bądź częściowej substytucji syntetycznych składników kosmetycznych substancjami pochodzenia naturalnego. Przykładem roślinnych substancji aktywnych wykorzystywanych do produkcji preparatów kosmetycznych są fitohormony.

10.1. Definicja i klasyfikacja fitohormonów

Fitohormony, czyli hormony roślinne, są to związki organiczne, które regulują większość przejawów aktywności komórek, jak również procesy wzrostowe i rozwojowe tkanek roślinnych (m.in. odpowiedzi na stropy abiotyczne i biotyczne, organogeneza, reprodukcja, determinacja płci) [257]. Związki te wykazują aktywność biologiczną w niewielkich stężeniach rzędu 10^{-6} mol/L bądź mniejszych. Fitohormony wykazują aktywność w miejscu syntezy lub są transportowane do poszczególnych części rośliny z wykorzystaniem zjawiska dyfuzji transmembranowej oraz białek transportowych. Odpowiedź organu roślinnego na obecność danego fitohormonu może zachodzić już na poziomie komórkowym (np. zmiana w transkrypcji genów, aktywności białek i transporcie jonów). Regulatory niespełniające kryteriów fitohormonów nazywane są substancjami wzrostowymi roślin. W przeciwieństwie do fitohormonów substancje wzrostowe mają zwykle działanie ogólnoustrojowe i wywołują w tkankach roślinnych efekt fizjologiczny w stężeniach przekraczających 10^{-4} mol/L [258,259]. Wśród fitohormonów wymienia się takie grupy związków, jak auksyny, cytokiny, gibereliny, brasinosteroidy, etylen, kwas abscysynowy, jak również strigolaktyny, poliaminy, kwas salicylowy oraz jasmonidy [260]. W tabeli przedstawiono klasyfikację oraz kluczową aktywność biologiczną fitohormonów ze szczególnym uwzględnieniem jasmonidów, będących przedmiotem badań w ramach przedkładanej pracy doktorskiej.

10.2. Interakcje fitohormonów

Poszczególne klasy fitohormonów mogą wykazywać synergizm lub antagonizm aktywności biologicznej. Przykładowo cytokiny stymulują, a auksyny hamują rozgałęzianie pędów. Ponadto, auksyny stymulują, a cytokiny hamują rozgałęzianie korzeni, tak więc działanie cytokin i auksyn jest antagonistyczne. Innym przykładem antagonizmu jest stymulowanie kiełkowania nasion przez gibereliny oraz utrzymywanie nasion w stanie spoczynku przez kwas abscysynowy. Synergiczne działanie fitohormonów z kolei obserwuje się na przykładzie promowania rozwoju owoców partenokarpicznych (nieposiadających żywotnych nasion) oraz stymulowanie wzrostu i wydłużania komórek roślin przez auksyny i gibereliny [261]. Innym przykładem „kooperacji” fitohormonów jest lokalna i systemiczna obrona rośliny przed patogenami przez takie fitohormony, jak jasmonidy oraz kwas salicylowy [262].



Tabela 6. Klasyfikacja oraz aktywność biologiczna fitohormonów, część I.

FITOHORMONY	AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA	WYBRANE ŹRÓDŁA LITERATUROWE
Auksyny	<ol style="list-style-type: none">1 Pobudzenie wzrostu komórek roślin,2 Stymulowanie podziałów komórkowych,3 Regulacja procesów powstawania owoców oraz kształtowania się drewna,4 Indukcja tworzenia się korzeni przybyszowych.	263, 264, 265
Cytokininy	<ol style="list-style-type: none">1 Regulacja szybkości podziałów komórkowych,2 Stymulowanie procesów różnicowania chloroplastów i wzrostu objętości komórek,3 Indukcja procesów różnicowania pędów,4 Stymulowanie transportu metabolitów do organów o wyższej zawartości cytokinin,5 Regulacja procesów starzenia się roślin i kiełkowania nasion.	266, 267, 268, 269
Gibereliny	<ol style="list-style-type: none">1 Stymulowanie trawienia bielma w ziarnach zbóż,2 Zwiększanie plastyczności ścian komórkowych i wzrostu wydłużeniowego pędu,3 Udział w procesie wychodzenia nasion ze stanu spoczynku,4 Udział w procesie rozmnażania i indukcji kwitnienia roślin.	270, 271, 272
Brasinosteroidy	<ol style="list-style-type: none">1 Stymulowanie wzrostu i wydłużania komórek roślin,2 Udział w formowaniu łagiewki pyłkowej,3 Przyspieszanie procesów starzenia się komórek w zamierających hodowlach tkankowych,4 Opóźnianie starzenia w mutantach o obniżonej ilości brassinosteroidów.	273, 274, 275, 276
Etylen	<ol style="list-style-type: none">1 Stymulowanie dojrzewania owoców,2 Przyspieszanie starzenia się roślin (m.in. opadanie liści, wybarwienie kwiatów),3 Zaburzanie reakcji roślin na zmianę ich położenia względem wektora grawitacji.	277, 278, 279
Kwas abscysynowy	<ol style="list-style-type: none">1 Hamowanie procesu fotosyntezy i transbłonowego transportu jonów,2 Hamowanie biosyntezy chlorofilu oraz wzrostu objętościowego komórek,3 Przyspieszanie starzenia się roślin (m.in. opadanie liści, owoców),4 Inhibicja kiełkowania i podtrzymywanie stanu spoczynkowego nasion.	280, 281, 282



Tabela 6. Klasyfikacja oraz aktywność biologiczna fitohormonów, część II.

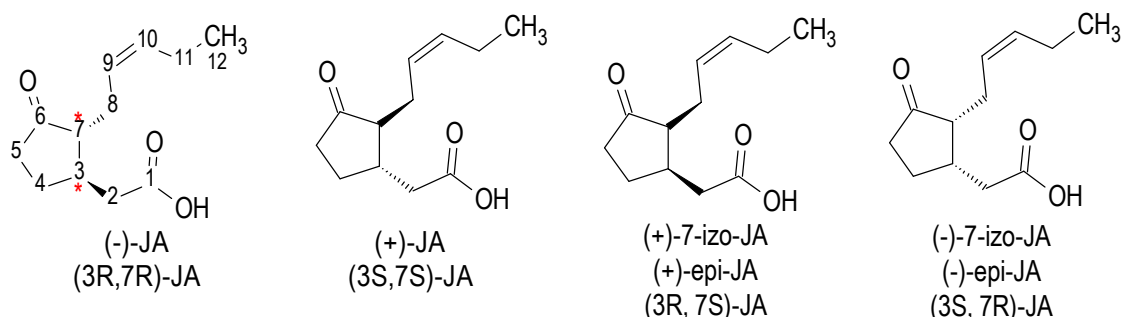
FITOHORMONY	AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA	WYBRANE ŹRÓDŁA LITERATUROWE
Strigolaktyny	<ul style="list-style-type: none">❶ Stymulowanie kiełkowania nasion roślin pasożytniczych,❷ Hamowanie wytwarzania nowych pąków i rozgałęzień pędów,❸ Udział w chemicznej komunikacji między korzeniami roślin a grzybami mikoryzowymi.	283, 284, 285
Kwas salicylowy	<ul style="list-style-type: none">❶ Stymulowanie procesu fotosyntezy,❷ Udział w procesie transpiracji i transportu jonów,❸ Indukowanie zmian w anatomii liści i strukturze chloroplastów,❹ Udział reakcji odpornościowej roślin na atak patogenów.	286, 287, 288, 289
Poliaminy	<ul style="list-style-type: none">❶ Regulacja tempa wzrostu i różnicowania się komórek,❷ Regulacja procesów replikacji, transkrypcji, translacji oraz podziałów komórkowych,❸ Udział w transbłonowym transporcie aktywnych metabolitów,❹ Nadawanie kwiatom zapachu przyciągającego/odstraszającego owady.	290, 291, 292
Jasmonidy	<ul style="list-style-type: none">❶ Hamowanie wzrostu korzenia oraz procesu kiełkowania nasion o dużej zawartości skrobi,❷ Hamowanie procesu fotosyntezy oraz tworzenia się pąków kwiatowych,❸ Przyspieszanie starzenia się i odpadania liści,❹ Stymulowanie dojrzewania owoców,❺ Udział w odpowiedzi rośliny na stres biotyczny oraz abiotyczny,❻ Indukcja syntezy wtórnych metabolitów roślinnych,❼ Stymulowanie biosyntezy inhibitorów proteinaz oraz białek zapasowych liści i nasion,❽ Regulacja procesu fotorespiracji oraz stymulowanie zamykania się aparatów szparkowych,❾ Aktywacja ekspresji genów kodujących niektóre białka obronne rośliny.	293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302

11. Jasmonidy

Jak już wcześniej wspomniano (paragraf 10.1), jasmonidy to związki pochodzenia roślinnego pełniące funkcję fitohormonów. Związki te po raz pierwszy wyizolowano z olejku eterycznego pochodzącego z kwiatów jaśminu (*Jasminum grandiflorum*) w 1962 roku [303]. Dotychczas jasmonidy zostały wykryte w ponad 160 gatunkach roślin. Związki te występują w różnych częściach rośliny, a ich zawartość w materiale roślinnym mieści się w granicach od 10 ng do 3 µg na 1 gram suchej masy surowca. Wielkość tej wartości jest zależna w głównej mierze od wieku i gatunku rośliny [304]. W dojrzałych, zdrowych tkankach kwas jasmonowy występuje w niewielkim stężeniu. Działanie czynnika stresowego biotycznego (atak insektów oraz patogenów) lub abiotycznego (m.in. uraz mechaniczny, susza, stres osmotyczny, promieniowanie ultrafioletowe, akumulacja metali ciężkich) powoduje wzmożoną syntezę kwasu jasmonowego w tkankach rośliny. Zgodnie z danymi literaturowymi [305], kwas jasmonowy został zidentyfikowany jako główna substancja syntetyzowana przez liście pszenicy (*Triticum*), poddane stresowi osmotycznemu wskutek ekspozycji na 1M roztwór sorbitolu przez okres 24 godzin. Ponadto, zaobserwowano wzmożoną syntezę oraz akumulację kwasu jasmonowego wskutek ekspozycji liści rzodkiewnika pospolitego *Arabidopsis thaliana* na związki miedzi oraz kadmu [306]. W związku z powyższym jasmonidy są nazywane roślinnymi sygnalizatorami stresu. Ponadto, związki te stymulują m.in. proces dojrzewania owoców oraz starzenia i odpadania liści, natomiast hamują proces wzrostu korzeni, kiełkowania nasion o dużej zawartości skrobi oraz tworzenia się pąków kwiatowych [294,307]. Aktywność biologiczna jasmonidów w tkankach roślinnych została szczegółowo przedstawiona w tabeli 6.

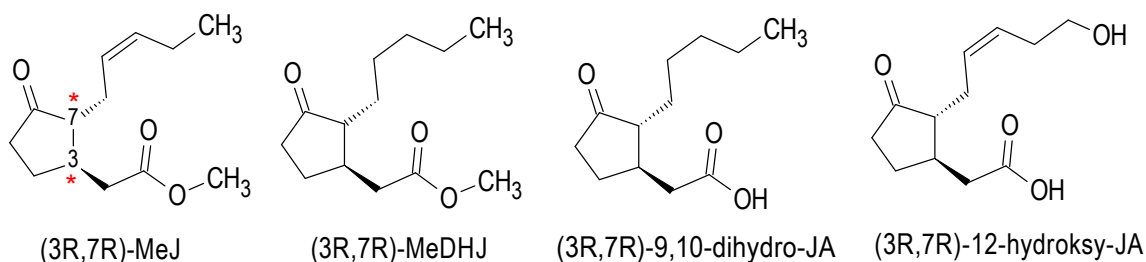
11.1. Stereoizomeria jasmonidów

Jasmonidy są analogami strukturalnymi kwasu cyklopentanooctowego wykazującymi aktywność optyczną. Cząsteczka JA (kwas 3-tleno-2-(2-cis-pentenył)-cyklopentanooctowy) zawiera dwa centra chiralne ulokowane na trzecim oraz siódmym atomie węgla (oznaczone symbolem * na rys. 25). Obecność centrów chiralnych o możliwej konfiguracji R lub S generuje występowanie czterech możliwych stereoizomerów kwasu jasmonowego: (-)-JA (3R, 7R) oraz (+)-JA (3S, 7S), jak również (+)-7-izo-JA (3R, 7S) oraz (-)-7-izo-JA (3S, 7R) [299, 308]. Kwas (+)-7-izo-JA oraz kwas (-)-7-izo-JA charakteryzują się obecnością łańcuchów bocznych w konformacji *cis* i stanowią parę izomerów lustrzanych. Ze względów stereochemicznych są one mniej stabilne niż enancjomery (3S, 7S) oraz (3R, 7R), charakteryzujące się obecnością łańcuchów bocznych w konformacji *trans*. W związku z powyższym konformery *trans* wykazują większą aktywność biologiczną i występują w przyrodzie częściej niż konformery *cis* [304]. Ponadto, obserwuje się zjawisko tautomerii keto-enolowej, wskutek której związki *cis* przekształcają się w związki *trans* [299].



Rys. 25. Wzory strukturalne stereoizomerów kwasu jasmonowego.

Do jasmonidów zaliczane są między innymi jasmonian metylu (*ang.* methyl jasmonate, MeJ), dihydrojasmonian metylu (*ang.* methyl dihydrojasmonate, MeDHJ), kwas 9,10-dihydrojasmonowy (9,10-dihydro-JA) oraz kwas 12-hydroksyjasmonowy (12-hydroksy-JA) (rys. 26) [304].



Rys. 26. Wzory strukturalne stereoisomerów wybranych jasmonidów.

11.2. Biosynteza kwasu jasmonowego

Miejszem biosyntezy kwasu jasmonowego jest błona komórkowa roślin, a substratem tej reakcji jest kwas α -linolenowy (*ang.* α -linolenic acid, α -LA), organiczny związek chemiczny z grupy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [309]. JA jest syntezowany z wykorzystaniem enzymów w tzw. „szlaku lipooksygenazowym”. Lipooksygenaza (*ang.* lipooxygenase, LOX), syntaza tlenu allenu (*ang.* allene-oxide synthase, AOS) oraz cyklaza tlenu allenu (*ang.* allene-oxide cyclase, AOC) to zlokalizowane w chloroplastach enzymy niezbędne do syntezy jasmonidów. Lipooksygenazy to enzymy katalizujące reakcje utleniania polinienasyconych kwasów tłuszczowych, zawierających w cząsteczce układ wiązań pentadienowych [310]. 13-LOX to enzym zasocjowany z wewnętrzną błoną chloroplastów. Enzym ten wykorzystuje LA do produkcji wodoronadtlenków lipidowych - 13-HPOT (*ang.* hydroperoxyoctadecatrienoic acid) [311]. Wodoronadtlenki lipidowe ulegają następnie przekształceniu do niestabilnych tlenków allenu z wykorzystaniem 13-AOS. Syntaza tlenu allenu to enzym wykorzystujący tlen z grupy wodoronadtlenkowej (-OOH) w reakcjach utleniania związków organicznych. W dalszym etapie szlaku lipooksygenazowego niestabilne tlenki allenu ulegają katalitycznemu przekształceniu do kwasu *cis*-(+)-12-oksofitodienowego (*ang.* 12-oxophytodienoic acid, OPDA) z wykorzystaniem AOC [308]. OPDA to końcowy produkt przebiegającej w plastydach części szlaku biosyntezy kwasu jasmonowego. Kolejnym etapem syntezy JA jest redukcja pierścienia cyklopentenonowego, katalizowana przez peroksydomową reduktazę kwasu oksofitodienowego (*ang.* 12-oxophytodienoate reductase, OPR). W wyniku tej reakcji OPDA ulega przekształceniu do kwasu 3-okso-2-[2'(Z)-penteny]-cyklopentano-1-kaprylowego (*ang.* 3-oxo-2-[2'(Z)-penteny]-cyclopentane-1-octanoic acid, OPC:8). Dalsze etapy biosyntezy kwasu jasmonowego obejmują proces przemiany enzymatycznej OPC:8 do OPC:8-CoA za pomocą enzymu 4-Cl-like o aktywności ligazy. W wyniku kolejnych przemian enzymatycznych powstaje kompleks acetylokoenzymu A oraz kwasu 3-okso-2-[2'(Z)-penteny]-cyklopentano-1-kapronowego (*ang.* 3-oxo-2-[2'(Z)-penteny]-cyclopentane-1-hexanoic acid-CoA). Następnie boczny łańcuch cząsteczki OPC:6-CoA zostaje skrócony i przyjmuje formę kwasu 3-okso-2-[2'(Z)-penteny]-cyklopentano-1-masłowego (*ang.* 3-oxo-2-(2'-penteny)cyclopentanebutanoic acid-CoA, OPC:4-CoA). OPC-CoA ulega następnie β -oksydacji, w wyniku której powstaje kompleks kwasu jasmonowego i CoA (JA-CoA). Kompleks ten ulega następnie przekształceniu do końcowego produktu biosyntezy - kwasu jasmonowego [312,313].

11.3. Formy występowania kwasu jasmonowego w tkankach roślinnych

Aktywność biologiczna jasmonidów w tkankach roślinnych jest związana z występowaniem tych związków w wolnej formie. Oprócz kwasu jasmonowego i jego pochodnych w postaci hydroksykwasów oraz estrów, w organizmie roślinnym zidentyfikowano jasmonidy w formie koniugatów z aminokwasami oraz cukrami. W nawiązaniu do źródeł literaturowych [302], koniugaty kwasu jasmonowego i tyrozyny (*ang.* tyrosine, Tyr) oraz fenyloalaniny (*ang.* phenylalanine, Phe) zostały zidentyfikowane w kwiatach bobu *Vicia faba* L. Zaobserwowano, że koniugat JA-Phe stymuluje proces syntezy fitoaleksyny - flawonoidu



biorącego udział w odpowiedzi rośliny na atak bakterii i grzybów. JA-Phe charakteryzował się największą aktywnością biologiczną spośród innych koniugatów występujących w tkankach ryżu siewnego *Oriza sativa* [314]. Ponadto, w tkankach jęczmienia poddanych stresowi osmotycznemu zaobserwowano wzmożoną syntezę oraz akumulację koniugatów kwasu jasmonowego oraz waliny (*ang.* valine, Val), leucyny (*ang.* leucine, Leu) oraz izoleucyny (*ang.* isoleucine, Ile). Stwierdzono również, że koniugaty JA z aminokwasami Ile, Leu, Val, Tyr oraz Phe mogą pełnić istotną funkcję w szlaku transdukcji sygnału w tzw. „odpowiedzi jasmonowej”, której przykładem jest emisja lotnych substancji czynnych, biorących udział w aktywacji układów obronnych sąsiednich roślin [315]. Reakcja sprzęgania kwasu jasmonowego i aminokwasów zachodzi przy węglu C-1 cząsteczki jasmonidu i ma charakter dwuetapowej reakcji enzymatycznej z wykorzystaniem jonów magnezu i adenozy-5'-trifosforanu [316]. Aktywność koniugatów kwasu jasmonowego oraz aminokwasów jest związana z ich konfiguracją. Wykazano, że koniugaty JA oraz L-aminokwasów cechują się wysoką aktywnością biologiczną, podczas gdy koniugaty z D-aminokwasami nie wykazują aktywności biologicznej [317].

Jak już wcześniej wspomniano, cząsteczka JA może również ulegać modyfikacji na skutek reakcji estryfikacji z glukozą i gencjobjozą. Produktami takiej reakcji są odpowiednio JA-1- β -glukoza i JA-1- β -gencjobjoza. Modyfikacja obecnego w tkankach roślinnych kwasu jasmonowego ma na celu redukcję jego stężenia oraz aktywności biologicznej [318].

11.4. Wykorzystanie jasmonidów w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym

Jasmonidy ze względu na działanie pielęgnacyjne i terapeutyczne mogą być wykorzystywane jako kosmetyczne oraz farmaceutyczne substancje aktywne. Jasmonidy wykazują działanie przeciwstarzeniowe, przeciwnowotworowe oraz przeciwpasożytnicze. Ponadto, niektóre pochodne kwasu jasmonowego są wykorzystywane w perfumiarstwie.



Działanie przeciwstarzeniowe

W nawiązaniu do źródeł literaturowych [319], kwas dihydrojasmonowy i jego pochodne wykazują zdolność regulowania aktywności gruczołów łojowych skóry, dzięki czemu mogą być stosowane w terapii nadmiernej suchości skóry. Wraz z wiekiem aktywność sekrecyjna gruczołów łojowych maleje, co skutkuje często nadmierną suchością skóry. Zwiększone wydzielanie sebum przez gruczoły łojowe zapewnia wzmocnienie ochronnego płaszcza hydrolipidowego i redukuje transepidermalną utratę wody, co zapewnia zwiększenie poziomu nawilżenia skóry [320]. Jak wspomniano w paragrafie 3.3 podziały komórkowe stymulujące złuszczenie oraz odnowę naskórka ulegają spowolnieniu wraz z postępującym procesem starzenia się skóry. Jasmonidy (m.in. kwas 3-hydroksy-2-pentylocyklopentanoctowy) wykazują działanie keratolityczne, dzięki czemu stymulują procesy złuszczenia martwych komórek naskórka oraz przyspieszają jego regenerację [9]. Ponadto, starzenie się skóry, choroby związane z powstawaniem zmian zapalnych oraz działanie promieniowania ultrafioletowego powodują powstawanie przebarwień skóry. W odniesieniu do źródeł literaturowych [10], jasmonidy wykazują działanie redukujące przebarwienia skóry, jak również łagodzą jej podrażnienia, wywołane m.in. działaniem czynników zewnętrznych, takich jak promieniowanie UV oraz dym tytoniowy [11].

Pochodna kwasu jasmonowego, kwas tetrahydrojasmonowy oraz jego sól sodowa (nazwa handlowa LR2412) zostały opracowane w celu zmniejszenia widocznych oznak starzenia się skóry. W tabeli 7 przedstawiono przykłady preparatów komercyjnych zawierających w swoim składzie pochodne kwasu jasmonowego.

**Tabela 7.** Przykłady preparatów komercyjnych zawierających pochodne kwasu jasmonowego [321].

NAZWA PREPARATU KOMERCYJNEGO	SUBSTANCJE AKTYWNE
Vichy Idéalia Life Serum LR2412 + LHA	sól sodowa kwasu tetrahydrojasmonowego, kwas lipohydroksylowy, hialuronian sodu
L'Oréal Paris Skin Perfection LR 2412 + Perline-P	sól sodowa kwasu tetrahydrojasmonowego, ekstrakt z kory <i>Eperua Falcata</i> , hialuronian sodu, ekstrakt z nasion soczewicy
Lancôme Serum Visionnaire LR 2412 4% - Cx	Kwas tetrahydrojasmonowy, sól sodowa kwasu tetrahydrojasmonowego, hialuronian sodu
Skinceuticals Chest, Neck, and Hand Repair	sól sodowa kwasu tetrahydrojasmonowego, kwas hydroksyfenoksypropionowy, ekstrakt z nasion <i>Vigna aconitifolia</i>

Jak już wspomniano (paragraf 2.1), efektywność działania substancji aktywnych zależy m.in. od ich zdolności do penetracji do głębszych warstw skóry. W celu oceny zdolności przenikania kwasu tetrahydrojasmonowego przeprowadzono badania *in vitro* z wykorzystaniem komory dyfuzyjnej Franz. Do badań wykorzystano wycinki ludzkiej skóry pozyskane z operacji plastycznych powłok brzusznych. Stwierdzono, że cząsteczka LR2412 ma zdolność penetracji naskórka oraz wierzchnich warstw skóry właściwej. Przeprowadzono także ocenę zdolności kwasu tetrahydrojasmonowego do złuszczenia naskórka. W tym celu wykorzystano mikroskopię elektronową oraz zjawisko promieniowania rentgenowskiego. Badania zostały przeprowadzone na modelu zrekonstruowanej skóry ludzkiej EpiskinTM. W oparciu o uzyskane wyniki badań stwierdzono wzrost złuszczenia naskórka oraz poprawę jego elastyczności jako następstwo stosowania preparatu zawierającego LR2412. Zaobserwowano również wzrost ilości keratynocytów zawierających antygen Ki67 (proteina jądrowa, będąca markerem proliferacji komórkowej) oraz depozycji kwasu hialuronowego w warstwie podstawnej naskórka [12]. Ponadto, odnotowano wzrost grubości naskórka oraz spłylenie widocznych zmarszczek w miejscu aplikacji preparatu [170,322]. Przeprowadzono także badania *in vivo* na grupie ochotników wykazujących objawy fotostarzenia się skóry. Wyniki dowiodły, że kwas tetrahydrojasmonowy pozytywnie wpływa na stężenie fibryliny (glikoproteiny stymulującej syntezę kolagenu i elastyny) w skórze właściwej [170].

Cząsteczka LR2412 może być stosowana jako samodzielna substancja aktywna, bądź jako substancja o działaniu synergicznym z innymi składnikami preparatu. Przykładowo, kombinacja kwasu tetrahydrojasmonowego oraz retinolu może być wykorzystywana w terapii fotostarzenia się skóry [169]. Alexiades [323] przeprowadził badania kliniczne *in vivo* na grupie 120 kobiet, które aplikowały preparaty zawierające 0,025% tretinoinę i mieszaninę 0,2% retinolu oraz 2% LR2412 raz dziennie przez okres 3 miesięcy na skórę twarzy ze znakami fotostarzenia. Zaobserwowano, że oba preparaty wykazały działanie redukujące zmarszczki, wielkość porów oraz przebarwienia skóry, jednakże preparat zawierający mieszaninę retinolu oraz LR2412 był lepiej tolerowany przez skórę pacjentek, w porównaniu z preparatem zawierającym tretinoinę [323].

Przeprowadzono również badania oceny skuteczności kompleksu LR2412-Cx (Visionnaire Lancome, L'Oreal - tabela 7) w redukcji widocznych zmian starzenia się skóry. W badaniach wzięło udział 15 ochotników, spełniających następujące kryteria: zdrowy mężczyzna lub kobieta, w wieku 35-65 lat, wykazujący widoczne oznaki starzenia się skóry, takie jak zmarszczki, przebarwienia, powiększone pory oraz pogorszenie tekstury skóry. Ochotnicy aplikowali badany preparat dwa razy dziennie przez okres 30 dni na skórę twarzy. Badania prowadzono po 1 i 3 dniach oraz 6 tygodniach od pierwszego dnia aplikacji preparatu. Ocena efektywności preparatu bazowała na subiektywnym poziomie satysfakcji ochotników. W oparciu o uzyskane wyniki badań po 6 tygodniach stosowania preparatu, stwierdzono redukcję zmarszczek o 12,4% oraz redukcję rozmiaru porów o 25,2% [324].



Jasmonidy w perfumiarstwie

Ze względu na właściwości zapachowe wybrane jasmonidy znalazły także zastosowanie w perfumiarstwie. Ester metylowy kwasu jasmonowego (MeJ) stanowi 2-3% składu olejku eterycznego pozyskiwanego z kwiatów jaśminu [325]. W celu otrzymania 1 g olejku jasmonowego należy zebrać około dziesięć tysięcy kwiatów *Jasminum sambac* L, bowiem średniej wielkości kwiat zawiera około 10^{-4} g olejku [326]. W wielu przypadkach zapach olejku eterycznego jest determinowany przez składnik występujący w niewielkim stężeniu. Uważa się, że (1R,2S)-(+)-Z-metyloepijasmonian, substancja o silnym zapachu i niskim progu wyczuwalności przez receptory węchowe (od 3 ppb, *ang.* parts per billion, cząstki na 1 miliard), jest składnikiem determinującym zapach olejku jaśminowego [327]. Oprócz właściwości zapachowych, olejek jaśminowy wykazuje działanie antybakteryjne. Przeprowadzone badania *in vitro* dowiodły jego skuteczność w redukcji liczby komórek *Escherichia coli* (szczep MTCC-443), prawdopodobnie wskutek inhibicji syntezy bakteryjnych błon komórkowych [328].



Działanie przeciwnowotworowe

Kwas jasmonowy i jego pochodne znalazły również zastosowanie w terapii nowotworów. Związki te mają bowiem zdolność hamowania proliferacji oraz indukowania apoptozy komórek nowotworowych. Jasmonidy wykazują skuteczność w terapii nowotworu płuc oraz prostaty, jak również neuroblastomy, leukemii oraz czerniaka [329]. Jasmonian metylu jest uważany za najbardziej skuteczny terapeutyk przeciwnowotworowy spośród wszystkich jasmonidów [330]. W oparciu o wyniki badań *in vitro* oraz *in vivo*, MeJ wykazuje dużą skuteczność w zwalczaniu komórek nowotworowych podczas terapii łączonej z powszechnie stosowanymi chemioterapeutykami (m.in. cisplatyna, taksol, adriamycyna) [331]. Ponadto, stwierdzono zdolność jasmonianu metylu do inhibicji wzrostu linii komórkowych nowotworu piersi (MDA-MB-435 oraz MCF-7) [332]. Dihydrojasmonian metylu również znalazł zastosowanie w terapii nowotworów, w szczególności czerniaka, leukemii, nowotworów prostaty oraz piersi. Udowodniono, że MeDHJ opóźnia progresję przerzutów nowotworowych wskutek hamowania angiogenezy tkanek nowotworowych [333].



Działanie przeciw pasożytnicze

Badania nad aktywnością biologiczną jasmonidów wykazały, że związki te mają również działanie przeciw pasożytnicze. Wyniki badań *in vitro* wskazują na skuteczność działania kwasu jasmonowego i jego pochodnych w zwalczaniu komórek zarodźca malarii (*Plasmodium falciparum*), wywołującego malarię, jak również przywry *Schistosoma mansoni*, wywołującej schistosomozę [334,335,336]. Ponadto, wykazano skuteczność działania przeciw pasożytniczego jasmonianu metylu na komórki *Trichomonas vaginalis*, wywołującego rzęsistkowicę pochwową [337].

11.5. Badania toksykologiczne jasmonidów

Przed wprowadzeniem nowej substancji aktywnej na rynek kosmetyczny oraz farmaceutyczny należy wykonać szereg badań, wykluczających jej potencjalne działanie toksyczne względem ludzkiego organizmu. W celu zdeterminowania potencjalnego działania toksycznego jasmonianu metylu wprowadzono jego dawkę (100-500 mg substancji aktywnej na 1 kg masy ciała) dootrzewnowo do organizmu myszy. Nie stwierdzono objawów zatrucia oraz śmierci u żadnego osobnika z grupy badanych zwierząt [338,339].

Przeprowadzono również ocenę toksyczności jasmonidów aplikowanych na skórę. Wykazano, że wartość dawki śmiertelnej powodującej zgon połowy badanych osobników. Stwierdzono również, że jasmonidy aplikowane na skórę nie wywołują ostrej toksyczności oraz podrażnień skóry [340]. W celu oceny fototoksyczności MeJ oraz MeDHJ, zaaplikowano ich



10% roztwory na skórę, a następnie naświetlano badany obszar promieniowaniem z zakresu UV. Nie zaobserwowano żadnych zmian skórnych, w związku z czym stwierdzono, że badane jasmonidy nie wywołują fototoksyczności oraz fotoalergii [341]. Ponadto, wyniki testów płatkowych przeprowadzonych na ludzkiej skórze potwierdziły, że jasmonidy nie wywołują niepożądanych reakcji skórnych i mogą być stosowane w preparatach aplikowanych miejscowo [328]



12. Peptydy

Peptydy to związki organiczne zbudowane z aminokwasów połączonych wiązaniem peptydowym. Ze względu na aktywność biologiczną wybrane peptydy są wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym oraz farmaceutycznym. W zależności od mechanizmu działania na ludzką skórę, peptydy podzielić można na trzy grupy: peptydy rozkurczające, peptydy sygnałowe oraz peptydy transportujące [342].

12.1. Peptydy rozkurczające

Jak wspomniano w paragrafie 3.1.1, starzenie się skóry twarzy jest spowodowane m.in. przez mimikę. Skurcze mięśni twarzy są możliwe dzięki uwalnianiu neuroprzekaźników z komórek układu nerwowego do mięśni. Całkowite lub częściowe zahamowanie uwalniania neurotransmiterów w obrębie mięśni twarzy mogłoby prowadzić do redukcji mimiki twarzy oraz powstawania zmarszczek. Substancją hamującą przewodnictwo nerwowe jest toksyna botulinowa, podawana podskórną w postaci iniekcji. Neurotoksyna hamuje uwalnianie neurotransmiterów, co powoduje paraliż pojedynczego mięśnia lub ich całej grupy [343]. Przykładami peptydów o działaniu rozkurczającym są m.in. acetylo-heksapeptyd-3, acetylooktaeptyd-1, tripeptyd-3 oraz tetrapeptyd AcYPPF.

12.2. Peptydy transportujące

Peptydy transportujące, zwane również nośnikowymi, to grupa peptydów pełniących rolę transporterów substancji aktywnych w głąb skóry. Peptydy zawierające w swoim składzie histydynę wiążą kationy miedzi. Miedź pełni w organizmie człowieka niezmiernie ważną rolę, ponieważ przyspiesza procesy gojenia się ran i jest składnikiem wielu enzymów [344]. Przykładem jest dysmutaza ponadtlenkowa - enzym, w którym miedź pełni rolę kofaktora. Jest to enzym biorący udział w neutralizacji wolnych rodników w organizmie [345]. Innym enzymem, którego prawidłowe funkcjonowanie jest uwarunkowane obecnością miedzi jest oksydaza lizylu, niezbędna w procesie wytwarzania kolagenu i elastyny [346]. Do peptydów transportujących miedź zalicza się m.in. tripeptyd GHK, czyli L-glicyno-L-histydyno-L-lizynę. GHK, będący fragmentem kolagenu ludzkiego typu II, został po raz pierwszy wyizolowany z ludzkiej plazmy przez Pickarta w 1973 roku [347]. Kompleks GHK-Cu stymuluje syntezę glikozaminoglikanów (m.in. kwas hialuronowy) oraz produkcję nowych włókien kolagenowych przez fibroblasty. Związek ten reguluje również działanie metaloproteinaz I oraz II, które są odpowiedzialne za usuwanie uszkodzonych włókien kolagenu i elastyny z matrycy pozakomórkowej [173].

12.3. Peptydy sygnałowe

Trzecią grupą peptydów wykorzystywanych w preparatach kosmetycznych są peptydy sygnałowe. Nazwa tej grupy pochodzi od mechanizmu działania peptydów, które „wysyłają” sygnał do biosyntezy elementów składowych macierzy pozakomórkowej. Uważa się, że peptydy sygnałowe stymulują fibroblasty do produkcji włókien kolagenowych, elastynowych oraz fibronektyny (glikoproteiny macierzy pozakomórkowej, regulującej m.in. procesy adhezji i proliferacji komórek) [348]. Rolę sygnałową pełnią najczęściej pochodne peptydów wchodzących w skład ludzkiego kolagenu i elastyny [349]. Peptydy sygnałowe stosowane w kosmologii otrzymywane są na drodze syntetycznej lub biotechnologicznej. Do grupy peptydów sygnałowych należą m.in. palmitoilo-pentapeptyd-3, heksapeptyd VGVAPG oraz tripeptyd KVK.



13. Koniugaty

Koniugacja jest to proces chemiczny polegający na stworzeniu stabilnego, a tym samym trwałego, wiązania między dwiema cząsteczkami chemicznymi. Proces ten ma na celu stworzenie koniugatu, który cechowałby się aktywnością biologiczną, charakterystyczną dla wchodzących w jego skład, cząsteczek substancji aktywnych. W przypadku substancji o synergicznym działaniu, koniugacja ma na celu intensyfikację aktywności biologicznej poszczególnych cząsteczek SA [14]. Koniugacja cząsteczek substancji znalazła szerokie zastosowanie w przemyśle kosmetycznym. Przykładowo, koniugat cząsteczki dekstranu (polimeru glukozy o wysokim ciężarze cząsteczkowym) oraz cząsteczki kwasu rozmarynowego wykazuje działanie antyoksydacyjne oraz rozjaśniające przebarwienia skóry [350]. Wykazano również, że koniugacja nanocząstek złota z kinetyną (substancja z grupy cytokinin) prowadzi do otrzymania stabilnego kompleksu o działaniu przeciwstarzeniowym [351]. Castellort i wsp. [352] przedstawili metodę syntezy koniugatu cząsteczki kwasu hialuronowego i nanocząstek metali, który może znaleźć potencjalne zastosowanie w pielęgnacji skóry z oznakami starzenia. W literaturze istnieje także wiele doniesień na temat koniugacji substancji aktywnych z cząsteczkami kwasów tłuszczowych w celu ułatwienia ich transportu przez lipofilową barierę naskórkową. Olejnik i wsp. [353] przedstawili właściwości fizykochemiczne koniugatu tetrapeptydu YPPF oraz cząsteczki kwasu palmitynowego (PalmYPPF), który może być stosowany jako składnik preparatów redukujących nadwrażliwość skóry. Shabat i wsp. [354] z kolei zaproponowali wykorzystanie koniugatu glikolu propylenowego z kwasem oleinowym lub linolenowym jako promotora przesnaskórkowego przenikania substancji aktywnych (m.in. lidokainy).

Wykorzystanie procesu koniugacji jest także powszechnie wykorzystywane w farmacji. Coraz większą popularnością cieszą się biokoniugaty. Są to układy dwóch lub więcej cząsteczek, spośród których przynajmniej jedna musi być biomolekułą, czyli cząsteczką biorącą udział w reakcjach zachodzących w organizmach żywych [355]. Przykładem biokoniugatów są białka o charakterze nośnikowym połączone z molekułami efektorowymi. Model ten stanowi podstawę terapii celowanej, polegającej na dostarczaniu i uwalnianiu efektora w miejscu docelowym. Kombinacja przeciwciał monoklonalnych z cytotoksycznymi lekami przeciwnowotworowymi stanowi ciekawe zagadnienie i może przyczynić się do rozwoju antynowotworowej terapii celowanej [356]. W oparciu o dostępne dane literaturowe [357], koniugacja leków z wybranymi polimerami daje możliwość ich kontrolowanego uwalniania w docelowym miejscu działania oraz zwiększa ich stabilność w płynach ustrojowych. Przykład stanowią koniugaty dekstranu z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi o charakterze kwasowym. Co więcej, koniugacja kationowych polimerów z dekstranem obniża ich toksyczność i zwiększa ich stabilność [358]. Nowość w analizie medycznej stanowią połączenia luminescencyjnych kropek kwantowych z bakteriofagami, które mogą być potencjalnie wykorzystywane w identyfikacji oraz analizie infekcji bakteryjnych [359].

CEL PRACY

Przegląd literaturowy, którego dokonano w niniejszej pracy doktorskiej, wskazuje na rosnące zainteresowanie wykorzystaniem kwasu jasmonowego i jego pochodnych w preparatach do pielęgnacji skóry. Dynamiczny rozwój przemysłu kosmetycznego stwarza ciągłą potrzebę opracowywania zarówno nowych substancji aktywnych, jak i receptur je zawierających. W związku z powyższym głównym celem przedkładanej rozprawy doktorskiej było opracowanie oraz analiza nowych preparatów zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. Podjęto także próbę zaprojektowania oraz determinacji aktywności biologicznej *in vivo* nowych pochodnych kwasu jasmonowego w postaci jego koniugatów z wybranymi tetrapeptydami. Celem badań w ramach pracy doktorskiej była także ocena potencjalnego zastosowania nowych receptur zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne w preparatach do pielęgnacji skóry.

Główne założenia niniejszej pracy realizowano poprzez następujące zadania:

1. Otrzymywanie nowych preparatów zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne.
2. Zaprojektowanie nowych pochodnych kwasu jasmonowego o lepszej biodostępności i aktywności biologicznej.
3. Analiza parametrów fizykochemicznych przygotowanych preparatów zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne.
4. Analiza stabilności przygotowanych preparatów zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne.
5. Opracowanie metodyki oznaczania jasmonidów i ich pochodnych w formułacjach kosmetycznych metodą HPLC.
6. Opracowanie metodyki badań *in vitro* uwalniania jasmonidów i ich pochodnych z formułacji kosmetycznych wraz z oceną kinetyki ich przenikania przez bariery imitujące skórę.
7. Przeprowadzenie testów aplikacyjnych *in vivo* preparatów zawierających nowe pochodne kwasu jasmonowego.

METODYKA PRACY

14. Jasmonidy wykorzystane do badań

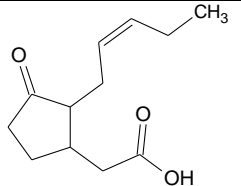
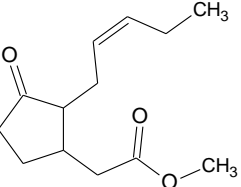
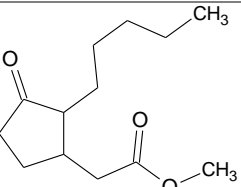
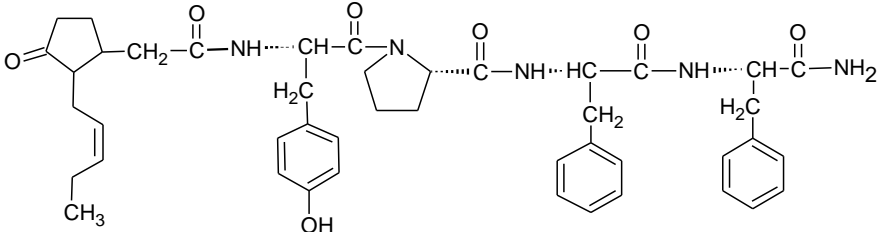
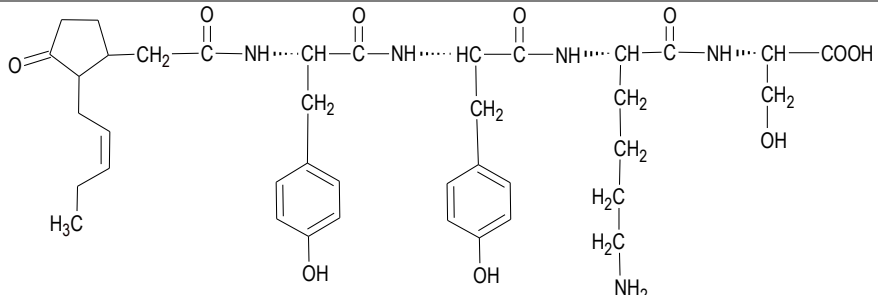
Do badań w ramach pracy doktorskiej wykorzystano następujące jasmonidy: kwas jasmonowy (JA), jasmonian metylu (MeJ), dihydrojasmonian metylu (MeDHJ), których wzorce (w postaci mieszanin racemicznych) zostały zakupione w firmie TriMen TCI. W pracy zaprojektowano także dwie nowe pochodne kwasu +/- jasmonowego: koniugat JA oraz tetrapeptydu L-Tyr-L-Pro-L-Phe-L-Phe (JA-YPPF-NH₂), a także koniugat JA oraz tetrapeptydu L-Tyr-L-Tyr-L-Lys-L-Ser (JA-YYKS-NH₂), których synteza została przeprowadzona przez firmę Lipopharm®. Wzory sumaryczne oraz strukturalne związków chemicznych wykorzystanych w badaniach przedstawiono w tabeli 8.

15. Synteza oraz charakterystyka fizykochemiczna badanych pochodnych kwasu jasmonowego

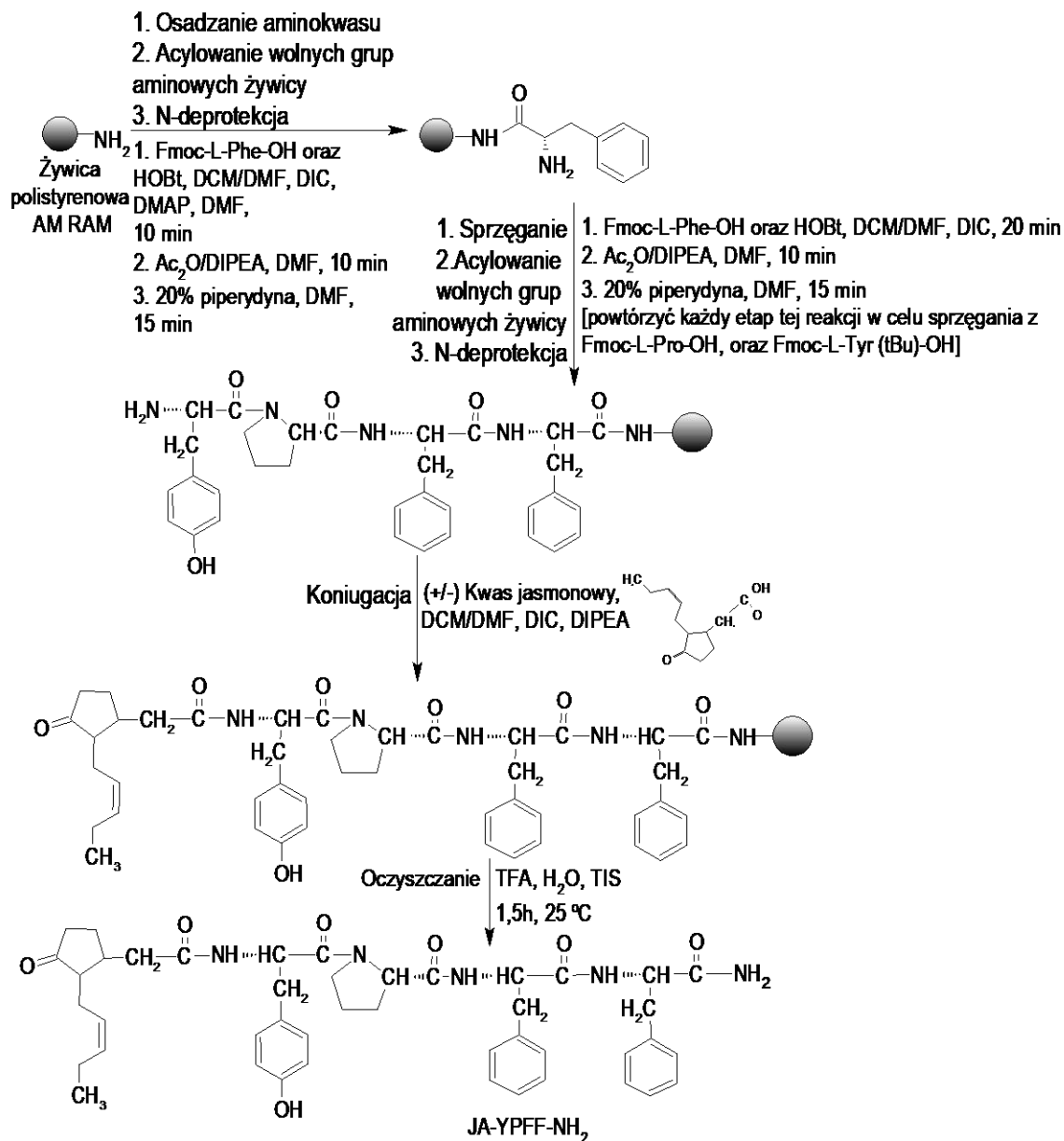
15.1. Synteza koniugatów kwasu jasmonowego oraz wybranych tetrapeptydów

Syntezę koniugatu JA-YPPF-NH₂ prowadzono na podłożu stałym z wykorzystaniem żywicy AM RAM oraz strategii Fmoc/tBu. Do syntezy wykorzystano następujące ilości reagentów: 585,1 mg Fmoc-L-Phe-OH, 506,1 mg Fmoc-L-Pro-OH, 689,3 mg Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH oraz 371,1 mg kwasu jasmonowego. Pochodne aminokwasów zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich. Przed przystąpieniem do syntezy przeprowadzono kondycjonowanie żywicy za pomocą mieszaniny DCM/DMF (v/v, 9:1). Po upływie 60 minut odsączono mieszaninę rozpuszczalników. Syntezę koniugatu rozpoczęto od zakotwiczenia pierwszej pochodnej aminokwasu (C-terminalny Fmoc-L-Phe-OH) z wykorzystaniem DIC oraz DMAP rozpuszczonego w DMF. Następnie zablokowano wolne grupy aminowe żywicy poprzez przeprowadzenie reakcji acylowania z wykorzystaniem Ac₂O oraz DIPEA rozpuszczonego w DMF. Przeprowadzono także odblokowanie grupy Fmoc z wykorzystaniem 20% roztworu piperydyny rozpuszczonej w DMF. W dalszym przebiegu syntezy powtarzano powyżej opisane procedury w celu przyłączenia kolejno Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH oraz kwasu jasmonowego. Jako substancję sprzęgającą wykorzystano DIC oraz HOBt, rozpuszczone w mieszaninie DCM/DMF (v/v, 9:1). Po każdorazowej reakcji sprzęgania zablokowano wolne grupy aminowe żywicy (Ac₂O/DIPEA, DMF) oraz odblokowano grupy N-Fmoc pochodnych aminokwasów (20% roztwór piperydyny w DMF). Po zakończeniu reakcji deprotekcji grupy aminowej N-Fmoc, każdorazowo przeprowadzono test chloranilowy w celu identyfikacji wolnych grup aminowych. Rezultat testu był pozytywny, ponieważ ciemnoniebieskie zabarwienie ziaren żywicy AM RAM świadczyło o obecności wolnych grup aminowych i zakończonej powodzeniem reakcji deprotekcji grupy Fmoc. Syntezę koniugatu zakończono poprzez odszczepienie gotowego produktu od żywicy z wykorzystaniem mieszaniny TFA:H₂O:TIS (v/v, 92.5:2.5:5) [171,360].

Tabela 8. Wzory sumaryczne, strukturalne oraz masa cząsteczkowa badanych związków.

SYMBOL	STRUKTURA	WZÓR SUMARYCZNY	M (Da)
JA		$C_{12}H_{18}O_3$	210
MeJ		$C_{13}H_{20}O_3$	224
MeDHJ		$C_{13}H_{22}O_3$	226
JA-YPFF-NH ₂		$C_{44}H_{53}N_5O_7$	764
JA-YYKS-NH ₂		$C_{39}H_{54}N_6O_9$	751

Na rys. 27 przedstawiono schemat syntezy koniugatu JA-YPPF-NH₂ z wykorzystaniem stałego nośnika żywicy polistyrenowej AM RAM. Schemat ten stanowi ogólny zarys procesu otrzymywania JA-YPPF-NH₂, bez uwzględnienia stereoizomerii kwasu jasmonowego. W analogiczny sposób otrzymano koniugat JA-YYKS-NH₂, wykorzystując do jego syntezy następujące substraty: Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH (Sigma-Aldrich) oraz racemiczną mieszaninę kwasu jasmonowego (TriMen TCl).



Rys. 27. Schemat syntezy koniugatu kwasu jasmonowego oraz tetrapeptydu YPPF-NH₂.

15.2. Oczyszczanie otrzymanych koniugatów

W celu oczyszczenia otrzymanych koniugatów wykorzystano wysokosprawną chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz (*ang.* reversed phase - high performance liquid chromatography, RP-HPLC). Parametry procesu oczyszczania gotowych produktów przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Parametry procesu oczyszczania otrzymanych koniugatów metodą RP-HPLC.

KOLUMNA CHROMATOGRAFICZNA	Phenomenex Luna C18(2) (250×10 mm, 100 Å)
ELUCJA	Gradientowa (100→0% A, 0→100% B; 6%/min)
FAZY	Faza A: woda+0,1% TFA Faza B: acetonitryl+0,1% TFA

15.1. Spektrometria mas ESI-MS

W celu potwierdzenia teoretycznej masy cząsteczkowej badanych związków wykorzystano spektrometrię mas ESI-MS. Wykorzystaną w badaniach aparaturą był spektrometr mas Waters/Micromass (Manchester, Wielka Brytania). Temperatura źródła jonizacji wynosiła 100°C, natomiast procesu desolwatacji - 200°C. Napięcie kapilary (igły) wynosiło 3,5 kV, a prędkość przepływu gazu - 5 uL/min. W analizie jako gaz kolizyjny wykorzystano wysokiej czystości argon, natomiast do nebulizacji i desolwatacji próbki wykorzystano (również wysokiej czystości) azot. Spektrometr mas jest również wyposażony w analizator, który rozdziela jony na podstawie stosunku masy do ładunku. Sygnał z analizatora trafia do detektora. Ostatnim elementem układu jest komputer, który przetwarza sygnał cyfrowy i przedstawia wynik analizy w postaci widma masowego prezentującego zależność m/z [361]. Widma masowe ESI zostały zebrane w trybie jonów dodatnich oraz ujemnych w zakresie od 100 do 2000 m/z.

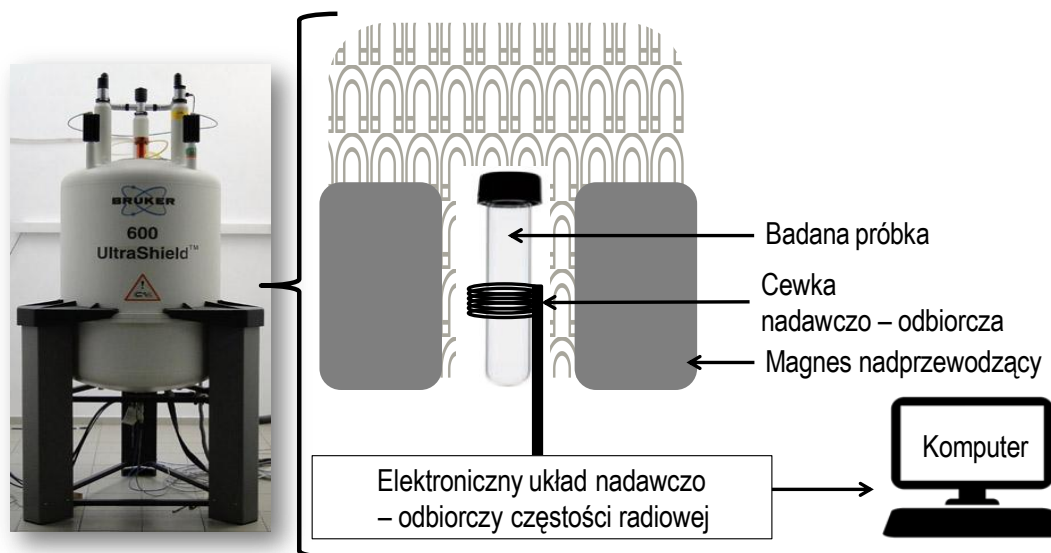
15.2. Spektroskopia FTIR

W celu potwierdzenia obecności charakterystycznych grup funkcyjnych badanych koniugatów wykorzystano spektroskopię fourierowską w podczerwieni FTIR. W badaniach jasmonidów wykorzystano spektrofotometr Nicolet FTIR 200 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Stany Zjednoczone). Zarejestrowano widmo w zakresie 500-4000 cm⁻¹, a następnie przeprowadzono identyfikację pasm obecnych na widmie.

15.3. Spektroskopia NMR

W celu potwierdzenia teoretycznej struktury badanych koniugatów wykorzystano spektroskopię magnetycznego rezonansu jądowego NMR. Badania prowadzono z użyciem spektrometru NMR Bruker AVANCE™, 600 MHz UltraShield (Bruker, Wielka Brytania). Aparat ten (rys. 28) zbudowany jest z solenoidów nadprzewodzących pełniących rolę magnesu wytwarzającego jednorodne pole magnetyczne. W szczelinie magnesu znajduje się cewka nadawczo-odbiorcza, w której umieszcza się próbkę. Generatorem częstotliwości radiowej w tym aparacie jest krystaliczny oscylator. Wygenerowany sygnał rezonansowy jest kierowany do detektora, a następnie komputera, który przetwarza sygnał na widmo przedstawiające wykres absorpcji promieniowania magnetycznego od jego częstotliwości. Częstość pola wyrażana jest w częściach na milion (ppm) częstotliwości pola magnetycznego pochłanianego przez wzorzec (np. tetrametylosilan).

Próbki do analizy przygotowano przez odważenie 40 mg związku, a następnie rozpuszczenie go w niewielkiej ilości deuterowanego rozpuszczalnika organicznego. Koniugat JA-YPFF-NH₂ rozpuszczono w chloroformie-d (CDCl₃), dla którego obserwuje się następujące przesunięcia chemiczne: δ ¹H=7,24 ppm oraz δ ¹³C=77,0 ppm. Kolejny koniugat, JA-YYKS-NH₂ wykazał natomiast lepszą rozpuszczalność w metanolu-d₄ (CD₃OD), dla którego obserwuje się następujące przesunięcia chemiczne: δ ¹H = 3,31 ppm i 4,78 ppm oraz δ ¹³C = 49,2 ppm. Otrzymane widma analizowano z wykorzystaniem programu MestreNova.



Rys. 28. Schemat budowy spektrometru NMR Bruker Avance. Zdjęcie ze strony producenta [362], schemat – projekt własny.

15.4. Badanie zdolności antyoksydacyjnej kwasu jasmonowego i jego pochodnych z użyciem syntetycznego rodnika DPPH*

W celu zbadania aktywności antyoksydacyjnej kwasu jasmonowego i jego pochodnych sporządzono roztwór DPPH* przez odważenie 3,94 mg rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu, a następnie rozpuszczenie naważki w 130 mL metanolu. Po całkowitym rozpuszczeniu rodnika w metanolu wykonano pomiar widma UV-Vis i odczytano długość fali, przy której absorbancja roztworu była największa (λ_{max}). Sporządzono także metanolowe roztwory badanych jasmonidów i ich pochodnych poprzez odważenie 1 mg substancji aktywnej i rozpuszczenie jej w 10 mL metanolu. Podobnie, jak w przypadku roztworu rodnika zmierzono wartość λ_{max} metanolowych roztworów JA, MeJ, MeDHJ, JA-YPFF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂. Następnie do kwarcowej kuwety odmierzone 1,5 mL roztworu DPPH* oraz 1,5 mL roztworu badanego jasmonidu. Pomiar absorpcji prowadzono co minutę przez okres 5 minut, a następnie po 10, 15, 20, 25, 45 oraz 60 minutach od momentu zmieszania roztworów badanej substancji oraz rodnika DPPH*. Do badań wykorzystano spektrofotometr UV-Vis Cary 50 Bio (Varian, Stany Zjednoczone). Wyniki badań potencjału antyoksydacyjnego jasmonidów zostały przedstawione za pomocą procentu wygaszania wolnego rodnika DPPH* obliczonego według równania (9):

$$\% \text{ Inhibicji} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \%, \quad (9)$$

gdzie:

A_0 - absorbancja roztworu rodnika DPPH* (j.u.),

A_1 - absorbancja roztworu rodnika DPPH* po dodaniu badanej substancji (j.u.).

16. Preparatyka formulacji kosmetycznych zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne

Przygotowano pięć różnych formulacji kosmetycznych:

- Emulsję 1 (typu o/w, przygotowana w temperaturze 70°C),
- Emulsję 2 (typu w/o, przygotowana w temperaturze 70°C),
- Emulsję 3 (typu o/w, przygotowana w temperaturze 25°C),
- Żel PAA na bazie karbomeru,
- Żel HEC na bazie hydroksyetylocelulozy (przygotowane w temperaturze 25°C).

Każda z przygotowanych formułacji zawierała 0,5 % wagowych substancji aktywnej (JA, MeJ, MeDHJ, JA-YPFF-NH₂ bądź JA-YYKS-NH₂). W tabeli przedstawiono skład chemiczny przygotowanych formułacji kosmetycznych. Opracowane formułacje przygotowano również według tej samej procedury bez substancji aktywnej (bazy kosmetyczne).

16.1. Preparatyka Emulsji 1

Składniki stanowiące fazę tłuszczową emulsji (olej słonecznikowy, monostearynian glicerolu oraz alkohol cetylowy) wprowadzono do szklanej zlewki umieszczonej na mieszadle magnetycznym. Następnie zawartość zlewki ogrzano do temperatury 70°C. W tym samym czasie do kolejnej zlewki wprowadzono składniki fazy wodnej (woda demineralizowana i kwas cytrynowy) i mieszano aż do całkowitego rozpuszczenia kwasu, a następnie ogrzewano do uzyskania temperatury 70°C. Po całkowitym roztopieniu składników fazy tłuszczowej dodano do nich fazę wodną i mieszano do momentu całkowitego połączenia się obu faz (prędkość mieszania 1200 obr./min). Po schłodzeniu otrzymanej emulsji do temperatury 25°C dodano do niej substancję czynną i mieszano przez 10 minut. Gotową emulsję zawierającą substancję czynną zhomogenizowano w celu zwiększenia jednorodności uzyskanej formułacji, wykorzystując homogenizator YellowLine DI 25 Basic (IKA, Niemcy).

16.2. Preparatyka Emulsji 2 (typu w/o)

Składniki fazy tłuszczowej (alkohol cetearylowy, parafina ciekła, palmitynian izopropylu oraz wazelina biała) wprowadzono do szklanej zlewki umieszczonej na mieszadle magnetycznym. Zawartość zlewki ogrzano do temperatury 70°C. Jednocześnie w drugiej zlewce rozpuszczono kwas cytrynowy w wodzie demineralizowanej, a następnie ogrzano do uzyskania tej samej temperatury, co dla składników fazy tłuszczowej. Po całkowitym roztopieniu składników fazy tłuszczowej dodano do nich ogrzaną fazę wodną. Układ cały czas mieszano intensywnie na mieszadle magnetycznym (prędkość mieszania 1200 obr./min). Po otrzymaniu emulsji o jednolitej konsystencji i schłodzeniu jej do 25 °C, dodano do niej substancję czynną i mieszano układ przez 10 minut. Gotową emulsję zawierającą substancję czynną zhomogenizowano w celu zwiększenia jednorodności uzyskanej formułacji. W tym celu wykorzystano homogenizator YellowLine DI 25 Basic (IKA, Niemcy).

16.3. Preparatyka Emulsji 3 (typu o/w)

Do szklanej zlewki umieszczonej na mieszadle magnetycznym wprowadzono składniki Creagel EZ7 (poliakrylamid, uwodniony polideken, eter laurylowy polioksyetylenu) oraz Alphaflow 20 (uwodniony polideken). Następnie stopniowo dodawano do nich wodę demineralizowaną, cały czas intensywnie mieszając (prędkość mieszania 1200 obr./min). Po całkowitym wymieszaniu składników dodano substancję czynną i układ mieszano przez 10 minut, a następnie zhomogenizowano otrzymaną emulsję wykorzystując homogenizator YellowLine DI 25 Basic (IKA, Niemcy).

16.4. Preparatyka żelu PAA

Karbomer (polimer kwasu akrylowego) dyspergowano w wodzie demineralizowanej za pomocą mieszadła magnetycznego przez dwie godziny (prędkość mieszania 1200 obr./min). Po upływie tego czasu dodano 2-propanol, a następnie intensywnie mieszając, wprowadzano porcjami roztwór wodorotlenku sodu do osiągnięcia wartości pH równej 6,5. Po uzyskaniu żelowej konsystencji produktu, dodano do niego substancję czynną, a następnie cały układ mieszano przez 10 minut, po czym poddano homogenizacji w celu zwiększenia jednorodności uzyskanej formułacji.

16.5. Preparatyka żelu HEC

Glicerynę oraz wodę destylowaną umieszczono w zlewce i ogrzewano w łaźni wodnej do temp. 80°C. Następnie mieszając dodawano hydroksyetylocelulozę do uzyskania konsystencji żelu. Po uzyskaniu pożądanej konsystencji produktu, dodano do niego substancję aktywną, a następnie cały układ mieszano przez 10 minut.

Tabela 10. Skład chemiczny przygotowanych formułacji kosmetycznych, część I.

NAZWA	SKŁADNIK	PRODUCENT	ZAWARTOŚĆ (% w/w, ± 0,01)
Emulsja 1	olej słonecznikowy	Sigma-Aldrich	12,50
	monostearynian glicerolu	Sigma-Aldrich	4,00
	alkohol cetylowy	Sigma-Aldrich	6,00
	kwas cytrynowy	Sigma-Aldrich	0,50
	woda demineralizowana	-	76,50
	substancja aktywna	-	0,50
Emulsja 2	alkohol cetearylowy	Evonik	10,00
	parafina ciekła	Sigma-Aldrich	15,00
	palmitynian izopropylu	Sigma-Aldrich	5,00
	wazelina biała	Sigma-Aldrich	49,00
	kwas cytrynowy	Sigma-Aldrich	0,50
	woda demineralizowana	-	20,00
Emulsja 3	substancja aktywna	-	0,50
	Creagel EZ7 (polakrylamid, uwodorniony polideken, eter	Créations Couleurs	10,00
	laurylowy polioksyetyleny) Alphaflow 20 (uwodorniony polideken)	Créations Couleurs	17,00
	woda demineralizowana	-	72,50
	substancja aktywna	-	0,50
Żel PAA	karbomer kwasu akrylowego 10 % w/w r-r	Evonik	0,50
	wodorotlenku sodu	Chempur	1,00
	2-propanol	Sigma-Aldrich	25,00
	woda demineralizowana	-	73,00
	substancja aktywna	-	0,50
Żel HEC	hydroksyetyloceluloza (HEC)	Sigma-Aldrich	2,50
	gliceryna	Chempur	10,0
	woda demineralizowana	-	87,0
	substancja aktywna	-	0,50

17. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych formułacji

17.1. Ocena organoleptyczna

Ocenę organoleptyczną przygotowanych formułacji przeprowadzono zgodnie z Polską Normą nr BN-77/6140-01 (Emulsje kosmetyczne - Metody badań - Postanowienia ogólne i zakres normy) [115]. Analizowano barwę, konsystencję oraz zapach otrzymanych preparatów.

17.2. Określanie typu emulsji metodą mikroskopii optycznej

W celu określenia typu otrzymanych emulsji kosmetycznych wykorzystano mikroskopię optyczną. Próbki do analizy mikroskopowej przygotowano przez wprowadzenie do moździerza niewielkiej ilości badanej emulsji i dodanie do niej kilku kropli oranżu metylowego. Obie fazy dokładnie połączono, rozcierając je za pomocą tłuczka, aż do uzyskania jednolitej konsystencji. Tak przygotowaną mieszaninę naniesiono w postaci cienkiej warstwy na szkiełko podstawowe i przykryto szkiełkiem nakrywkowym. Typ emulsji analizowano za pomocą mikroskopu optycznego Novex Mikroskope BV 40x-1000x (Euromex, Holandia, rys. 29).



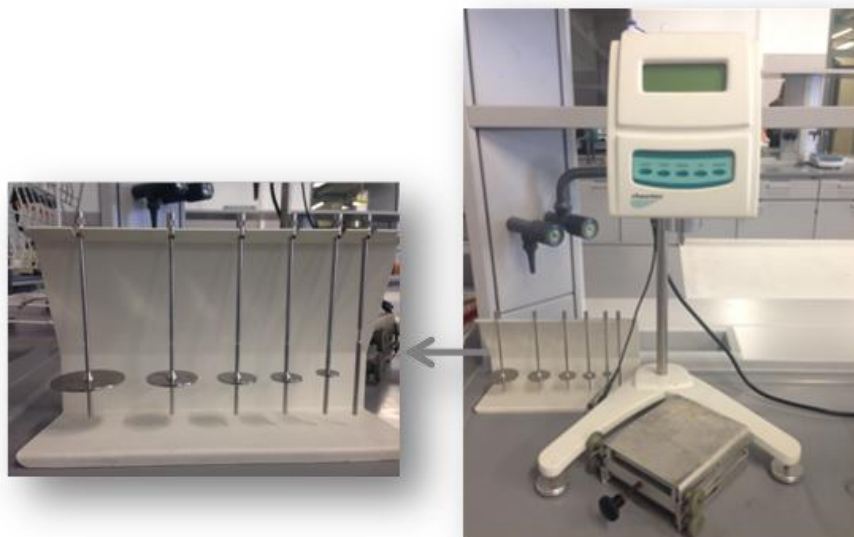
Rys. 29. Mikroskop optyczny Novex Mikroskope BV 40x-1000x (Euromex, Holandia, zaadaptowano z [363]).

17.3. Badanie wartości pH otrzymanych formułacji

W pracy zbadano także wartość pH otrzymanych formułacji zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. Badania zostały przeprowadzone od razu po sporządzeniu formułacji z wykorzystaniem pehametru przenośnego SCHOTT handylab LF12 (SCHOTT AG, Mainz, Niemcy). Przed wykonaniem pomiarów formułacji aparat został poddany kalibracji za pomocą roztworów buforowych o wartości pH równej 4,00 oraz 7,00 (-). Następnie sporządzono roztwory wodne otrzymanych preparatów (20 mL wody demineralizowanej oraz 1 g badanego preparatu). Pomiar wartości pH formułacji zawierających jasmonidy i ich pochodne prowadzono w temperaturze 25°C. Każdy pomiar przeprowadzono trzykrotnie, a następnie obliczono wartość średnią oraz odchylenie standardowe z uzyskanych wyników.

17.4. Badanie lepkości otrzymanych formułacji

W pracy zbadano także lepkość otrzymanych formułacji zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. Wykorzystano lepkościomierz rotacyjny z nastawianym momentem ścinającym RCO2 firmy Rheotec (Messtechnik GmbH, Ottendorf-Okrilla, Niemcy, rys. 30).



Rys. 30. Lepkościomierz rotacyjny RCO2 Rheotec wyposażony we wrzeciona pomiarowe.

Wykorzystany lepkościomierz jest wyposażony w 6 wrzecion rotacyjnych różniących się rozmiarem dysków wieńczących wrzeciono. Wrzeciona wyposażone w dysk są wykorzystywane do badania formułacji o niewielkiej lepkości (rys. 30), natomiast do pomiaru próbek cechujących się dużą lepkością wykorzystuje się wrzeciono wyposażone w walec. Pomiar lepkości w szerokim zakresie 20-13 000 000 mPa × s jest możliwy dzięki dostępności różnego rozmiaru wrzecion, jak również modyfikacji prędkości obrotu tych wrzecion. Lepkościomierze rotacyjne charakteryzują się dużą dokładnością pomiarów (błąd względny w granicach $\pm 3\%$). Aby zmierzyć lepkość formułacji w optymalnym zakresie, należy przeprowadzać badania przy użyciu kilku wrzecion pomiarowych [364].

W celu zmierzenia lepkości otrzymanych formułacji, umieszczono je w wąskich, szklanych zlewkach. Pomiar przeprowadzono w temperaturze 25°C z wykorzystaniem wrzeciona R5, rozpoczynając najwolniejszych obrotów, stopniowo je zwiększając. Każdy pomiar przeprowadzono trzykrotnie, a następnie obliczono wartość średnią oraz odchylenie standardowe z uzyskanych wyników.

17.5. Badanie rozkładu wielkości cząstek formułacji z wykorzystaniem techniki dyfrakcji laserowej

W pracy zbadano także rozkład wielkości cząstek otrzymanych formułacji zawierających jasmonidy i ich pochodne. W tym celu wykorzystano aparat Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Wielka Brytania).

W celu prawidłowego pomiaru rozpraszania promieniowania na powierzchni cząstek badanej formułacji niezbędna jest znajomość współczynnika refrakcji badanych produktów [143]. Z tego względu przed rozpoczęciem pomiarów z wykorzystaniem aparatu Mastersizer 2000 zmierzono współczynnik refrakcji formułacji zawierających jasmonidy z wykorzystaniem refraktometru Refracto 30 PX/GS (Mettler Toledo, Greifensee, Szwajcaria).

Przed przystąpieniem do pomiaru rozkładu wielkości cząstek dokładnie zdyspergowano 0,1 g badanej próbki w 800 mL wody destylowanej. Badania prowadzono w temperaturze 25°C przy prędkość mieszania 1500 obr./min. Badania przeprowadzono natychmiast po otrzymaniu formułacji, jak również po upływie 70 dni przechowywania formułacji w różnych warunkach temperaturowych. Po zakończeniu każdego pomiaru uruchomiono sondę ultradźwiękową (20 kHz) w celu "rozbicia" potencjalnie powstałych aglomeratów i ponownie zmierzono rozkład wielkości cząstek.

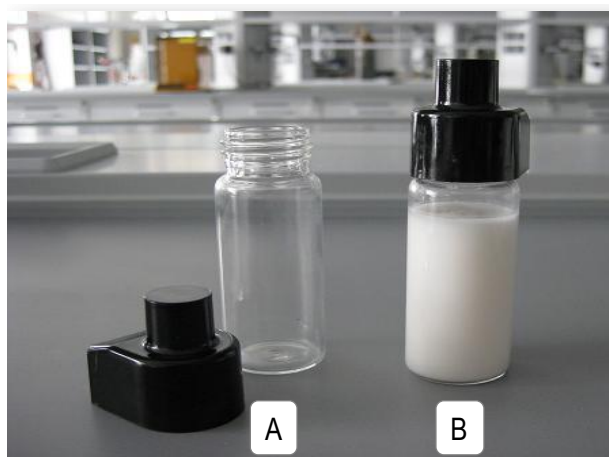
Wyniki pomiarów zostały przedstawione w postaci następujących wartości procentowych:

- ❶ D(0,1) (μm) - 10% rozkładu cząstek znajduje się poniżej tej wartości,
- ❷ D(0,5) (μm) - mediana rozkładu cząstek (50% rozkładu cząstek znajduje się poniżej tej wartości oraz 50% rozkładu cząstek znajduje się powyżej tej wartości),
- ❸ D(0,9) (μm) - 90% rozkładu cząstek znajduje się poniżej tej wartości.

Wyniki opisano również za pomocą wartości D(4,3) prezentującej stosunek średniej średnicy cząstek do ich wielkości.

17.6. Badanie stabilności emulsji z wykorzystaniem metody wielokrotnego rozpraszania światła

Badanie stabilności przygotowanych emulsji zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne zostało przeprowadzone z wykorzystaniem urządzenia Turbiscan Lab Expert. W celach pomiarowych umieszczono badane emulsje. Istotne jest, by emulsja wypełniała cele pomiarowe do około $\frac{3}{4}$ ich wysokości i nie zawierała pęcherzyków powietrza (rys. 31). Tak przygotowaną próbkę umieszczono w aparacie pomiarowym.



Rys. 31. Cele pomiarowe aparatu Turbiscan Lab Expert: pusta (A) i wypełniona badaną formacją (B).

Pomiary prowadzono w temperaturze 4 oraz 25°C (uwzględniając warunki przechowywania otrzymanych formacji) przez okres 70 dni. Przeprowadzono również test przyspieszonego starzenia AAT (*ang.* accelerated aging test) preparatów przechowywanych w temperaturze 45 °C przez okres 14 dni. Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci krzywych zmian wstecznego rozproszenia światła (próbki nieprzejrzyste) w czasie oraz w funkcji wysokości celi pomiarowej (podanej w milimetrach). Dla każdej badanej emulsji obliczono także wartość parametru TSI (*ang.* Turbiscan Stability Index) sumującego wszystkie rodzaje niestabilności danej próbki. Obliczenia wykonano zgodnie z równaniem (10):

$$TSI = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{BS})^2}{n-1}}, \quad (10)$$

gdzie:

n- całkowita liczba pomiarów,

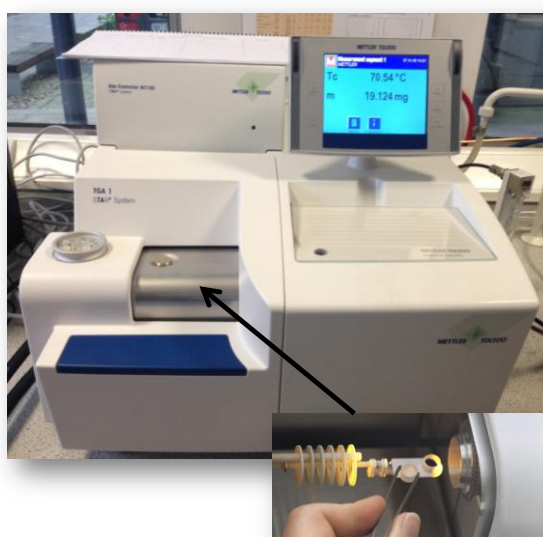
x_i - średnia wartość wstecznego rozpraszania światła w każdej minucie pomiaru,

x_{BS} - średnia wszystkich wartości x_i .

17.7. Badanie wpływu dodatku jasmonidów na stabilność termiczną formułacji z wykorzystaniem analizy termogravimetrycznej

W pracy zbadano również wpływ dodatku jasmonidów na stabilność termiczną otrzymanych formułacji. W tym celu wykorzystano analizę termogravimetryczną. Badania przeprowadzono z użyciem TGA 1 STAR System (Mettler Toledo, Ohio, Stany Zjednoczone). Aparat ten jest wyposażony w ultraczułą wagę termogravimetryczną (termowagę), na której należy umieścić badaną próbkę (rys. 32). Wraz z kontrolowaną zmianą temperatury w układzie pomiarowym obserwuje się zmianę masy badanej próbki, dokładnie rejestrowaną przez termowagę. Temperatura, w której rozpoczyna się rozkład związków stanowi miarę stabilności termicznej badanej próbki.

Do naczynia pomiarowego wprowadzono 3 mg badanej formułacji, a następnie naczynie umieszczono na ultraczułej termowadze. Jako gaz ochronny wykorzystano wysokiej czystości azot. Temperatura początkowa oraz końcowa pomiaru wynosiły odpowiednio 25 i 500°C, natomiast przyrost temperatury wynosił 10°C/min. Pomiary wykonano podczas stażu naukowego w UCLAN (Preston, Wielka Brytania).



Rys. 32. Analizator termogravimetryczny TGA 1 STAR System. Zdjęcie ze strony producenta [365].

17.8. Badanie kompatybilności koniugatów i przygotowanych formułacji z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej

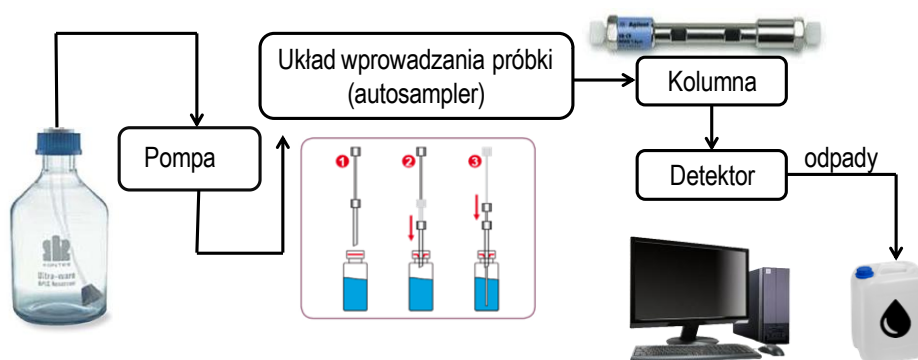
W celu określenia kompatybilności krystalicznych koniugatów kwasu jasmonowego i tetrapeptydu YPFF-NH₂ oraz YYKS-NH₂ z innymi składnikami formułacji kosmetycznej, odważono 10 mg próbki zawierającej dany koniugat w aluminiowym naczyniu. Następnie zamknięto hermetycznie naczynie i umieszczono je w aparacie DSC Q200 (TA Instruments, New Castle, Stany Zjednoczone) przedstawionym na rys. 33. W aparacie znajdowała się także próbka kontrolna (puste, hermetycznie zamknięte naczynie aluminiowe). Pomiary prowadzono w zakresie temperatur od 1 (temperatura początkowa) do 100°C (temperatura końcowa) ze stałym wzrostem temperatury 5°C/min. Szeroki zakres temperatur miał na celu zbadanie kompatybilności jasmonidów i przygotowanych bazowych preparatów w ekstremalnych warunkach przechowywania. Próbkę kontrolną i badaną ogrzewano z taką samą prędkością w czasie trwania całego cyklu pomiarowego. Pomiary wykonano podczas stażu naukowego w UCLAN (Preston, Wielka Brytania).



Rys. 33. Skaningowy kalorymetr różnicowy DSC Q200 (TA Instruments). Zdjęcie ze strony producenta [366].

17.9. Oznaczanie kwasu jasmonowego i jego pochodnych w preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

W ramach pracy doktorskiej opracowano metodykę jakościowego i ilościowego oznaczania badanych kwasu jasmonowego i jego pochodnych w przygotowanych formułacjach z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (*ang.* high-performance liquid chromatography, HPLC). W tym celu wykorzystano chromatograf cieczowy Varian 920-LC (Agilent Technologies Inc., Stany Zjednoczone) wyposażony w automatyczny podajnik próbek oraz detektor UV-Vis. Schemat blokowy wysokosprawnego chromatografu cieczowego został przedstawiony na rys. 34.



Rys. 34. Schemat blokowy wysokosprawnego chromatografu cieczowego.

17.9.1. Dobór warunków analizy HPLC

W badaniach oznaczania jasmonidów w przygotowanych preparatach z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej ustalono warunki pomiarowe, które zostały przedstawione w tabeli 11.

Tabela 11. Warunki pomiarowe analizy formulacji zawierających jasmonidy metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

PARAMETRY ANALIZY BADANYCH FORMULACJI METODĄ HPLC	
Kolumna chromatograficzna	Zorbax SB-C18 (250×4,6mm; 50 μm)
Elucja	Gradientowa (100→0% A, 0→100% B; 6%/min)
Fazy	Faza A: woda+0,1%w/w TFA Faza B: acetonitryl+0,1% w/w TFA
Prędkość przepływu fazy ruchomej	1,0 mL/min
Objętość dozowanych próbek	10 μL
Detekcja	UV-Vis

17.9.2. Sporządzenie krzywych kalibracyjnych

W pracy przygotowano krzywe kalibracyjne dla wszystkich badanych związków. W tym celu sporządzono roztwory wzorcowe każdej analizowanej substancji poprzez rozpuszczenie jej odpowiedniej ilości (1, 2, 3, 4 oraz 5 mg) w 1 mL etanolu. Następnie przesączono otrzymane roztwory przez filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,45 μm i umieszczono je w szklanych fiolkach do analizy HPLC. Przygotowywanie krzywej kalibracyjnej było jednoznaczne z ustaleniem czasu retencji oraz analitycznej długości fali (λ_{\max}) każdej z badanych substancji (tabela 12). Parametr λ_{\max} opisuje charakterystyczną długość fali, przy której absorbancja promieniowania przez dany związek jest największa.

Tabela 12. Analityczna długość fali λ_{\max} badanych jasmonidów.

BADANY ZWIĄZEK	ANALITYCZNA DŁUGOŚĆ FALI λ_{\max} (nm)
JA	292
MeJ	292
MeDHJ	290
JA-YPFF-NH ₂	279
JA-YYKS-NH ₂	279

17.9.3. Przygotowanie próbek do analizy HPLC

W celu oznaczenia jakościowego i ilościowego jasmonidów metodą HPLC odważono 1 g badanej formulacji zawierającej jasmonid. Następnie rozpuszczono naważkę preparatu w 10 mL 96% etanolu. Układ energicznie mieszano do momentu całkowitego rozpuszczenia próbki. Następnie przesączono otrzymany roztwór przez filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,45 μm. Z otrzymanego przesącza odmierzone dokładnie 1 mL i umieszczono go w szklanej fiole do analizy HPLC. W celu oceny potencjalnego wpływu podłoża kosmetycznego na wyniki analizy, w analogiczny sposób przygotowano także próbki przygotowanych baz kosmetycznych bez dodatku jasmonidów.

17.9.4. Walidacja metody analitycznej

Przed rozpoczęciem analizy HPLC przygotowanych preparatów przeprowadzono walidację opisaną powyżej metody analitycznej. W celu określenia powtarzalności metody, każdą z przygotowanych próbek poddano serii trzech pomiarów, a następnie obliczono odchylenie standardowe. Ponadto, w oparciu o obliczone wartości współczynnika korelacji R^2 dla każdej z krzywych kalibracyjnych zdeterminowano liniowość metody. Specyficzność metody została potwierdzona poprzez porównanie czasów retencji pików uzyskanych dla badanych próbek z czasami retencji wzorców. Pełna kalibracja powtarzana była co trzydzieści nastrzyków. Wyznaczono również parametry LOD i LOQ opracowanej metody

analitycznej. LOD (*ang.* limit of determination) jest to najmniejsze stężenie (lub ilość) substancji, które można wykryć przy użyciu danej metody analitycznej z określonym prawdopodobieństwem. Przyjmuje się, że wartość LOD jest równa trzykrotności poziomu szumów zarejestrowanych podczas analizy ślepej próby. Parametr LOQ (*ang.* limit of quantification) oznacza z kolei najmniejsze stężenie (lub ilość) substancji, które można ilościowo oznaczyć za pomocą danej procedury analitycznej przy użyciu danej metody analitycznej z określoną dokładnością i precyzją. Wartość parametru LOQ jest najczęściej określana jako trzykrotna wartość parametru LOD (LOQ = 3 LOD) [367].

17.9.5. Obliczenie zawartości jasmonidów w analizowanych próbkach

Obliczenie zawartości jasmonidów w analizowanych próbkach przeprowadzono w oparciu o funkcję liniową wyznaczonych krzywych kalibracyjnych zgodną z równaniem (11):

$$y=a+bx, \quad (11)$$

gdzie:

a - współrzędna punktu przecięcia z osią y,
b - współczynnik kierunkowy.

17.10. Badanie kinetyki uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych z przygotowanych formułacji kosmetycznych

W pracy zbadano także kinetykę uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych z przygotowanych formułacji kosmetycznych. W tym celu wykorzystano aparat dyfuzyjny 708-DS (Agilent Technologies, CA, Stany Zjednoczone), wyposażony w spektrofotometr UV-Vis Cary 50 Bio (Varian, Stany Zjednoczone).

17.10.1. Dobór membrany dializacyjnej

W badaniach stosowano membranę wykonaną z polimeru naturalnego będącego specjalnym typem celulozy o nazwie Cuprophan. To ultracienka membrana o grubości 7-17 μm oraz wartości obciążenia 7-17 kDa. Dużą zaletą membrany Cuprophan jest małe ryzyko perforacji ze względu na wysoką sprężystość materiału, z którego wykonano membranę. Na kilka godzin przed każdorazowym rozpoczęciem analizy kondycjonowano membranę w roztworze akceptorowym.

17.10.2. Preparatyka płynu akceptorowego

Do badań kinetyki uwalniania jasmonidów z przygotowanych formułacji wykorzystano roztwór akceptorowy będący mieszaniną 96% etanolu oraz buforu fosforanowego o pH równym 5,8 (35:65, v/v). W celu przygotowania buforu fosforanowego w szklanej zlewce odważono 32,5 g diwodorofosforanu(V) potasu (KH_2PO_4) i rozpuszczono naważkę w 2000 mL wody demineralizowanej. W oddzielnym naczyniu rozpuszczono 8 g wodorotlenku sodu (NaOH) w 2000 mL wody demineralizowanej. Bufor fosforanowy sporządzono przez połączenie 1464 mL roztworu NaOH z przygotowanym wcześniej roztworem KH_2PO_4 . Po dokładnym zmieszaniu składników buforu zmierzono jego wartość pH, która wyniosła 5,8.

17.10.3. Przygotowanie próbek do badań

Odważono 1 g otrzymanych formułacji zawierających kwas jasmonowy oraz jego pochodne i następnie umieszczono je w 6 niezależnych komorach ekstrakcyjnych (rys. 35). Wygładzono powierzchnię preparatu, a następnie nałożono membranę dializacyjną o kształcie dopasowanym do komory ekstrakcyjnej. Całość zabezpieczono nakrętką w celu unieruchomienia preparatu i membrany. W analogiczny sposób przygotowano także próbkę

odniesienia formułacji, niezawierającą substancji aktywnej, w celu wyeliminowania sygnałów pochodzących od bazy preparatu. Baza kosmetyczna powinna być tak dobrana, by nie uwalniać żadnych substancji absorbujących promieniowanie w tym samym zakresie fal, co badany jasmonid (tabela 12). Należy uwzględnić fakt, że nawet niewielkie sygnały pochodzące od bazy mają znaczny wpływ na wyniki uwalniania, co należy wziąć pod uwagę wykonując ślepe próby. Wszystkie elementy komory ekstrakcyjnej są wykonane z teflonu, który jest chemicznie bierny względem badanych formułacji, jak również roztworu akceptorowego, w którym prowadzi się badania.



Rys. 35. Teflonowe komory ekstrakcyjne wykorzystywane w badaniach kinetyki uwalniania substancji.

17.10.4. Budowa i przygotowanie aparatury do badania kinetyki uwalniania substancji aktywnych

Aparat dyfuzyjny 708-DS (Agilent Technologies, CA, Stany Zjednoczone) jest wyposażony wężnią wodną oraz termostatem do utrzymywania stałej temperatury wody znajdującej się w łaźni (rys. 36). Zawiera także ruchomą głowicę, której elementem są mieszadła wykonane ze stali nierdzewnej opuszczane mechanicznie do 8 szklanych naczyń o pojemności 200 mL. Ruch obrotowy mieszadeł w trakcie trwania pomiaru zapewnia jednorodność medium na całej wysokości naczynia. Działanie aparatu dyfuzyjnego zostało zwalidowane mechanicznie (brak rozbieżności położenia mieszadeł dla wszystkich ośmiu naczyń). Aparat dyfuzyjny jest skorelowany ze spektrofotometrem UV-Vis. Ilość uwolnionej substancji jest obliczana w oparciu o pomiar zmian absorbancji w czasie zgodnie z prawem Lamberta-Beera, przedstawionym w równaniu (12):

$$A = \varepsilon \times C \times l, \quad (12)$$

gdzie:

A - absorbancja (j.u.),

ε - molowy współczynnik absorpcji (L / mol × cm),

C - stężenie (mol/L),

l - grubość warstwy absorbującej (cm).

Przepływ medium zawierającego uwolnioną substancję pomiędzy spektrofotometrem, a szklanymi naczyniami zawierającymi komory pomiarowe zapewnia pompa. Do 6 naczyń wprowadzono płyn akceptorowy oraz komory ekstrakcyjne z badanym preparatem. Pozostałe dwa naczynia wypełniono płynem akceptorowym oraz roztworem wzorcowym badanego jasmonidu. Parametry pomiaru ustawiono zgodnie z danymi przedstawionymi w tabeli 13.

Tabela 13. Parametry badania uwalniania jasmonidów z przygotowanych preparatów.

PARAMETR POMIARU	WARTOŚĆ PARAMETRU
Temperatura łaźni wodnej	32,3±0,5°C
Prędkość obrotowa łopatek	100 obr./min
Czas trwania badania	24 godziny
Interwał czasowy pobierania próbek do analizy spektralnej	30 minut

Procent uwolnienia substancji z przygotowanych formułacji obliczono w oparciu o następujące równanie (13):

$$\% \text{ uwolnienia} = \left(\frac{A_p}{A_w} \right) \left(\frac{m_w [\text{mg}] \times P_w}{V_w} \right) \left(\frac{1}{D_w} \right) \left(\frac{V_p [\text{mL}]}{m_p [\text{mL}]} \right) \times 100\% , \quad (13)$$

gdzie:

A_p - absorbancja próbki (j.u.),

A_w - absorbancja wzorca (j.u.),

m_w - masa wzorca (mg),

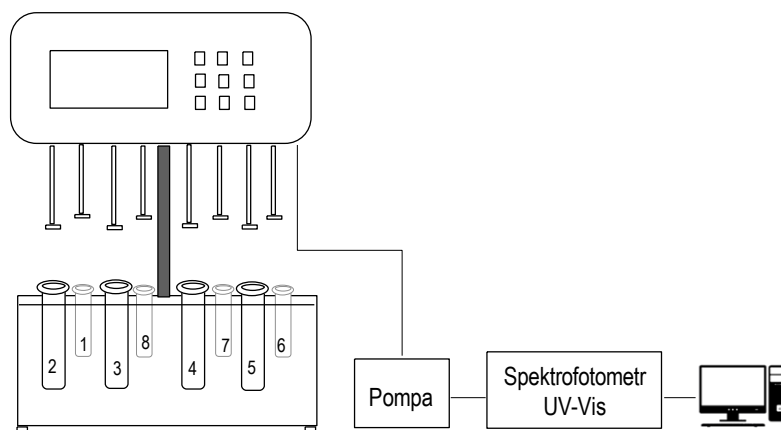
V_w - objętość roztworu wzorcowego (mL),

P_w - czystość wzorca,

D_w - rozcieńczenie wzorca,

m_p - masa substancji oznaczanej zawartej w próbce (mg),

V_p - objętość medium (mL).



Rys. 36. Schemat aparatu dyfuzyjnego 708-DS połączony ze spektrofotometrem UV-Vis i komputerem.

17.10.5. Dopasowanie modelu kinetycznego do profilu uwalniania substancji aktywnych

Otrzymane wyniki badań zaprezentowano na wykresie przedstawiającym procent uwolnionej substancji aktywnej w funkcji czasu. Następnie przeprowadzono ocenę dopasowania wybranych modeli kinetycznych (0-go rzędu, I-go rzędu, Higuchiego oraz Korsmeyera-Peppasa - paragraf 8.2) do otrzymanych profili uwalniania badanych jasmonidów. Stopień dopasowania modelu do krzywej uwalniania oceniono w oparciu o wyznaczony współczynnik korelacji R^2 . W tabeli 14 przedstawiono parametry współrzędnych dla graficznej prezentacji kinetycznych modeli uwalniania substancji aktywnych.

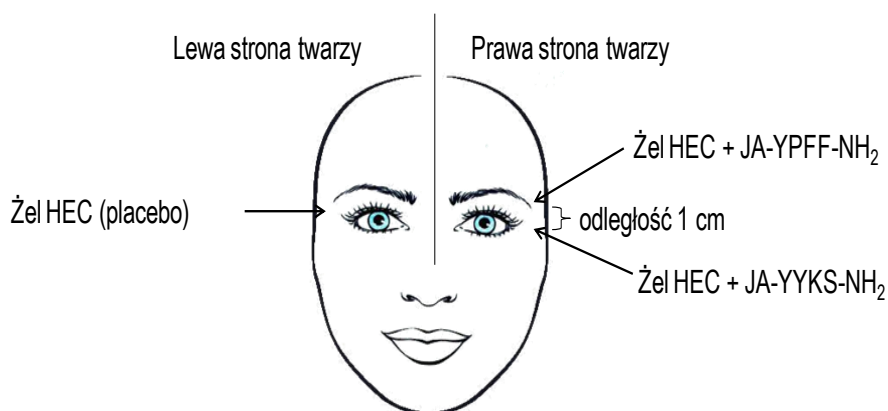
Tabela 14. Graficzne parametry przestrzeni liniowej doprezentacji kinetycznych modeli uwalniania substancji aktywnych [368].

MODEL KINETYCZNY	OŚ Y	OŚ X
0-go rzędu	Ilość uwolnionej substancji (%)	Czas (h)
1-go rzędu	Logarytm z ilości niewolnionej substancji (%)	Czas (h)
Higuchiego	Ilość uwolnionej substancji (%)	Czas ^{1/2} (h)
Korsmeyera-Peppasa	Logarytm z ilości uwolnionej substancji (%)	Logarytm z czasu (h)

17.11. Badania *in vivo* efektywności działania przygotowanych formułacji zawierających pochodne kwasu jasmonowego

W pracy zbadano także efektywność działania przygotowanych formułacji zawierających pochodne JA. Do badań *in vivo* wybrano nowo otrzymane koniugaty JA-YPPF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂. Pracę badawczą rozpoczęto po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej (zał. 1). Badania przeprowadzono na grupie 30 probantek w przedziale wiekowym 25-60 lat. Przed rozpoczęciem badań wszystkie probantki zostały szczegółowo poinformowane o celu i przebiegu badań, a także wyraziły pisemną zgodę na udział w badaniach (wzór - zał. 2). Ponadto, każda osoba biorąca udział w badaniu otrzymała pisemną instrukcję stosowania preparatów (zał. 3) oraz ankietę, którą probanci wypełnili po zakończeniu badań (zał. 4). Na podstawie wyników ankiety określono stopień zadowolenia probantów z działania pielęgnacyjnego stosowanych preparatów.

Badane preparaty były aplikowane przez probantki jeden raz na dobę przez okres 4 tygodni na występujące w okolicy oczu zmarszczki mimiczne, tak zwane „kurze łapki” (zgodnie ze schematem przedstawionym na rys. 37). W badaniach przeprowadzono również ślełą próbę (baza żelu HEC) w celu wyeliminowania wpływu składników bazy kosmetycznej na otrzymane wyniki badań. W celu otrzymania wiarygodnych wyników badane osoby nie stosowały we wskazanym obszarze skóry żadnych innych preparatów pielęgnacyjnych oraz leczniczych.



Rys. 37. Schemat aplikacji badanych preparatów.

Przed przystąpieniem do testów na żywym organizmie, oszacowano potencjalne szkodliwe działanie badanych związków na skórę z wykorzystaniem aplikacji Toxtree. Następnie, w celu oceny profilu działania oraz skuteczności testowanych preparatów na skórę probantek, prowadzono badania zmian poziomu transepidermalnej utraty wody, elastyczności oraz nawilżenia skóry przez okres trwania badań. W badaniu każdego wspomnianego parametru skóry wykonano serię 10 pomiarów, a wynik końcowy przedstawiono w postaci obliczonej wartości średniej. Badanie te prowadzono w temperaturze 23±1°C oraz wilgotności powietrza

69±2%. Do badań wykorzystano przedstawiony na rys. 38 zespół sond MPA Courage + Khazaka electronic (GmbH, Cologne, Germany) złożony z tewametr (Tewameter® TM 300), kutometru (Cutometer® 580) oraz korneometru (Corneometer® CM 825). Zespół sond jest połączony z komputerem, który prezentuje otrzymane wyniki w postaci cyfrowej.



Rys. 38. Zespół sond MPA Courage + Khazaka electronic.

Otrzymane wyniki badań poziomu TEWL, nawilżenia oraz elastyczności skóry zostały porównane w obrębie grupy (analiza zmian wartości badanego parametru po 1, 2, 3 oraz 4 tygodniach aplikacji tego samego preparatu) oraz pomiędzy grupami (analiza różnic wartości danego parametru wskutek działania różnych formułacji po 1, 2, 3 oraz 4 tygodniach ich aplikacji).

W celu dopasowania odpowiednich testów statystycznych do analizy otrzymanych wyników przeprowadzono test Shapiro-Wilka. Do analizy parametru nawilżenia oraz elastyczności w obrębie danej grupy wykorzystano analizę wariancji ANOVA [369], podczas gdy do analizy parametru TEWL wykorzystano test Friedmana [370,371]. Wspomniane testy pozwalają uzyskać ogólną informację na temat występowania różnic statystycznie istotnych pomiędzy wynikami w obrębie danej grupy. W celu wykazania szczegółowych różnic w wynikach badań w poszczególnych tygodniach ich trwania wykonano porównania wielokrotne, tzw. „testy post-hoc”. Do analizy nawilżenia i elastyczności wybrano test Tukey’a, natomiast zmiany parametru TEWL analizowano z wykorzystaniem testu wielokrotnych porównań średnich rang dla wszystkich prób (tzw. test Dunna). Podobnie, jak w przypadku porównywania wyników w obrębie grup, analizę statystyczną średnich wyników nawilżenia oraz elastyczności pomiędzy grupami rozpoczęto od analizy wariancji ANOVA (test parametryczny), natomiast analizę statystyczną otrzymanych wyników pomiarów TEWL rozpoczęto od przeprowadzenia nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa. W celu porównywania wyników w obrębie grup, w dalszym toku analizy statystycznej przeprowadzono „testy post-hoc” (nawilżenie i elastyczność – test Tukey’a, transepidermalna utrata wody - test Dunna), mające na celu określenie, pomiędzy którymi grupami występują wspomniane różnice. Testy statystyczne, wykorzystane do analizy otrzymanych wyników badań zostały wybrane w oparciu o dostępne dane literaturowe [372,373,374].

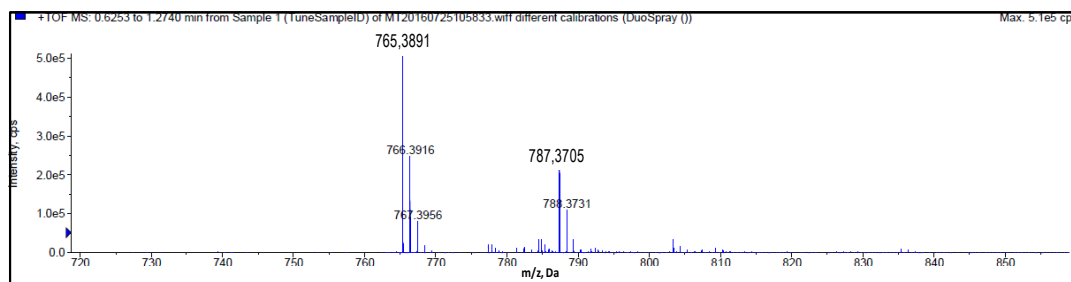
WYNIKI BADAŃ I DISKUSJA

18. Badanie struktury otrzymanych pochodnych kwasu jasmonowego

Struktury otrzymanych dwóch pochodnych kwasu jasmonowego (koniugatów JA-YPFF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂) potwierdzono za pomocą następujących metod spektroskopowych: ESI-MS, FTIR oraz NMR.

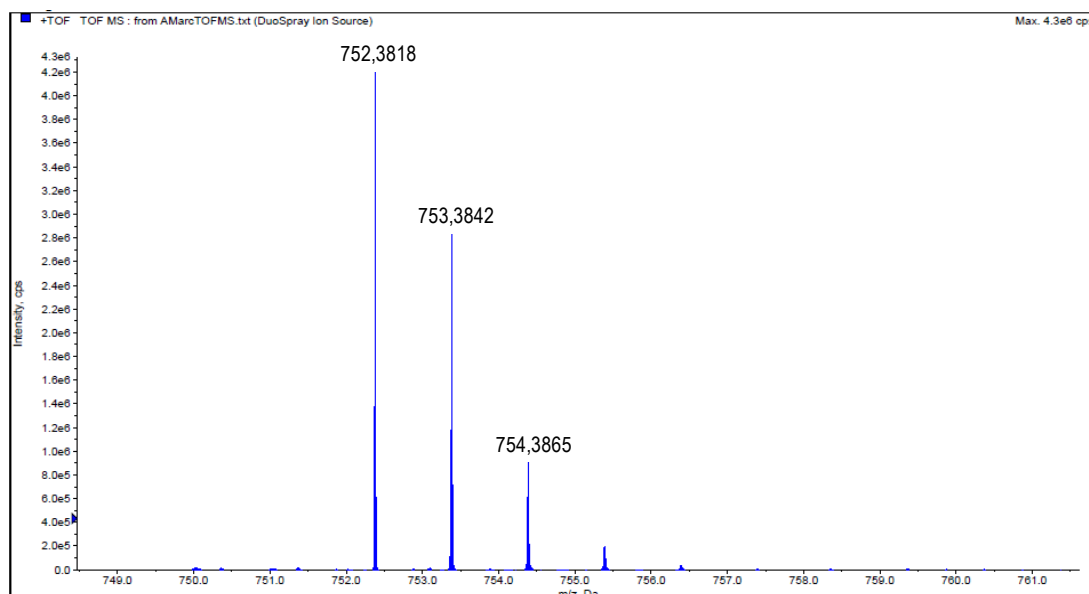
18.1. Spektrometria mas ESI-MS

Teoretyczna masa cząsteczkowa badanych koniugatów ($M_{\text{JA-YPFF-NH}_2} = 764$ Da oraz $M_{\text{JA-YYKS-NH}_2} = 751$ Da) została potwierdzona z wykorzystaniem spektrometrii mas ESI-MS. Na rys. 39 przedstawiono otrzymane widmo MS koniugatu JA-YPFF-NH₂. Na widmie powstałym w dodatnim trybie jonizacji odnotowano układ pików izotopowych. Pik o największej intensywności nazywany jest pikiem monoizotopowym i pochodzi od jonu pseudomolekularnego $[M+H]^+$ o wartości m/z równej 765,39 Da, powstałego w wyniku protonowania cząsteczki koniugatu głównie przez najlżejszy z izotopów wodoru - prot (¹H). Kolejne piki izotopowe są przesunięte o m/z kolejnych izotopów (gdzie m jest masą izotopu). W związku z powyższym zaobserwowano pik pochodzący od jonu zawierającego w swoim składzie przewagę atomów deuteru ²H ($m/z = 766,39$ Da) oraz trytu ³H ($m/z = 767,40$ Da). Ponadto, przy m/z 787,37 Da zaobserwowano także sygnały pochodzące od jonu $[M+Na]^+$ powstałego w wyniku asocjacji kationu sodowego do cząsteczki JA-YPFF-NH₂.



Rys. 39. Widmo ESI-MS koniugatu JA-YPFF-NH₂.

Na rys. 40 przedstawiono widmo MS koniugatu JA-YYKS-NH₂ prezentujące rozkład jonów izotopowych protonowanej cząsteczki związku. Zaobserwowano pik monoizotopowy $[M+H]^+$ o wartości m/z równej 752,38 Da (¹H) oraz piki izotopowe pochodzące od jonu zawierającego w swoim składzie przewagę atomów deuteru ²H ($m/z = 753,38$ Da) oraz trytu ³H ($m/z = 754,39$ Da).

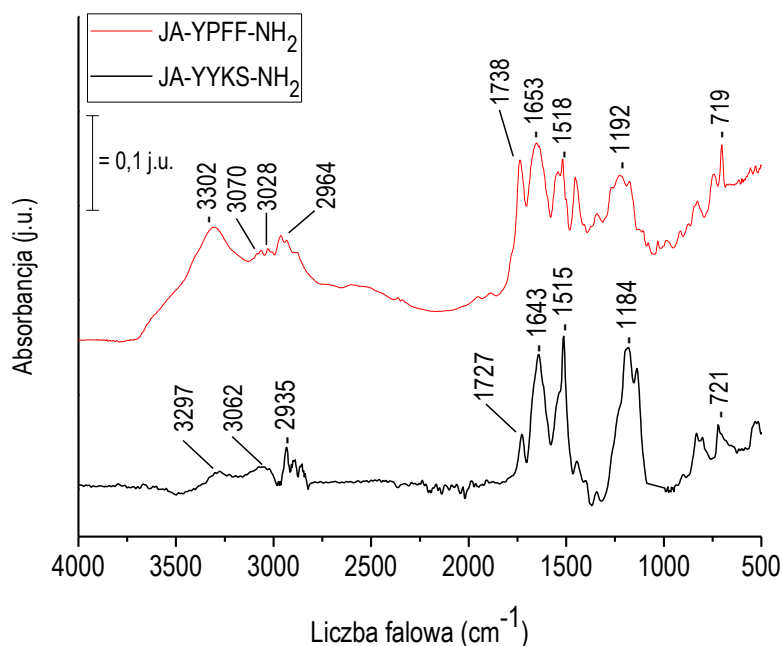


Rys. 40. Widmo ESI-MS koniugatu JA-YYKS-NH₂.

PODSUMOWUJĄC, z wykorzystaniem spektrometrii mas ESI-MS potwierdzono teoretyczną masę cząsteczkową otrzymanych koniugatów. Dla obu badanych związków zaprezentowano widmo MS powstałe w dodatnim trybie jonizacji. Wartości m/z pików obecnych na widmie danego związku były zgodne z zakładaną masą kalkulowaną w oparciu o jego strukturę.

18.2. Spektroskopia FTIR

Za pomocą spektroskopii FTIR potwierdzono obecność charakterystycznych grup funkcyjnych badanych koniugatów (JA-YPPF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂). Na rys. 41 przedstawiono widmo absorpcyjne obu związków. Zaobserwowano obecność pasm absorpcji w zakresie 3302-3297 cm⁻¹, pochodzących od drgań rozciągających O-H grupy hydroksylowej. Stwierdzono również obecność pasma 3028 cm⁻¹ pochodzącego od drgań rozciągających =C-H. Pasma w zakresie 1727-1738 cm⁻¹ świadczą o obecności grupy karbonylowej C=O, natomiast pasma w zakresie 1643-1653 cm⁻¹, jak również 3062-3070 cm⁻¹ są charakterystyczne dla drgań rozciągających C-N. Na przedstawionych widmach można zauważyć również obecność pasm w zakresie 1515-1518 cm⁻¹ oraz 2935-2964 cm⁻¹, świadczących odpowiednio o obecności wiązań C=C oraz C-H, obecnych w pierścieniach aromatycznych. Ponadto, zidentyfikowano również obecność pasm w zakresie 1192-1184 cm⁻¹ pochodzących od drgań zginających wiązania =C-H w płaszczyźnie, jak również 719-721 cm⁻¹, pochodzących od drgań zginających wiązania =C-H poza płaszczyznę [375,376].



Rys. 41. Widma FTIR koniugatów JA-YPPF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂.

W tabeli 15 zestawiono położenie charakterystycznych pasm absorpcji dla obu analizowanych koniugatów.

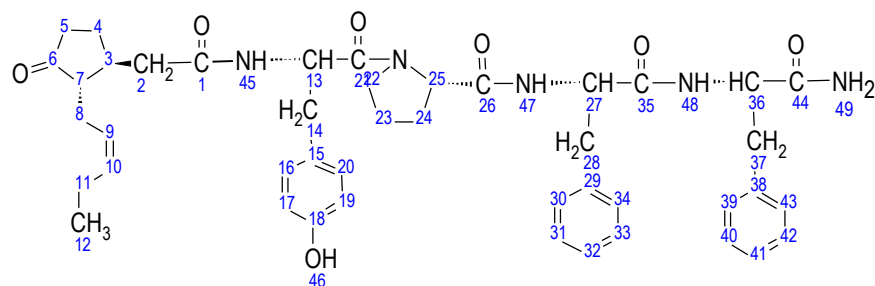
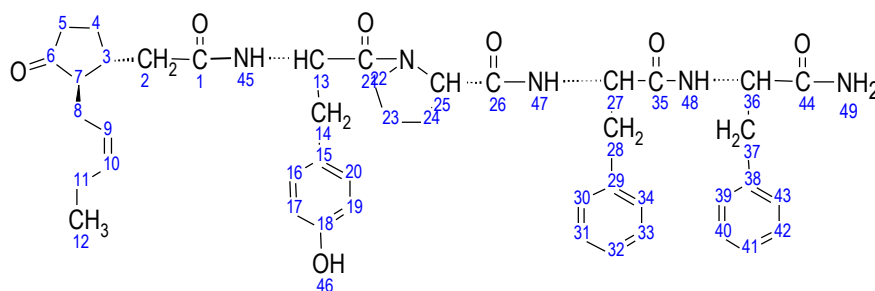
Tabela 15. Położenie charakterystycznych pasm absorpcji w podczerwieni dla koniugatów.

LICZBA FAŁOWA [CM ⁻¹]	RODZAJ WIĄZANIA	TYP DRGANIA
3302-3297	O-H	Rozciągające
3070-3062	C-N	Rozciągające
3028	=C-H	Rozciągające
2964-2935	C-H (aromatyczne)	Rozciągające
1738-1727	C=O	Rozciągające
1653-1643	C-N	Rozciągające
1518-1515	C=C (aromatyczne)	Rozciągające
1192-1184	=C-H	Zginające (w płaszczyźnie)
719-721	=C-H	Zginające (poza płaszczyznę)

PODSUMOWUJĄC, za pomocą spektroskopii FTIR potwierdzono obecność charakterystycznych grup funkcyjnych badanych koniugatów (JA-YPPF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂). Przypisano również typy drgań do każdego zidentyfikowanego pasma na widmie badanej substancji aktywnej.

18.3. Spektroskopia NMR

W celu potwierdzenia teoretycznej struktury badanych jasmonidów wykorzystano spektroskopię magnetycznego rezonansu jądowego. Ze względu na dobrze poznaną strukturę związków JA, MeJ oraz MeDHJ w pracy przeprowadzono analizę widm jednowymiarowych (1D) oraz dwuwymiarowych (2D) NMR wyłącznie nowo zsyntetyzowanych pochodnych kwasu jasmonowego - koniugatów JA-YPPF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂. Na rys. 42 przedstawiono wzory strukturalne stereoizomerów (-)-JA-YPPF-NH₂ oraz (+)-JA-YPPF-NH₂ wraz z numeracją atomów węgla i wodoru.

(-)-JA-YPFF-NH₂(+)JA-YPFF-NH₂

Rys. 42. Wzory strukturalne stereoisomerów (-)-JA-YPFF-NH₂ oraz (+)-JA-YPFF-NH₂ wraz z numeracją atomów węgla i wodoru.

W oparciu o analizę widm 1D ¹³C NMR (zał. 5), 1D ¹H NMR (zał. 6) oraz 2D ¹H - ¹³C HSQC (zał. 7) koniugatu kwasu jasmonowego oraz tetrapeptydu YPFF przypisano poszczególne sygnały do odpowiednich atomów cząsteczki koniugatu.

Stereoizomer 1

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δH 0,90 (3H, t, H-12), 1,29 (2H,m, H-4), 1,62 (2H,br, H-23), 1,70-1,78 (1H,m,H-7), 1,85 (2H,br, H-24), 1,98 (2H, quint, H-11), 2,01-2,06 (2H, m, H-2), 2,24 (2H, br, H-8), 2,27 (1H, br, H-3), 2,47 (2H, br, H-5), 2,89 (2H, br, H-28), 2,96 (2H, br, H-37), 3,19 (2H, br, H-14), 3,67 (2H, br, H-22), 4,37 (1H, br, H-25), 4,70 (1H, br, H-27), 4,78 (1H, br, H-36), 4,88 (1H, br, H-13), 5,14-5,20 (1H, m, H-9), 5,33-5,48 (1H, m, H-10), 6,61-6,83 (2H, m, H-16, H-20), 6,94 (2H, br, H-17,H-19), 7,03-7,26 (10H, m, H-30-H-34 and H-39-H-43), 7,31 (1H, s, H-45), 7,53 (1H, s, H-48), 7,93 (1H, s, H47).

¹³C NMR (CDCl₃, 600 MHz): δC 14,06 (C-12), 20,52 (C-11), 24,55 (C-23), 25,36 (C-8), 26,60 (C-4), 28,55 (C-24), 37,15 (C-14), 37,57 (C-2), 38,16 (C-37), 38,29 (C-28), 38,82 (C-3), 40,2 (C-37), 40,50 (C-5), 47,66 (C-22), 52,29 (C-13), 53,98 (C-36), 53,76 (C-7), 54,55 (C-27), 60,55 (C-25), 115,70 (C-17, C-19), 124,79 (C-9), 125,72-129,15 (C-30-C-34, C-39-C-43), 129,37 (C-15), 130,50 (C-16, C-20), 134,02 (C-10), 135,85 (C-29, C-38), 155,81 (C-18), 171,22 (C-26), 171,58 (C-35), 172,01 (C-21), 172,12 (C-44), 173,39 (C-1), 220,30 (C-6).

Stereoizomer 2

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δH 0,86 (3H, t, H-12), 1,29 (2H,m, H-4), 1,62 (2H,br, H-23), 1,70-1,78 (1H,m,H-7), 1,85 (2H,br, H-24), 1,98 (2H, quint, H-11), 2,01-2,06 (2H, m, H-2), 2,24 (2H,br, H-8), 2,27 (1H, br, H-3), 2,47 (2H, br, H-5), 2,89 (2H, br, H-28), 2,96 (2H, br, H-37), 3,19 (2H, br, H-14), 3,52 (2H, br, H-22), 4,37 (1H, br, H-25), 4,70 (1H, br, H-27), 4,78 (1H, br, H-36), 4,88 (1H, br, H-13), 5,23-5,30 (1H, m, H-9), 5,33-5,48 (1H, m, H-6), 6,61-6,83 (2H, m, H-16, H-20), 6,94 (2H,br, H-17,H-19), 7,03-7,26 (10H, m, H-30-H-34 and H-39-H-43), 7,31 (1H, s, H-45), 7,53 (1H, s, H-48), 7,93 (1H, s, H47).

¹³C NMR (CDCl₃, 600 MHz): δC 14,13 (C-8), 20,52 (C-11), 24,57 (C-23), 25,39 (C-8), 26,76 (C-4), 28,55 (C-24), 37,26 (C-14), 37,66 (C-2), 38,16 (C-37), 38,29 (C-28), 38,82 (C-3), 40,2 (C-37), 40,60 (C-5), 46,83 (C-22), 52,34 (C-13), 54,08 (C-36), 53,66 (C-7), 54,60 (C-27), 60,55

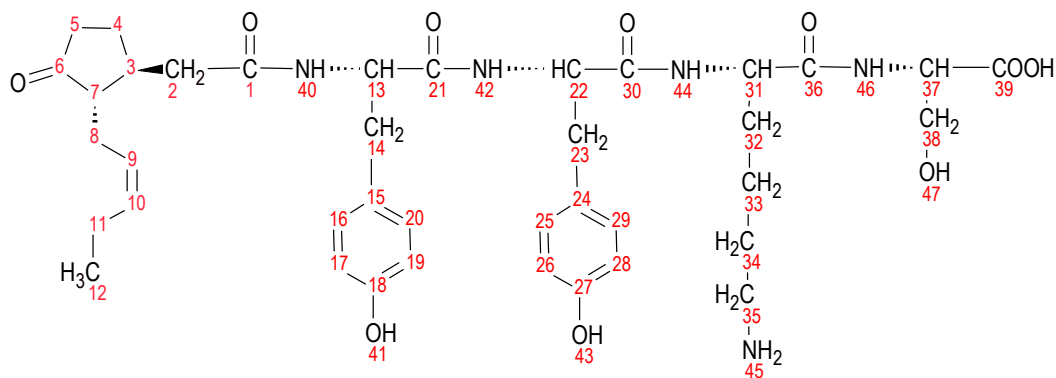


(C-25), 115,95 (C-17, C-19), 124,94 (C-9) 125,72-129,15 (C-30-C-34, C-39-C-43), 129,41 (C-15), 130,38 (C-16, C-20), 134,09 (C-10), 136,18 (C-29, C-38), 156,28 (C-18), 171,22 (C-26), 171,58 (C-35), 172,01 (C-21), 172,12 (C-44), 173,52 (C-1), 220,10 (C-6).

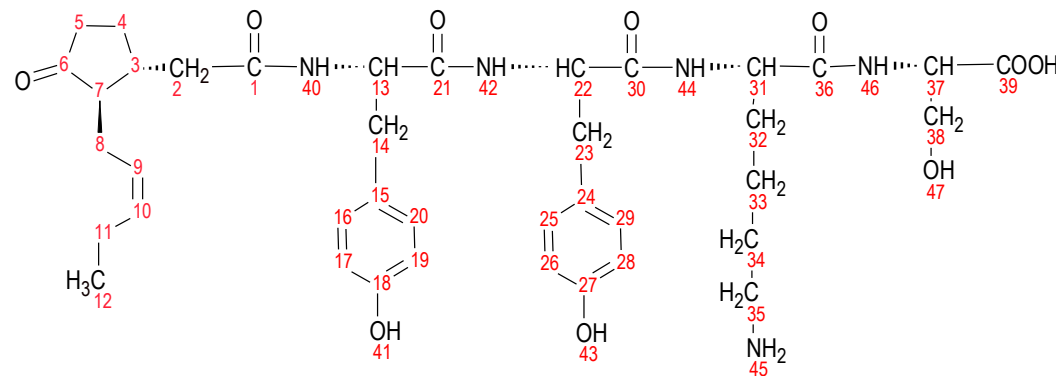
W oparciu o analizę otrzymanego widma 1D oraz 2D ^{13}C NMR koniugatu JA-YPFF- NH_2 stwierdzono, że położenie sygnałów w zakresie 171,22-220,30 ppm jest charakterystyczne dla estrowej grupy karbonylowej (C=O), położenie sygnałów w zakresie 155,81-171,22 ppm jest charakterystyczne dla wiązań pojedynczych węgiel-tlen (C-O), natomiast położenie sygnałów w zakresie 115,70-136,18 ppm jest charakterystyczne dla wiązań pojedynczych oraz podwójnych węgiel-węgiel (C-C oraz C=C) w obrębie pierścieni aromatycznych.

Na rys. 43 przedstawiono wzory strukturalne stereoizomerów (-)-JA-YYKS- NH_2 oraz (+)-JA-YYKS- NH_2 wraz z numeracją atomów węgla i wodoru. Następnie, w oparciu o analizę widma 1D ^{13}C NMR (zał. 8), 1D ^1H NMR (zał. 9) oraz 2D ^1H - ^{13}C HSQC (zał. 10) badanego koniugatu przypisano poszczególne sygnały do odpowiednich atomów cząsteczki koniugatu.

(-)-JA-YYKS- NH_2



(+)-JA-YYKS- NH_2



Rys. 43. Wzory strukturalne stereoizomerów (-)-JA-YYKS- NH_2 oraz (+)-JA-YYKS- NH_2 wraz z numeracją atomów węgla i wodoru.

Stereoizomer 1

^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ_{H} 0,95 (3H, t, H-12), 1,16-1,28 (2H, m, H-4), 1,45 (2H, quint, H-33), 1,67 (2H, quint, H-34), 1,78-1,85 (1H, m, H-7), 1,91 (2H, q, H-32), 2,02-2,06 (H-2, m, H-2), 2,07-2,11 (2H, quint, H-11), 2,19 (2H, br, H-8), 2,24-2,31 (1H, m, H-3), 2,50-2,52 (2H, m, H-5), 2,92 (2H, t, H-35), 2,99-3,07 (4H, m, H-14,23), 3,93-3,97 (2H, m, H-38), 4,39-4,44 (1H, m, H-31), 4,47-4,50 (1H, m, H-37), 4,53-4,58 (1H, m, H-13), 4,55-4,59 (1H, m, H-22), 5,19-5,25 (1H, m, H-9), 5,37-5,43 (1H, m, H-10), 6,67-6,71 (4H, m, H-17,19,26,28), 6,98-7,05 (4H, m, H-16,20,25,29).



^{13}C NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ_{C} 14,60 (C-12), 21,58 (C-11), 23,61 (C-33), 26,23 (C-4), 27,64 (C-8), 32,43 (C-34), 37,70 (C-2), 37,72 (C-14, C23), 38,58 (C-32), 39,76 (C-3), 40,61 (C-5), 41,47 (C-35), 54,18 (C-7), 55,43 (C-31), 56,19 (C-37), 56,33 (C-13), 56,36 (C-22), 62,86 (C-38), 116,31 (C-26, 28), 116,38 (C-17, 19), 126,38 (C-9), 128,68 (C-24), 129,13 (C-15), 131,29 (C-25, 29), 131,49 (C-16, 20), 134,79 (C-10), 157,40 (C-18), 162,78 (C-27), 170,07 (C-21), 173,46 (C-30), 173,73 (C-36), 173,96 (C-39), 174,41 (C-1), 221,97 (C-6).

Stereoizomer 1

^1H NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ_{H} 0,93 (3H, t, H-12), 1,16-1,28 (2H, m, H-4), 1,45 (2H, quint, H-33), 1,67 (2H, quint, H-34), 1,78-1,85 (1H, m, H-7), 1,91 (2H, q, H-32), 2,02-2,06 (2H, m, H-2), 2,07-2,11 (2H, quint, H-11), 2,19 (2H, br, H-8), 2,24-2,31 (1H, m, H-3), 2,47-2,49 (2H, m, H-5), 2,92 (2H, t, H-35), 2,99-3,07 (4H, m, H-14,23), 3,83-3,87 (1H, m, H-38), 4,39-4,44 (1H, m, H-31), 4,47-4,50 (2H, m, H-37), 4,51-4,54 (1H, m, H-13), 4,55-4,59 (1H, m, H-22), 5,19-5,25 (1H, m, H-9), 5,37-5,43 (1H, m, H-10), 6,67-6,71 (4H, m, H-17,19,26,28), 6,98-7,05 (4H, m, H-16,20,25,29).

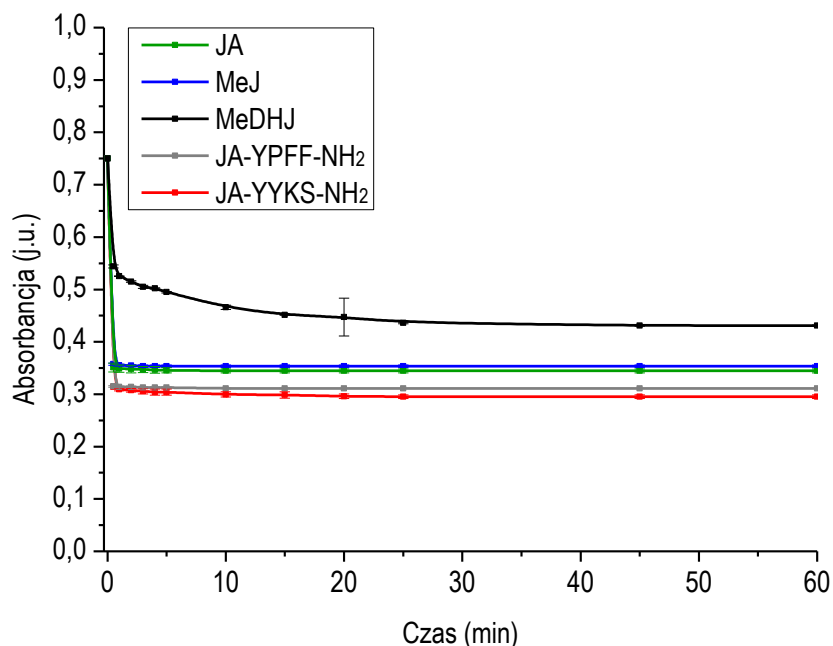
^{13}C NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ_{C} 14,58 (C-12), 21,57 (C-11), 23,47 (C-33), 26,17 (C-4), 27,81 (C-8), 32,43 (C-34), 37,72 (C-2), 37,95 (C-14, C-23), 38,71 (C-32), 39,65 (C-3), 40,61 (C-5), 41,52 (C-35), 54,27 (C-7), 55,45 (C-31), 56,19 (C-37), 56,31 (C-13), 56,36 (C-22), 62,86 (C-38), 116,32 (C-26, 28), 116,38 (C-17, 19), 126,38 (C-9), 128,71 (C-24), 129,13 (C-15), 131,29 (C-25, 29), 131,46 (C-16, 20), 134,72 (C-10), 157,43 (C-18), 162,55 (C-27), 170,23 (C-21), 173,45 (C-30), 173,61 (C-36), 173,98 (C-39), 174,43 (C-1), 221,92 (C-6).

W oparciu o analizę widma 1D oraz 2D ^{13}C NMR koniugatu JA-YYKS-NH₂ stwierdzono, że położenie sygnałów w zakresie 221,97-173,07 ppm jest charakterystyczne dla estrowej grupy karbonylowej (C=O), położenie sygnałów w zakresie 157,40-162,78 ppm jest charakterystyczne dla wiązań pojedynczych węgiel-tlen (C-O), natomiast położenie sygnałów w zakresie 116,32-131,46 ppm jest charakterystyczne dla wiązań podwójnych węgiel-węgiel (C=C).

PODSUMOWUJĄC, w niniejszej pracy doktorskiej potwierdzono teoretyczną strukturę badanych jasmonidów z wykorzystaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego. W oparciu o przedstawione wyniki analizy widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR badanych koniugatów stwierdzono zgodność teoretycznej oraz rzeczywistej struktury cząsteczki JA-YPPF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂.

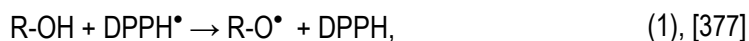
19. Badanie zdolności antyoksydacyjnej kwasu jasmonowego i jego pochodnych z użyciem syntetycznego rodnika DPPH*

W pracy zbadano również potencjał antyoksydacyjny kwasu jasmonowego i jego pochodnych. Jak już wcześniej wspomniano (paragraf 7.4) stosowanie preparatów pielęgnacyjnych zawierających substancje o działaniu antyoksydacyjnym ma istotne znaczenie w ochronie skóry przed działaniem wolnych rodników. Badania rozpoczęto od pomiaru absorbancji przygotowanego roztworu wzorcowego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH*). Badania powtórzone trzykrotnie i otrzymano następujące wartości absorbancji: 0,749, 0,752 oraz 0,751 j.u. Średnia wartość absorbancji (A_0) obliczona z trzech pomiarów wynosiła $0,751 \pm 0,001$ j.u. Po zmieszaniu roztworu DPPH* oraz roztworu wzorcowego badanego jasmonidu prowadzono pomiary zmian jego absorbancji w czasie. Spadek absorbancji roztworu wolnego rodnika jest spowodowany jego reakcją z badanym związkiem i stanowi miarę aktywności przeciwrodnikowej substancji aktywnej. Im większy potencjał antyoksydacyjny danego związku, tym większy spadek absorbancji roztworu DPPH*, odzwierciedlający stopień redukcji wolnego rodnika. Na rys. 44 przedstawiono profile zmian absorbancji roztworu rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu wskutek jego reakcji z badanym jasmonidem.

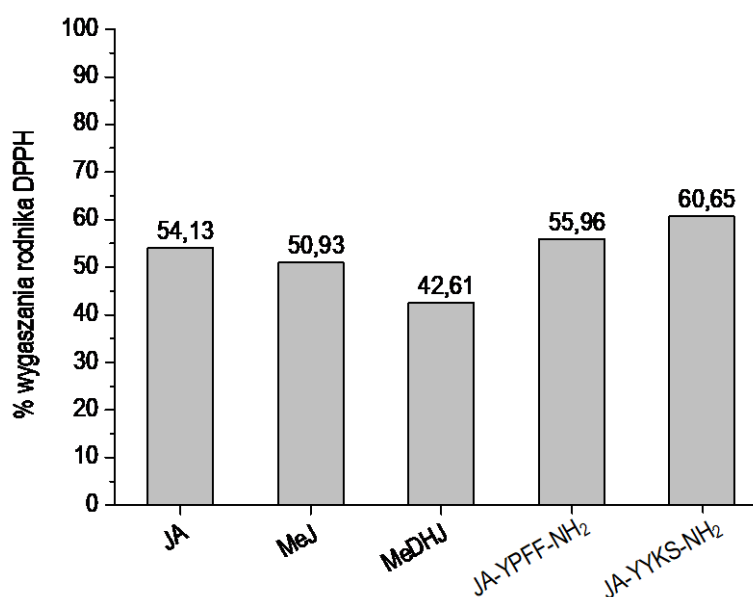


Rys.44. Profile zmian absorbancji roztworu rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu wskutek jego reakcji z kwasem jasmonowym i jego pochodnymi.

Zaobserwowano, że największy spadek absorbancji roztworu DPPH[•] nastąpił wskutek reakcji wolnego rodnika z koniugatem JA-YYKS-NH₂, natomiast najmniejszy - wskutek jego reakcji z dihydrojasmonianem metylu. DPPH[•] jest stabilnym wolnym rodnikiem posiadającym niesparowany elektron na powłoce walencyjnej jednego z atomów azotu, tworzących mostek azotowy. Fioletowe zabarwienie roztworu rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu znika wskutek jego reakcji z cząsteczką, która może być donorem atomu wodoru. Wówczas powstaje zredukowana forma rodnika (DPPH) zgodnie z reakcją (1):



W celu lepszego zobrazowania otrzymanych wyników, obliczono procent wygaszania wolnego rodnika DPPH przez badane jasmonidy. Wyniki przedstawiono na rys.45.



Rys.45. Zdolność wygaszania rodnika DPPH[•] przez badane kwas jasmonowy i jego pochodne.



Potwierdzono, że najlepszą zdolność wygaszania rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu wykazuje JA-YYKS-NH₂ (60,65%). Aktywność przeciwrodnikowa koniugatów jest determinowana m.in. przez rodzaj reszt aminokwasowych zawartych w strukturze [378]. Największą aktywnością antyoksydacyjną charakteryzują się peptydy zawierające w swojej strukturze cząsteczkę histydyny, tyrozyny oraz tryptofanu. Aminokwasy te wykazują zdolność do łatwego odszczepiania wodoru, będącego donorem elektronu w reakcji redukcji wolnego rodnika. Większość peptydów wykazujących aktywność antyoksydacyjną zawiera w swojej budowie wyżej wymienione reszty aminokwasowe [378,379]. Koniugat JA-YYKS-NH₂ zawiera w swojej strukturze dwie cząsteczki L-tyrozyny należącej do grupy związków fenolowych. Związki te wykazują znaczącą aktywność przeciwrodnikową wynikającą z obecności układu sprzężonych wiązań podwójnych oraz grupy hydroksylowej -OH, stanowiącej donor atomu wodoru w reakcji redukcji rodnika DPPH[•]. Nieco mniejszą zdolnością wygaszania rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu wykazał się koniugat JA-YPFF-NH₂ (55,96%) zawierający w swojej budowie tylko jedną cząsteczkę L-tyrozyny. W pracy obliczono również zdolność wygaszania rodnika DPPH[•] dla JA, MeJ oraz MeDHJ, która wynosiła odpowiednio 54,13%, 50,93% oraz 42,61%. Aktywność antyoksydacyjna kwasu jasmonowego jest prawdopodobnie wynikiem obecności grupy karboksylowej, która stanowi donor atomu wodoru w reakcji redukcji rodnika. Grupa ta jest łatwo dostępna dla wolnego rodnika, ponieważ cząsteczka kwasu jasmonowego nie jest zatłoczona przestrzennie. Zdolność MeJ oraz MeDHJ do wygaszania DPPH[•] jest mniejsza w porównaniu z kwasem jasmonowym. Jasmonian metylu oraz dihydrojasmonian metylu mają postać estrów JA, niezawierających w cząsteczce grupy hydroksylowej. Ich zdolność antyoksydacyjna może jednak wynikać ze zjawiska tautomerii keto-enolowej, któremu jasmonidy mogą ulegać w niewielkim stopniu [299,300]. Kwas jasmonowy i jego pochodne mają pośredni wpływ na antyoksydacyjne właściwości ekstraktów roślinnych, bowiem stymulują produkcję związków fenolowych w tkankach rośliny wystawionych na ich wzmożoną ekspozycję. Malekpoor i in. [380] przeprowadzili badania wpływu kwasu jasmonowego na stężenie związków fenolowych, a tym samym potencjału antyoksydacyjnego ekstraktu z liści bazylii *Ocimum basilicum* L. Szczytowe części rośliny zraszano etanolemowym roztworem kwasu jasmonowego przed rozpoczęciem procesu kwitnienia oraz przez dwa tygodnie po jego zakończeniu. Zaobserwowano wzrost stężenia związków fenolowych oraz zdolności wygaszania rodnika DPPH[•] przez ekstrakt roślinny otrzymany z bazylii zraszanej roztworem kwasu jasmonowego w porównaniu z bazylią zraszaną roztworem placebo (woda) [380]. Podobne badania przeprowadzono dla jasmonianu metylu. Wang i in. [381] dowiedli, że ekspozycja owoców woskownicy czerwonej (*Morella rubra* L.) na działanie MeJ spowodowała wzrost zawartości związków fenolowych oraz zdolności wygaszania rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu przez ekstrakt otrzymany z badanego materiału roślinnego. Dotychczas nie znaleziono w dostępnej literaturze danych na temat bezpośredniej aktywności antyoksydacyjnej JA, MeJ oraz MeDHJ.

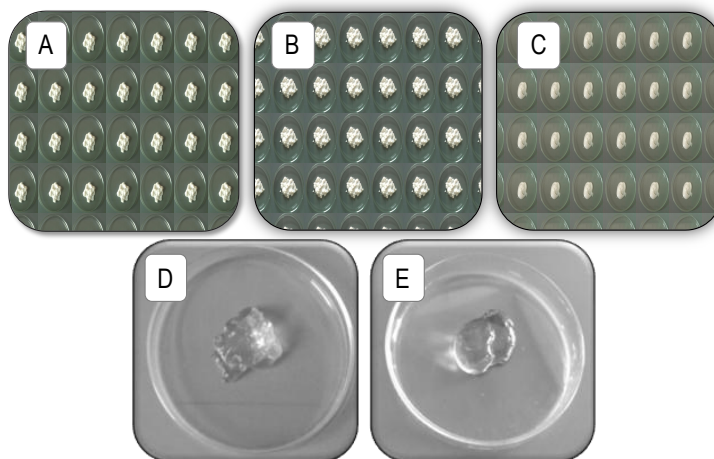
PODSUMOWUJĄC, w oparciu o przeprowadzoną analizę potencjału antyoksydacyjnego jasmonidów i ich pochodnych z wykorzystaniem wolnego rodnika DPPH[•] zaobserwowano, że spośród wszystkich badanych substancji aktywnych, koniugat JA-YYKS-NH₂ wykazał największą, a MeDHJ - najmniejszą aktywność antyoksydacyjną. Stwierdzono, że zdolność wygaszania rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu jest związana z budową cząsteczki substancji aktywnej, a zwłaszcza obecnością układu sprzężonych wiązań podwójnych oraz grupy hydroksylowej stanowiącej donor atomu wodoru w reakcji redukcji wolnego rodnika.

20. Charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych formułacji

20.1. Ocena organoleptyczna

W pracy przeprowadzono ocenę organoleptyczną przygotowanych formułacji. Stwierdzono, że bazy kosmetyczne Emulsji 1, 2 oraz 3 cechowały się jednolitą konsystencją oraz białą

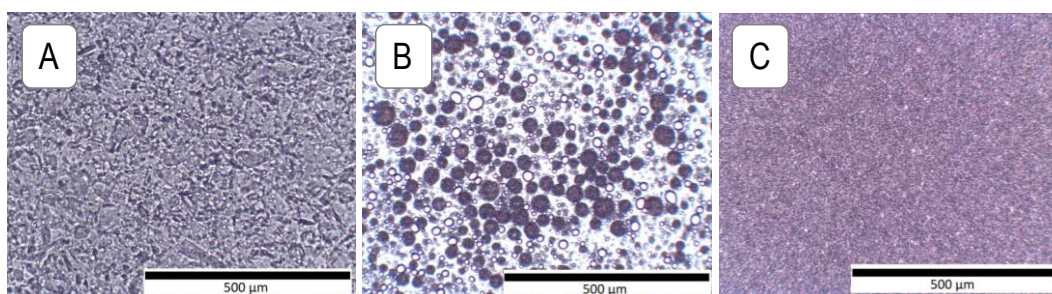
barwą. Preparaty te nie miały wyczuwalnego zapachu. Identyczne obserwacje odnotowano dla wyżej wspomnianych preparatów zawierających badane kwas jasmonowy i jego pochodne. W oparciu o wyniki oceny organoleptycznej stwierdzono zgodność otrzymanych emulsji z Polską Normą BN-77/ 6140-01 [115]. Ponadto, przeprowadzono ocenę organoleptyczną żelu PAA oraz HEC (bazy kosmetyczne oraz żele zawierające jasmonidy i ich pochodne). Stwierdzono, że wszystkie preparaty żelowe były bezbarwne, klarowne i miały przyjemny zapach. Na rys. 46 przedstawiono zdjęcia przygotowanych preparatów: Emulsja 1 (rys. 46A), Emulsja 2 (rys. 46B), Emulsja 3 (rys. 46C), żel PAA (rys. 46D) oraz żel HEC (rys. 46E) zawierających koniugat JA-YPPF-NH₂.



Rys.46. Zdjęcia przygotowanych preparatów zawierających koniugat JA-YPPF-NH₂.

20.2. Określanie typu emulsji metodą mikroskopii optycznej

W pracy określono również typ otrzymanych emulsji kosmetycznych zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. W tym celu wykorzystano mikroskopię optyczną. Badania prowadzono tydzień po przygotowaniu formułacji, w temperaturze 25°C. Dla wszystkich przygotowanych preparatów zawierających poszczególne kwas jasmonowy i jego pochodne otrzymano podobne obrazy mikroskopowe, w związku z czym w niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono wyłącznie obrazy mikroskopowe emulsji zawierających koniugat kwasu jasmonowego i tetrapeptydu YPPF-NH₂.



Rys. 47. Obraz mikroskopowy Emulsji 1 (A), Emulsji 2 (B) oraz Emulsji 3 (C) zawierających koniugat JA-YPPF-NH₂.

Na rys. 47A przedstawiono Emulsję 1 zawierającą koniugat JA-YPPF-NH₂. Zaobserwowano zabarwienie kropli fazy wodnej emulsji, w której rozproszone są niezabarwione krople fazy tłuszczowej. Zabarwienie to pochodzi od barwnika (oranżu metylowego), wykorzystanego w niniejszych badaniach. Potwierdzono zatem, że badany preparat jest emulsją typu o/w. Na rys. 47B natomiast przedstawiono Emulsję 2 zawierającą koniugat JA-YPPF-NH₂. Zaobserwowano zabarwienie kropli fazy wodnej emulsji rozproszonej w niezabarwionej fazie tłuszczowej. Potwierdzono więc, że badany preparat jest emulsją typu w/o. Na rys. 47C



przedstawiono Emulsję 3 + JA-YPFF-NH₂. Analogicznie do Emulsji 1 zaobserwowano zabarwienie kropeł fazy wodnej, w której rozproszone są niezabarwione krople fazy tłuszczowej. Fakt ten potwierdza założenie, że badany preparat jest emulsją typu o/w. W oparciu o przedstawione obrazy mikroskopowe stwierdzono, że wszystkie przygotowane emulsje miały charakter makroemulsji, bowiem rozmiar ich cząstek nie przekraczał 100 µm. Stwierdzono lepszą dyspersję fazy wewnętrznej Emulsji 3, w porównaniu z Emulsją 1 oraz 2. Ponadto, odnotowano obecność nielicznych aglomeratów cząstek Emulsji 1 + JA-YPFF-NH₂ oraz Emulsji 2 + JA-YPFF-NH₂. Analogiczne obserwacje odnotowano dla pozostałych emulsji zawierających inne badane jasmonidy. Wielkość cząstek układała się w następującym szeregu: Emulsja 3 < Emulsja 1 < Emulsja 2.

20.3. Badanie lepkości oraz wartości pH otrzymanych formułacji

Lepkość preparatu ma znaczący wpływ m.in. na łatwość jego rozprowadzania na skórze oraz ilość uwalnianej substancji aktywnej. W tabeli 16 przedstawiono wyniki badań lepkości oraz wartości pH otrzymanych preparatów (bazy kosmetyczne oraz formułacje zawierające kwas jasmonowy i jego pochodne).

Tabela 16. Wartość pH oraz lepkość otrzymanych formułacji.

FORMULACJA	WARTOŚĆ PH (-, ±S.D. ¹)	LEPKOŚĆ (mPA × s, ±S.D. ¹)
Emulsja 1	6,50 ± 0,05	15 000 ± 400
Emulsja 1 + JA	6,46 ± 0,04	14 900 ± 400
Emulsja 1 + MeJ	6,49 ± 0,04	14 900 ± 400
Emulsja 1 + MeDHJ	6,48 ± 0,02	14 900 ± 400
Emulsja 1 + JA-YPFF-NH ₂	6,49 ± 0,06	14 900 ± 500
Emulsja 1 + JA-YYKS-NH ₂	6,50 ± 0,01	14 900 ± 500
Emulsja 2	6,47 ± 0,03	107 300 ± 200
Emulsja 2 + JA	6,46 ± 0,03	107 200 ± 300
Emulsja 2 + MeJ	6,48 ± 0,04	107 300 ± 400
Emulsja 2 + MeDHJ	6,48 ± 0,04	107 100 ± 400
Emulsja 2 + JA-YPFF-NH ₂	6,49 ± 0,05	107 300 ± 200
Emulsja 2 + JA-YYKS-NH ₂	6,48 ± 0,04	107 200 ± 300
Emulsja 3	6,49 ± 0,05	25 000 ± 400
Emulsja 3 + JA	6,48 ± 0,05	25 100 ± 300
Emulsja 3 + MeJ	6,50 ± 0,04	25 000 ± 400
Emulsja 3 + MeDHJ	6,50 ± 0,04	25 100 ± 300
Emulsja 3 + JA-YPFF-NH ₂	6,49 ± 0,03	25 100 ± 300
Emulsja 3 + JA-YYKS-NH ₂	6,49 ± 0,05	25 000 ± 400
Żel PAA	6,47 ± 0,04	7 500 ± 200
Żel PAA + JA	6,46 ± 0,05	7 500 ± 100
Żel PAA + MeJ	6,48 ± 0,06	7 400 ± 300
Żel PAA + MeDHJ	6,48 ± 0,04	7 500 ± 100
Żel PAA + JA-YPFF-NH ₂	6,49 ± 0,06	7 500 ± 200
Żel PAA + JA-YYKS-NH ₂	6,48 ± 0,04	7 400 ± 200
Żel HEC	6,49 ± 0,02	8 100 ± 100
Żel HEC + JA	6,47 ± 0,05	8 300 ± 100
Żel HEC + MeJ	6,48 ± 0,05	8 200 ± 200
Żel HEC + MeDHJ	6,48 ± 0,04	8 100 ± 200
Żel HEC + JA-YPFF-NH ₂	6,49 ± 0,04	8 100 ± 300
Żel HEC + JA-YYKS-NH ₂	6,49 ± 0,03	8 200 ± 100

¹S.D. - ang. standard deviation, odchylenie standardowe

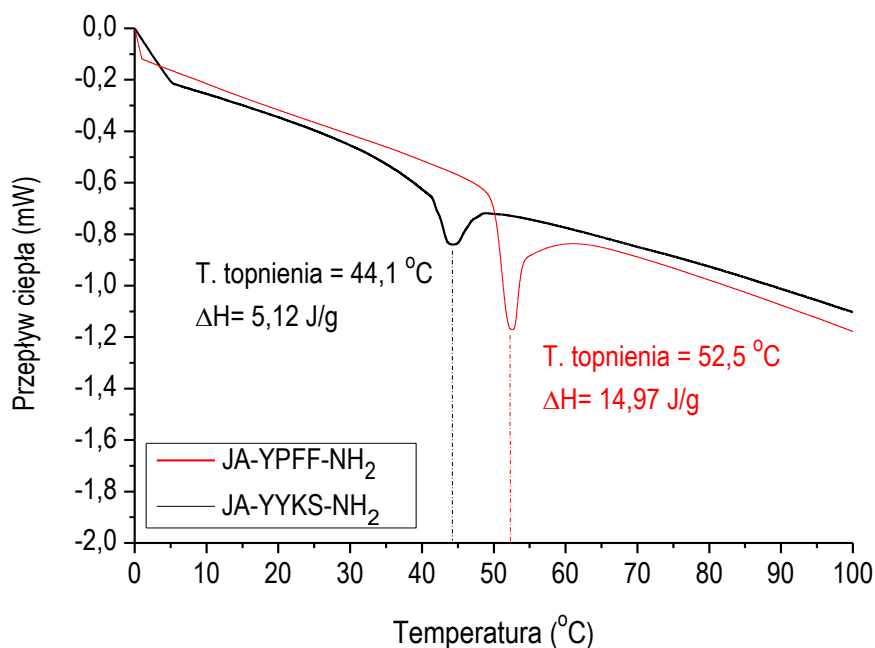


Na podstawie wyników badań lepkości przygotowanych formułacji stwierdzono, że najmniejszą lepkością charakteryzowały się preparaty na bazie żelu PAA, natomiast największą – preparat na bazie Emulsji 2. Zaobserwowano, że lepkość preparatu jest ściśle zależna od jego składu. Żele charakteryzowały się niską lepkością ze względu na dużą zawartość fazy wodnej, a w ich skład nie wchodziły żadne komponenty tłuszczowe. Mniejsza lepkość żelu PAA wynikała z niższej zawartości substancji konsystencjotwórczej (0,5% w/w karbomeru kwasu akrylowego) w kompozycji produktu w porównaniu z żelem HEC (2,5% w/w hydroksyetylocelulozy). Spośród przygotowanych emulsji najmniejszą lepkością cechowała się Emulsja 1, zawierająca w swojej kompozycji niewielką (22,5% w/w) ilość fazy tłuszczowej oraz 76,5% w/w wody. Przewaga fazy tłuszczowej (79% w/w) oraz niewielka zawartość wody (20% w/w) w kompozycji Emulsji 2 była przyczyną jej dużej lepkości. W oparciu o wyniki badań pH otrzymanych preparatów stwierdzono, że dodatek jasmonidu lub ich pochodnych nie ma znaczącego wpływu na pH formułacji. Ponadto, wartość pH otrzymanych formułacji mieściła się w zakresie wartości pH zdrowej skóry (4,5-6,5), w związku z tym otrzymane preparaty mogą być potencjalnie wykorzystywane do aplikacji naskórných [382].

PODSUMOWUJĄC, wszystkie przygotowane emulsje zawierające kwas jasmonowy i jego pochodne cechowały się gładką, jednolitą konsystencją oraz białą barwą. Preparaty na bazie żelu PAA oraz żelu HEC były natomiast bezbarwne i klarowne. W oparciu o zdjęcia mikroskopowe emulsji stwierdzono, że rozmiar ich cząstek nie przekracza 100 μm , w związku z czym mają one charakter makroemulsji. Odnotowano także, że wartość pH wszystkich preparatów była zbliżona do wartości pH zdrowej skóry. Dodatek substancji aktywnej nie miał istotnego wpływu na wartość pH preparatów. Stwierdzono, że lepkość przygotowanych formułacji jest determinowana przez zawartość wody w ich kompozycji, ponieważ niezależnie od dodatku jasmonidu, najmniejszą lepkością charakteryzował się żel PAA, natomiast największą - Emulsja 2.

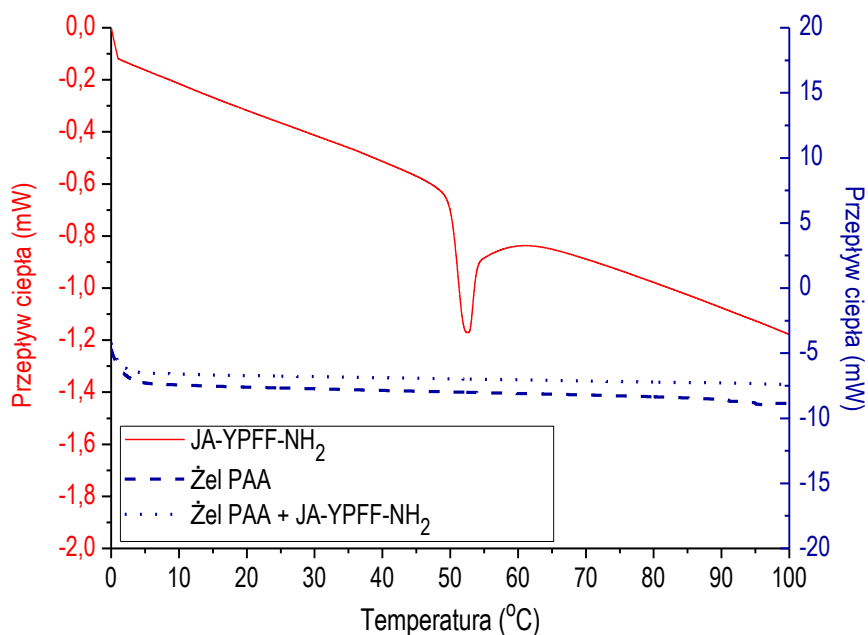
20.4. Badanie kompatybilności pochodnych kwasu jasmonowego i przygotowanych formułacji z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej

W celu określenia kompatybilności przygotowanych formułacji oraz krystalicznych koniugatów JA-YPFF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂ wykorzystano skaningową kalorymetrię różnicową. Na rys. 48 przedstawiono krzywe DSC badanych koniugatów. Każda krzywa posiada pik, którego maksimum odpowiada temperaturze topnienia badanego związku. Zaobserwowano, że temperatury topnienia JA-YPFF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂ wynoszą odpowiednio 52,5 oraz 44,1°C. Na przedstawionych krzywych nie zaobserwowano żadnych dodatkowych pików, co świadczy o dużej czystości obu związków. Obliczono także entalpię topnienia badanych koniugatów, która wynosiła odpowiednio 14,97 J/g dla JA-YPFF-NH₂ oraz 5,12 J/g dla JA-YYKS-NH₂ (procesy endotermiczne).



Rys. 48. Krzywe DSC koniugatów kwasu jasmonowego i tetrapeptydu YPFF-NH₂ oraz YYKS-NH₂.

Następnie przeprowadzono analizę kompatybilności koniugatów oraz przygotowanych formułacji. Wynik pomiaru metodą skaningowej kalorymetrii różnicowej został przedstawiony w postaci zależności zmierzonego sygnału kalorymetrycznego wyrażonego w jednostkach mocy mW od temperatury. Na rys. 49 zestawiono krzywe DSC dla JA-YPFF-NH₂ oraz żelu PAA (baza kosmetyczna oraz formułacja zawierająca koniugat). Stwierdzono brak obecności piku pochodzącego od koniugatu na krzywej DSC formułacji żel PAA + JA-YPFF-NH₂. Oznacza to, że substancja aktywna jest dobrze rozpuszczalna w badanej formułacji. Ponadto, nie zaobserwowano wpływu dodatku koniugatu na przebieg krzywej DSC, a co za tym idzie na stabilność bazy kosmetycznej

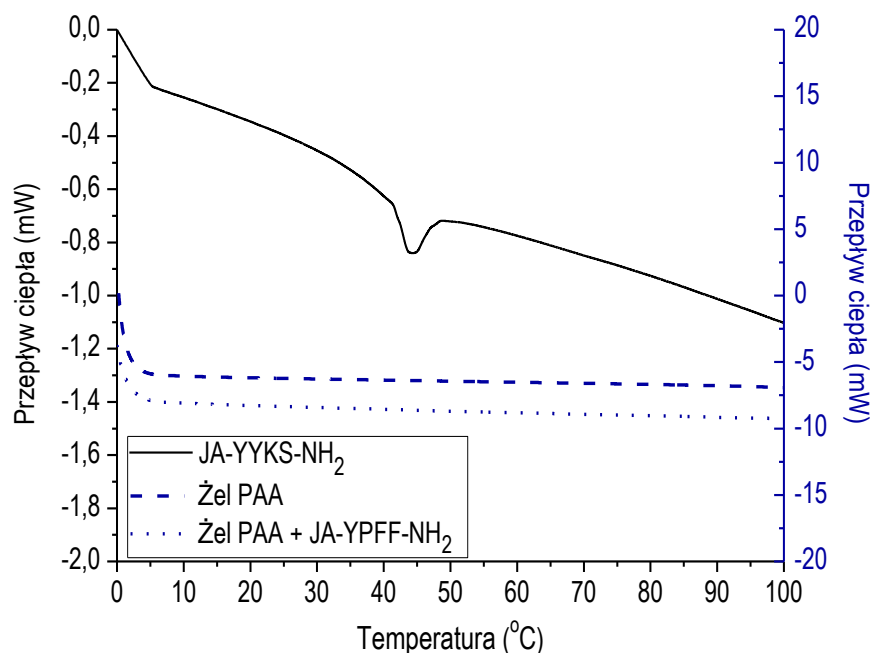


Rys. 49. Krzywe DSC JA-YPFF-NH₂, żelu PAA oraz żelu PAA zawierającego badany koniugat.

Na rys. 50 zestawiono krzywe DSC dla JA-YYKS-NH₂ oraz żelu PAA (baza kosmetyczna oraz formułacja zawierająca badany koniugat). Podobnie, jak w przypadku koniugatu JA oraz

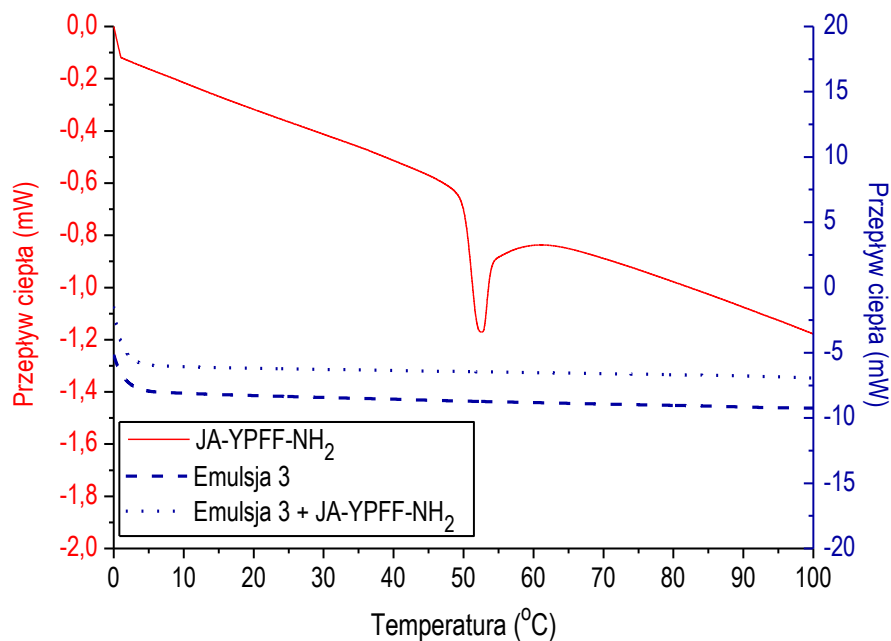


tetrapeptydu YPFF-NH₂ stwierdzono brak obecności pików pochodzących od koniugatu na krzywej DSC formulacji żelu PAA + JA-YYKS-NH₂. Ponadto, nie zaobserwowano wpływu dodatku koniugatu na przebieg krzywej DSC. Oznacza to, że analizowana substancja aktywna jest kompatybilna z badaną formulacją, ponieważ jest w niej dobrze rozpuszczalna i nie powoduje jej destabilizacji.

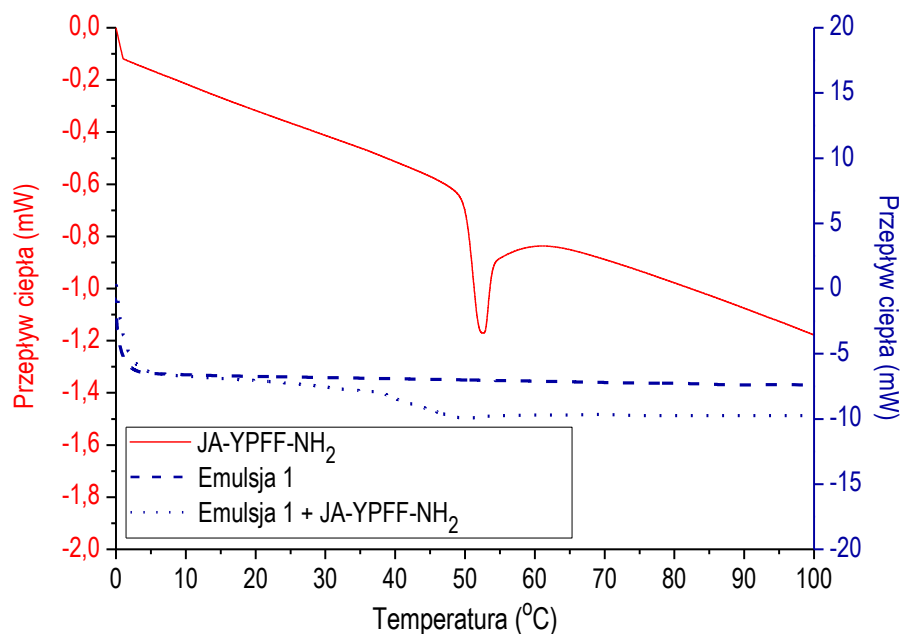


Rys. 50. Krzywe DSC JA-YYKS-NH₂, żelu PAA oraz żelu PAA zawierającego badany koniugat.

Przeprowadzono również badania kompatybilności analizowanych koniugatów z pozostałymi formulacjami (Emulsja 1, 2, 3 oraz żel HEC). Podobnie, jak w przypadku żelu PAA, stwierdzono dobrą rozpuszczalność krystalicznych koniugatów w Emulsji 2, 3 (rys. 51) oraz żelu HEC, jak również brak zmian w przebiegu krzywej DSC bazy kosmetycznej wskutek addycji substancji aktywnej. W przypadku Emulsji 1 + JA-YPFF-NH₂ zaobserwowano obecność niewielkiego pików pochodzącego od niecałkowicie rozpuszczonego koniugatu na krzywej badanej formulacji (rys. 52). Nie odnotowano natomiast takiego pików na krzywej Emulsji 1 bez dodatku koniugatu. Podobne obserwacje odnotowano w przypadku Emulsji 1 + JA-YYKS-NH₂. Wnioskować można zatem, że krystaliczne koniugaty rozpuszczają się nieco gorzej w Emulsji 1, niż w pozostałych preparatach. Jest to spowodowane lipofilowością koniugatów oraz dużą zawartością fazy wodnej. Pomimo dużej zawartości wody, żele zawierają w swoim składzie także alkohole (izopropanol w żelu PAA oraz gliceryna w żelu HEC), które są dobrymi rozpuszczalnikami badanych substancji.



Rys. 51. Krzywe DSC koniugatu JA-YPPFF-NH₂, Emulsji 3 oraz Emulsji 3 zawierającej badany koniugat.

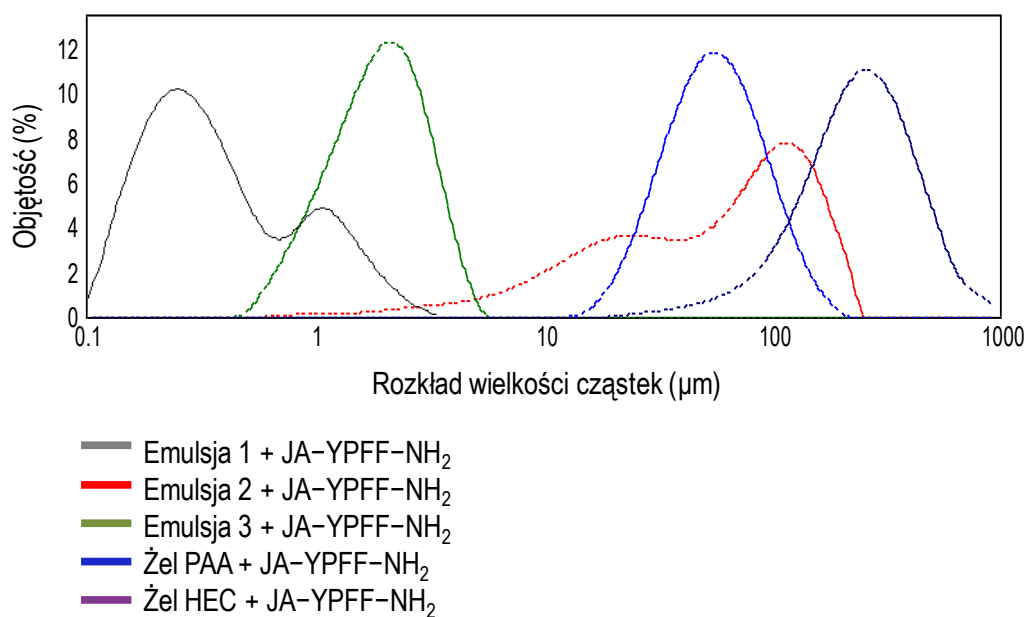


Rys. 52. Krzywe DSC JA-YPPFF-NH₂, Emulsji 1 oraz Emulsji 1 zawierającej badany koniugat.

PODSUMOWUJĄC, zbadano kompatybilność krystalicznych koniugatów ze wszystkimi przygotowanymi preparatami. Stwierdzono, że badane koniugaty są najmniej kompatybilne z Emulsją 1, ponieważ odnotowano obecność niewielkiego piku pochodzącego od niecałkowicie rozpuszczonych kryształów substancji, na krzywych DSC Emulsji 1 + JA-YPPFF-NH₂ oraz Emulsji 1 + JA-YYKS-NH₂. Na krzywych Emulsji 2, 3, żelu PAA oraz HEC nie odnotowano natomiast piku wskazującego na obecność nierozpuszczonych kryształów koniugatów. Wyniki analizy DSC badanych substancji aktywnej potwierdziły ich wysoką czystość.

20.5. Badanie rozkładu wielkości cząstek formulacji z wykorzystaniem techniki dyfrakcji laserowej

W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono wyniki analizy rozkładu wielkości cząstek (*ang.* Particle-size distribution, PSD) przygotowanych formulacji zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. Na rys. 53 przedstawiono przykładowe krzywe rozkładu wielkości cząstek formulacji zawierających koniugat JA-YPPF-NH₂, otrzymane w wyniku analizy próbek zaraz po ich przygotowaniu. Stwierdzono, że rozkład wielkości cząstek formulacji zależy przede wszystkim od jej kompozycji. Zaobserwowano, że Emulsja 1 + JA-YPPF-NH₂ charakteryzowała się obecnością najmniejszych cząstek (mieszczących się w przedziale od 0,1 do 5,0 μm) spośród wszystkich przygotowanych formulacji. Bimodalny rozkład wielkości cząstek tejże formulacji cechuje się obecnością dominującego pików odpowiadających cząstkom w średnim rozmiarze około 0,4 μm. Spośród wszystkich przygotowanych emulsji, Emulsja 2 + JA-YPPF-NH₂ cechowała się natomiast występowaniem największych cząstek w rozmiarze od 0,8 do 120 μm, a rozkład wielkości jej cząstek ma charakter bimodalny. W PSD tejże formulacji odnotowano obecność dominującego pików, odpowiadającego cząstkom o średnim rozmiarze ok. 100 μm. Zaobserwowano także, że rozkład wielkości cząstek Emulsji 3, zawierającej JA-YPPF-NH₂ ma charakter monomodalny, charakteryzujący się występowaniem pików świadczącego o obecności cząstek w rozmiarze 0,1-50 μm, z przewagą cząstek o średnim rozmiarze 1,5 μm. W niniejszej pracy przeprowadzono również analizę PSD żelu PAA oraz żelu HEC, zawierających badane kwas jasmonowy i jego pochodne. Stwierdzono, że krzywa rozkładu wielkości cząstek żelu HEC + JA-YPPF-NH₂ miała charakter monomodalny, a wielkości cząstek tego preparatu mieszczą się w zakresie od 10 do 500 μm. Żel HEC charakteryzuje się obecnością dużych cząstek ze względu na obecność polimeru (hydroksyetylocelulozy) w swojej kompozycji [383]. Podobne obserwacje odnotowano dla żelu PAA zawierającego w swoim składzie koniugat JA-YPPF-NH₂. Rozkład wielkości cząstek tejże formulacji ma postać pojedynczego pików, świadczącego o obecności cząstek w rozmiarze 20-200 μm. Analogiczne obserwacje odnotowano dla wszystkich formulacji zawierających pozostałe jasmonidy (JA, MeJ, MeDHJ oraz JA-YYKS-NH₂), w związku z czym stwierdzono, że rodzaj dodanego jasmonidu nie ma znaczącego wpływu na rozkład wielkości cząstek przygotowanych preparatów.



Rys. 53. Rozkłady wielkości cząstek formulacji zawierających koniugat JA-YYKS-NH₂ otrzymane po ich przygotowaniu.



Badania PSD przeprowadzono także po 70 dniach ich przechowywania w temperaturze 4 oraz 25°C, jak również po 14 dniach przechowywania w temperaturze 45°C w celu oceny wpływu warunków przechowywania formułacji na ich stabilność w czasie. Jak już wcześniej wspomniano, wzrost wielkości cząstek preparatów w czasie jest związany z tworzeniem się aglomeratów, co wskazuje na występowanie zjawisk destabilizacji próbki [384]. W tabeli 17 zaprezentowano wyniki analizy rozkładu wielkości cząstek przygotowanych formułacji, zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. Wyniki analizy zmian PSD formułacji w czasie opisano za pomocą wartości $D(4,3)$, prezentującej stosunek średniej średnicy cząstek do ich wielkości. Należy wspomnieć, że wysokie wartości parametru $D(4,3)$ świadczą o występowaniu więcej, niż jednego rodzaju destabilizacji próbki [385].

W oparciu o zmiany rozkładu wielkości cząstek preparatów na bazie Emulsji 2 stwierdzono, że niezależnie od rodzaju dodanego jasmonidu, największe zmiany wartości parametru $D(4,3)$ nastąpiły dla próbek przechowywanych w temperaturze 25 °C przez 70 dni. Wartości parametru $D(4,3)$ mieszczą się w przedziale od $62,498 \pm 1,505$ (Emulsja 2 + MeJ) do $84,221 \pm 3,441$ μm (Emulsja 2 + MeDHJ) i wskazują na występowanie zjawiska aglomeracji cząstek tychże formułacji. Jest to prawdopodobnie związane z wysoką lepkością Emulsji 2 (powyżej 107 000 mPa \times s), która ulega obniżeniu wraz z podwyższeniem temperatury. Mniejsza lepkość preparatu zwiększa bowiem prawdopodobieństwo wystąpienia ruchów cząsteczek destabilizujących próbkę. Potwierdzeniem tego założenia może być fakt, że wartość parametru $D(4,3)$ dla tej samej formułacji nie przekracza poziomu $44,270 \pm 1,872$ μm (Emulsja 2 + MeDHJ) podczas jej przechowywania w temperaturze 4 °C przez 70 dni.

Otrzymane wartości parametru $D(4,3)$ dla preparatów na bazie Emulsji 2 porównano z wartościami mediany rozkładu cząstek $D(0,5)$. Zaobserwowano, że niezależnie od rodzaju dodanej substancji aktywnej, największe zmiany wartości mediany nastąpiły podczas przechowywania próbek w temperaturze 25 °C. Wartości parametru $D(0,5)$ mieściły się bowiem w przedziale od $49,070 \pm 2,026$ (Emulsja 2 + MeJ) do $93,539 \pm 4,299$ μm (Emulsja 2 + MeDHJ). Otrzymane wyniki analizy mediany rozkładu cząstek są zgodne z wynikami analizy parametru $D(4,3)$.

W pracy nie przedstawiono wyników zmian rozkładu wielkości cząstek żadnego z preparatów na bazie Emulsji 2 zawierających jasmonidy, przechowywanych w temperaturze 45°C, bowiem uległy one rozwarstwieniu (złamaniu emulsji) już po upływie doby od ich przechowywania w temperaturze 45°C (rys. 54). Jest to prawdopodobnie spowodowane wysoką zawartością fazy tłuszczowej (79 % w/w) w kompozycji tejże formułacji. Jak powszechnie wiadomo, substancje tłuszczowe ulegają upłynnieniu wraz ze wzrostem temperatury. Upłynnienie fazy tłuszczowej preparatów na bazie Emulsji 2 spowodowało zniszczenie struktury emulsji i jej złamanie. Co więcej, wzrost płynności komponentów lipidowych przyczynia się do obniżenia lepkości formułacji, co stanowi jedną z najważniejszych przyczyn jej destabilizacji [386].

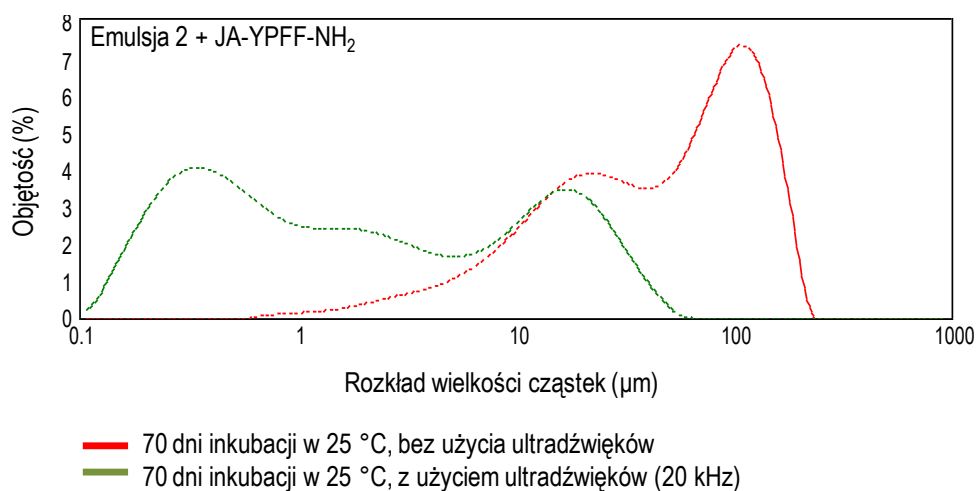


Rys. 54. Cella pomiarowa zawierająca rozwarstwowaną Emulsję 2 + JA-YPPF-NH₂.



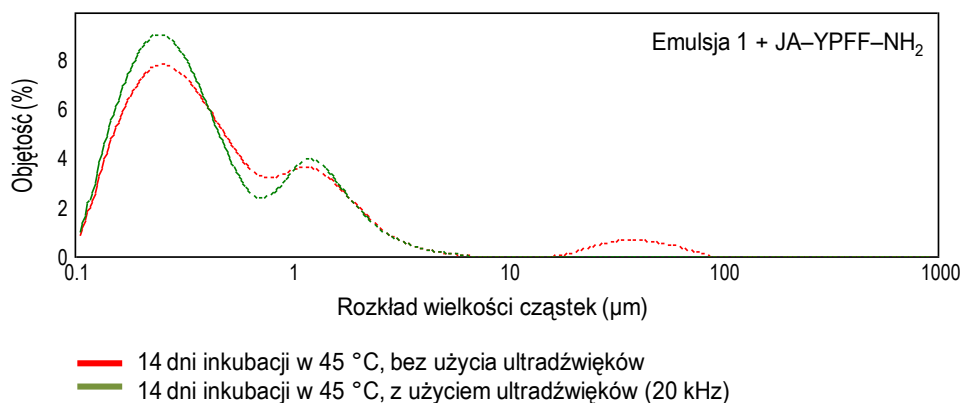
W oparciu o zmiany rozkładu wielkości cząstek preparatów na bazie Emulsji 1 stwierdzono, że niezależnie od rodzaju dodanego jasmonidu, największe zmiany wartości parametru $D(4,3)$ nastąpiły podczas przechowywania próbek w temperaturze 45°C przez 14 dni. Wartości parametru $D(4,3)$ mieszczą się w przedziale od $17,451 \pm 0,641$ (Emulsja 1 + MeJ) do $33,212 \pm 0,070$ μm (Emulsja 1 + JA-YPFF- NH_2). Otrzymane wartości parametru $D(4,3)$ dla preparatów na bazie Emulsji 1 porównano z wartościami mediany rozkładu cząstek $D(0,5)$. Zaobserwowano, że niezależnie od rodzaju dodanej substancji aktywnej, największe zmiany wartości mediany nastąpiły podczas przechowywania próbek w temperaturze 45°C . Wartości parametru $D(0,5)$ mieściły się bowiem w przedziale od $1,271 \pm 0,005$ (Emulsja 1 + MeJ) do $22,943 \pm 1,183$ μm (Emulsja 1 + JA-YPFF- NH_2). Otrzymane wyniki analizy mediany rozkładu cząstek są zgodne z wynikami analizy parametru $D(4,3)$ i wskazują na proces tworzenia się aglomeratów cząstek emulsji przechowywanych w temperaturze 45°C .

W celu potwierdzenia występowania zjawiska aglomeracji cząstek preparatów na bazie Emulsji 1 i 2, przeprowadzono ich analizę z wykorzystaniem sondy, emitującej ultradźwięki o częstotliwości 20 kHz. Wykorzystanie ultradźwięków do redukcji rozmiarów aglomeratów cząstek emulsji zostało już opisane w literaturze naukowej [387,388]. Na rys. 55 przedstawiono wpływ działania ultradźwięków na rozkład wielkości cząstek Emulsji 2 zawierającej JA-YPFF- NH_2 oraz przechowywane w temperaturze 25°C przez 70 dni.



Rys. 55. Wpływ działania ultradźwięków na rozkład wielkości cząstek Emulsji 2 + JA-YPFF- NH_2 , przechowywanej w temperaturze 25°C przez 70 dni.

Zaobserwowano, że działanie ultradźwięków na zdyspergowaną próbkę spowodowało przesunięcie się profilu rozkładu wielkości cząstek badanej formułacji w kierunku cząstek o mniejszych rozmiarach. Powstała krzywa PSD ma charakter multimodalny i świadczy o występowaniu cząstek, mieszczących się w zakresie od 0,1 do 90 μm . Na prezentowanej krzywej odnotowano obecność dwóch dominujących pików, odpowiadających cząsteczkom w średnim rozmiarze około 0,4 μm oraz 20 μm . Otrzymane krzywe PSD są zgodne z wynikami analizy zmian parametru $D(4,3)$ i dowodzą, że w wyniku przechowywania Emulsji 2 + JA-YPFF- NH_2 w 25°C przez 70 dni występuje zjawisko aglomeracji cząstek tejże formułacji. Podobne obserwacje odnotowano dla pozostałych preparatów na bazie Emulsji 2. Na rys. 56 przedstawiono z kolei wpływ działania ultradźwięków na rozkład wielkości cząstek Emulsji 1 zawierającej JA-YPFF- NH_2 oraz przechowywanej w temperaturze 45°C przez czas 14 dni.



Rys. 56. Wpływ działania ultradźwięków na rozkład wielkości cząstek Emulsji 1 + JA-YPFF-NH₂ przechowywanej w temperaturze 45°C przez czas 14 dni.

Podobnie, jak w przypadku Emulsji 2, zaobserwowano przesunięcie się krzywej rozkładu wielkości cząstek badanej formułacji w kierunku cząstek o mniejszych rozmiarach wskutek działania ultradźwięków. Powstała krzywa PSD ma charakter bimodalny, identyczny z rozkładem otrzymanym w wyniku analizy próbki zaraz po jej przygotowaniu. Przechowywanie Emulsji 1 + JA-YPFF-NH₂ w temperaturze 45 °C przez czas 14 dni powoduje powstawanie aglomeratów cząstek, widocznych w postaci pików o maksimum przy wartości $87,457 \pm 1,001 \mu\text{m}$. Wspomniany pik znika wskutek działania ultradźwięków na zdyspergowaną próbkę. Otrzymane krzywe PSD są zgodne z wynikami analizy zmian parametru D(4,3) i dowodzą, że w wyniku przechowywania Emulsji 1+ JA-YPFF-NH₂ w 45 °C przez 14 dni występuje zjawisko aglomeracji cząstek tejże formułacji. Analogicznie obserwacje odnotowano dla pozostałych preparatów na bazie Emulsji 1.

Najmniejszą zmianę wartości parametru D(4,3) w porównaniu z wynikami otrzymanymi po przygotowaniu preparatów, zaobserwowano dla Emulsji 3 przechowywanej w temperaturze 4°C przez 70 dni. Odnotowano, że wartości analizowanego parametru mieszczą się w przedziale od $2,052 \pm 0,013$ (Emulsja 3 + MeDHJ) do $2,948 \pm 1,151 \mu\text{m}$ (Emulsja 3 + JA), w związku z czym nie stwierdzono występowania zjawiska aglomeracji cząstek. Stwierdzono również, że wartości te nie różnią się znacznie od tych odnotowanych dla preparatów przechowywanych w temperaturze 25 °C przez 70 dni. Dowodzi to wysokiej stabilności Emulsji 3 we wspomnianych warunkach przechowywania. Największe zmiany parametru D(4,3) odnotowano w przypadku preparatów przechowywanych w temperaturze 45°C. Wartości te mieszczą się w przedziale od $9,566 \pm 0,007$ (Emulsja 3 + JA-YYKS-NH₂) do $35,205 \pm 1,871 \mu\text{m}$ (Emulsja 3 + MeDHJ). Stwierdzono zatem, że preparaty na bazie Emulsji 3 przechowywane w temperaturze 45°C są mniej stabilne w porównaniu z tymi samymi formułacjami, przechowywanymi w temperaturze 4 oraz 25°C. Otrzymane wartości parametru D(4,3) dla preparatów na bazie Emulsji 3 są zgodne z wartościami mediany rozkładu cząstek D(0,5).

Stwierdzono, że preparaty na bazie hydrożelu HEC charakteryzują się największymi wartościami parametru D(4,3) spośród wszystkich przygotowanych preparatów. Zaobserwowano jednak, że niezależnie od rodzaju dodanej substancji aktywnej, parametr ten niemalże nie uległ zmianie w czasie przechowywania próbek przez 70 dni, zarówno w temperaturze 4, jak również 25°C. Jako przykład podać można żel HEC z dodatkiem kwasu jasmonowego, dla którego wartości parametru D(4,3) wynoszą $144,243 \pm 0,764 \mu\text{m}$ (po przygotowaniu próbki), $148,894 \pm 1,127 \mu\text{m}$ (po 70 dniach w 4 °C) oraz $147,725 \pm 2,244 \mu\text{m}$ (po 70 dniach w 25°C). Podobne obserwacje odnotowano dla preparatów na bazie żelu PAA. Przykładowo, wartości parametru D(4,3) dla żelu PAA z dodatkiem kwasu jasmonowego wynoszą $62,697 \pm 0,454 \mu\text{m}$ (po przygotowaniu próbki), $62,915 \pm 1,106 \mu\text{m}$ (po 70 dniach w 4°C) oraz $63,247 \pm 0,939 \mu\text{m}$ (po 70 dniach w 25°C). Otrzymane wartości parametru D(4,3) dla preparatów na bazie żelu HEC oraz PAA są zgodne z wartościami mediany rozkładu cząstek D(0,5). Duża stabilność hydrożeli podczas ich przechowywania w różnych warunkach



temperatury jest związana z ich kompozycją. Tego typu preparaty nie są układami emulsyjnymi, których destabilizacja następuje m.in. w wyniku napięcia powierzchniowego na granicy niemieszających się faz układu. Ponadto, kopolimery HEC i PAA tworzą strukturę sieci przestrzennej, która utrudnia swobodne przemieszczanie się cząsteczek fazy rozpraszającej [389]. W pracy nie prowadzono przyspieszonych testów starzenia dla hydrożeli, bowiem już po 24 godzinach ich przechowywania w temperaturze 45 °C odnotowano niemalże całkowite upłynnienie preparatów. Był to prawdopodobnie wynik zniszczenia sieci polimerowej przez działanie wysokiej temperatury.

Tabela 17. Wyniki analizy¹ rozkładu wielkości cząstek przygotowanych preparatów zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne, przeprowadzonej po przygotowaniu próbki (A), po 70 dniach przechowywania w temperaturze 4°C(B) oraz 25°C (C) oraz po 14 dniach przechowywania w temperaturze 45°C (D), część I.

PREPARAT		D (0,1) μm	D (0,5) μm	D (0,9) μm	D(4,3) μm
E1+ JA	A	0,167 \pm 0,002	0,346 \pm 0,005	1,393 \pm 0,011	0,577 \pm 0,007
	B	0,169 \pm 0,001	0,353 \pm 0,004	1,453 \pm 0,014	0,612 \pm 0,007
	C	0,169 \pm 0,001	0,353 \pm 0,004	1,376 \pm 0,011	3,586 \pm 0,006
	D	0,543 \pm 0,011	21,655 \pm 0,967	93,568 \pm 0,465	35,021 \pm 0,350
E2 + JA	A	3,672 \pm 0,044	15,440 \pm 0,303	65,690 \pm 0,214	26,040 \pm 0,187
	B	4,228 \pm 0,228	13,690 \pm 0,665	63,677 \pm 6,991	30,075 \pm 1,580
	C	8,637 \pm 1,225	65,498 \pm 8,161	185,097 \pm 9,973	82,298 \pm 6,616
	D	-	-	-	-
E3 + JA	A	0,931 \pm 0,004	2,027 \pm 0,008	3,979 \pm 0,007	2,547 \pm 0,006
	B	0,873 \pm 0,060	2,057 \pm 0,023	4,135 \pm 0,014	2,948 \pm 1,151
	C	0,927 \pm 0,034	2,078 \pm 0,005	4,058 \pm 0,316	3,667 \pm 0,799
	D	0,387 \pm 0,019	2,204 \pm 0,014	9,733 \pm 1,728	9,927 \pm 1,331
Żel PAA + JA	A	49,535 \pm 1,105	55,847 \pm 2,031	105,653 \pm 1,144	62,697 \pm 0,454
	B	50,002 \pm 0,667	55,122 \pm 0,872	105,675 \pm 2,250	62,915 \pm 1,106
	C	50,867 \pm 1,995	54,899 \pm 1,117	106,024 \pm 0,991	63,247 \pm 0,939
	D	-	-	-	-
Żel HEC + JA	A	52,749 \pm 2,967	139,458 \pm 1,237	245,483 \pm 0,978	144,243 \pm 0,764
	B	53,231 \pm 1,156	145,243 \pm 3,665	247,143 \pm 2,754	148,894 \pm 1,127
	C	52,955 \pm 0,734	143,866 \pm 2,210	246,997 \pm 3,311	147,725 \pm 2,244
	D	-	-	-	-
E1 + MeJ	A	0,156 \pm 0,000	0,287 \pm 0,000	1,029 \pm 0,002	0,454 \pm 0,001
	B	0,164 \pm 0,001	0,356 \pm 0,004	1,541 \pm 0,009	0,647 \pm 0,006
	C	0,162 \pm 0,001	0,364 \pm 0,003	1,914 \pm 0,059	2,735 \pm 0,482
	D	0,162 \pm 0,004	1,271 \pm 0,005	30,228 \pm 0,798	17,451 \pm 0,641
E2 + MeJ	A	9,105 \pm 0,085	38,156 \pm 0,151	81,798 \pm 0,495	41,972 \pm 0,207
	B	7,036 \pm 0,207	26,708 \pm 1,178	108,0727 \pm 3,938	44,270 \pm 1,872
	C	8,024 \pm 0,400	49,070 \pm 2,026	138,284 \pm 2,357	62,498 \pm 1,505
	D	-	-	-	-
E3 + MeJ	A	0,834 \pm 0,057	1,972 \pm 0,009	4,126 \pm 0,226	2,482 \pm 0,185
	B	0,888 \pm 0,032	1,761 \pm 0,008	3,337 \pm 0,077	2,066 \pm 0,002
	C	0,957 \pm 0,002	1,927 \pm 0,003	3,374 \pm 0,003	2,373 \pm 0,014
	D	0,362 \pm 0,083	2,022 \pm 0,046	136,226 \pm 3,741	26,851 \pm 1,975
Żel PAA + MeJ	A	47,036 \pm 0,902	54,667 \pm 1,144	106,112 \pm 3,015	61,557 \pm 2,334
	B	49,133 \pm 1,175	55,004 \pm 1,213	106,245 \pm 1,506	61,952 \pm 177
	C	49,882 \pm 2,021	54,994 \pm 0,799	106,873 \pm 1,341	62,275 \pm 1,639
	D	-	-	-	-
Żel HEC + MeJ	A	52,104 \pm 0,887	138,688 \pm 1,008	242,877 \pm 1,768	145,349 \pm 1,454
	B	52,953 \pm 2,066	144,991 \pm 2,425	246,324 \pm 2,034	149,204 \pm 1,621
	C	53,056 \pm 1,154	143,256 \pm 1,160	247,212 \pm 2,351	148,005 \pm 0,794
	D	-	-	-	-



Tabela 17, część II.

PREPARAT		D (0,1) μm	D (0,5) μm	D (0,9) μm	D(4,3) μm
E1 + MeDHJ	A	0,160 \pm 0,001	0,306 \pm 0,001	0,838 \pm 0,002	0,446 \pm 0,001
	B	0,171 \pm 0,001	0,379 \pm 0,002	1,608 \pm 0,005	0,684 \pm 0,003
	C	0,163 \pm 0,001	0,366 \pm 0,004	1,553 \pm 0,007	3,661 \pm 0,005
	D	0,526 \pm 0,001	1,372 \pm 0,025	87,816 \pm 1,407	24,626 \pm 0,428
E2 + MeDHJ	A	6,107 \pm 0,231	38,047 \pm 1,310	107,092 \pm 4,119	43,843 \pm 1,083
	B	9,055 \pm 0,123	26,664 \pm 0,128	130,615 \pm 3,24	55,601 \pm 1,560
	C	10,501 \pm 0,373	93,539 \pm 4,299	178,185 \pm 5,419	84,221 \pm 3,441
	D	-	-	-	-
E3 + MeDHJ	A	0,438 \pm 0,018	1,832 \pm 0,012	3,741 \pm 0,009	2,34 \pm 0,012
	B	0,819 \pm 0,023	1,904 \pm 0,010	3,493 \pm 0,007	2,052 \pm 0,013
	C	0,957 \pm 0,001	1,972 \pm 0,003	3,374 \pm 0,003	2,066 \pm 0,002
	D	0,399 \pm 0,009	1,977 \pm 0,116	110,002 \pm 2,916	35,205 \pm 1,871
Żel PAA + MeDHJ	A	48,216 \pm 1,512	53,271 \pm 2,455	105,978 \pm 2,556	63,237 \pm 2,354
	B	49,005 \pm 0,795	53,994 \pm 2,261	106,014 \pm 3,006	63,052 \pm 1,965
	C	49,638 \pm 3,004	54,005 \pm 1,329	106,272 \pm 1,491	63,204 \pm 3,002
	D	-	-	-	-
Żel HEC + MeDHJ	A	53,241 \pm 0,887	138,688 \pm 1,008	242,877 \pm 1,768	143,349 \pm 1,454
	B	52,998 \pm 2,066	144,991 \pm 2,425	246,324 \pm 2,034	149,204 \pm 1,621
	C	52,756 \pm 1,154	143,256 \pm 1,160	247,212 \pm 2,351	148,005 \pm 0,794
	D	-	-	-	-
E1+ JA-YPFF-NH ₂	A	0,164 \pm 0,233	0,398 \pm 0,013	1,225 \pm 0,723	0,611 \pm 0,051
	B	0,165 \pm 0,070	0,324 \pm 0,216	1,399 \pm 0,019	0,635 \pm 0,004
	C	0,168 \pm 0,004	0,361 \pm 0,009	1,358 \pm 0,102	2,591 \pm 0,012
	D	0,567 \pm 0,026	22,943 \pm 1,183	87,646 \pm 0,095	33,212 \pm 0,070
E2 + JA-YPFF-NH ₂	A	3,224 \pm 0,217	15,241 \pm 0,156	63,992 \pm 1,114	27,040 \pm 1,127
	B	4,334 \pm 0,224	12,905 \pm 1,265	62,457 \pm 2,998	31,125 \pm 0,658
	C	9,113 \pm 0,887	64,997 \pm 0,239	183,195 \pm 5,723	81,988 \pm 2,136
	D	-	-	-	-
E3 + JA-YPFF-NH ₂	A	0,887 \pm 0,041	1,998 \pm 0,018	3,253 \pm 0,027	2,365 \pm 0,017
	B	0,913 \pm 0,703	2,003 \pm 0,004	3,997 \pm 0,004	3,418 \pm 0,152
	C	0,975 \pm 0,024	2,022 \pm 0,016	4,012 \pm 0,512	3,647 \pm 0,454
	D	0,411 \pm 0,006	2,101 \pm 0,023	10,014 \pm 0,723	9,573 \pm 1,117
Żel PAA + JA-YPFF-NH ₂	A	50,176 \pm 2,132	54,981 \pm 1,525	104,718 \pm 3,536	64,357 \pm 3,504
	B	50,533 \pm 1,965	54,998 \pm 3,062	105,114 \pm 2,016	64,552 \pm 1,641
	C	50,669 \pm 2,904	55,011 \pm 1,289	105,782 \pm 2,901	64,704 \pm 2,027
	D	-	-	-	-
Żel HEC + JA-YPFF-NH ₂	A	51,929 \pm 1,657	134,226 \pm 3,631	242,885 \pm 3,175	146,004 \pm 1,634
	B	53,166 \pm 2,006	144,737 \pm 2,244	248,002 \pm 2,299	149,022 \pm 0,897
	C	53,005 \pm 0,931	143,961 \pm 1,125	247,127 \pm 3,018	147,995 \pm 2,545
	D	-	-	-	-
E1+ JA-YYKS-NH ₂	A	0,162 \pm 0,004	0,399 \pm 0,007	1,221 \pm 0,163	0,609 \pm 0,007
	B	0,164 \pm 0,027	0,321 \pm 0,102	1,397 \pm 0,029	0,636 \pm 0,015
	C	0,167 \pm 0,034	0,362 \pm 0,012	1,356 \pm 0,092	3,589 \pm 0,019
	D	0,566 \pm 0,009	22,145 \pm 0,037	87,457 \pm 1,001	33,014 \pm 1,021
E2 + JA-YYKS-NH ₂	A	3,154 \pm 0,019	14,796 \pm 1,062	64,251 \pm 2,214	27,540 \pm 2,071
	B	4,245 \pm 0,019	13,140 \pm 0,865	63,015 \pm 1,798	31,006 \pm 0,998
	C	9,070 \pm 0,087	64,325 \pm 2,005	183,026 \pm 3,649	82,030 \pm 1,166
	D	-	-	-	-
E3 + JA-YYKS-NH ₂	A	0,888 \pm 0,012	2,005 \pm 0,165	3,477 \pm 0,758	2,311 \pm 0,167
	B	0,912 \pm 0,009	2,003 \pm 0,098	4,105 \pm 0,069	3,545 \pm 0,052
	C	0,973 \pm 0,010	2,164 \pm 0,006	3,998 \pm 0,192	3,577 \pm 0,014
	D	0,413 \pm 0,116	2,205 \pm 0,194	10,005 \pm 1,024	9,566 \pm 0,007



Tabela 17, część III.

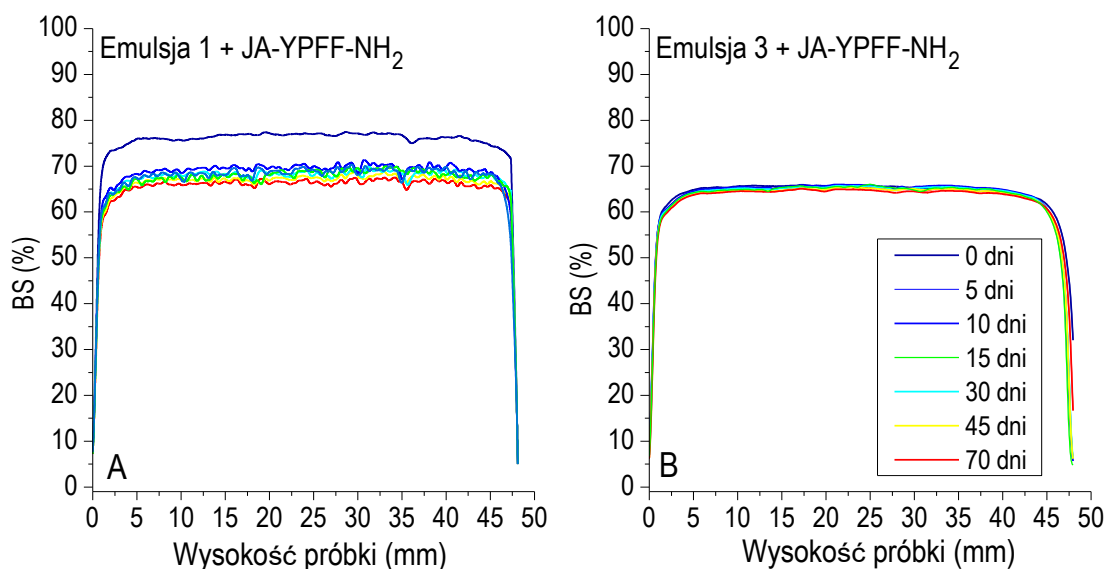
PREPARAT		D (0,1) μm	D (0,5) μm	D (0,9) μm	D(4,3) μm
Żel PAA + JA-YYKS-NH ₂	A	40,996 \pm 1,472	55,001 \pm 2,075	103,128 \pm 1,235	65,507 \pm 1,214
	B	50,004 \pm 3,625	55,238 \pm 1,632	103,556 \pm 2,215	65,972 \pm 1,761
	C	51,225 \pm 1,884	55,912 \pm 2,849	103,892 \pm 0,981	66,010 \pm 3,525
	D	-	-	-	-
Żel HEC + JA-YYKS-NH ₂	A	51,459 \pm 0,639	135,004 \pm 1,532	242,332 \pm 3,005	143,984 \pm 1,559
	B	53,996 \pm 1,997	144,476 \pm 1,994	247,502 \pm 1,959	148,722 \pm 1,872
	C	52,905 \pm 1,224	144,001 \pm 2,235	247,887 \pm 2,918	148,005 \pm 1,335
	D	-	-	-	-

¹ Wszystkie pomiary prowadzono bez użycia sondy ultradźwiękowej.

PODSUMOWUJĄC, zbadano wpływ warunków przechowywania na rozkład wielkości cząstek przygotowanych preparatów zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. Jak już wcześniej wspomniano, analiza zmian PSD formułacji w czasie może być pomocna w detekcji zjawiska aglomeracji jej cząstek, co może świadczyć o postępującym procesie destabilizacji próbki. W oparciu o analizę zmian rozkładu wielkości cząstek badanych formułacji w czasie stwierdzono, że niezależnie od warunków przechowywania, preparaty na bazie żelu PAA oraz HEC są stabilne w czasie, ponieważ nie zaobserwowano znaczącego zjawiska aglomeracji cząstek tychże preparatów. Stwierdzono również, że spośród wszystkich przygotowanych emulsji, najbardziej stabilne są preparaty przechowywane w temperaturze 4°C. Odnotowano bowiem niewielkie zmiany w rozkładzie wielkości ich cząstek w porównaniu z wynikami otrzymanymi od razu po przygotowaniu próbki. Najmniejszą stabilnością cechowały się z kolei preparaty przechowywane w temperaturze 45°C. W przypadku formułacji na bazie Emulsji 1 oraz 2 zaobserwowano tworzenie się aglomeratów, natomiast wszystkie preparaty na bazie Emulsji 2 uległy rozwarstwieniu już po 24 godzinach przechowywania w temperaturze 45°C. Jak już wspomniano, rozwarstwienie emulsji nazywane jest „złamaniem emulsji” i jest procesem całkowicie nieodwracalnym. Odnotowano, że spośród wszystkich preparatów przechowywanych w temperaturze 4 oraz 25°C, największą stabilnością cechowały się preparaty na bazie Emulsji 3. Stwierdzono także, że dodatek jasmonidów nie ma znaczącego wpływu na rozkład wielkości cząstek przygotowanych preparatów. Ponadto, potwierdzono wpływ działania ultradźwięków na rozmiar cząstek emulsji. Zmiana rozkładu wielkości cząstek wskutek działania ultradźwięków na zdyspergowaną próbkę może być bowiem wykorzystywana do detekcji zjawiska aglomeracji cząstek preparatów.

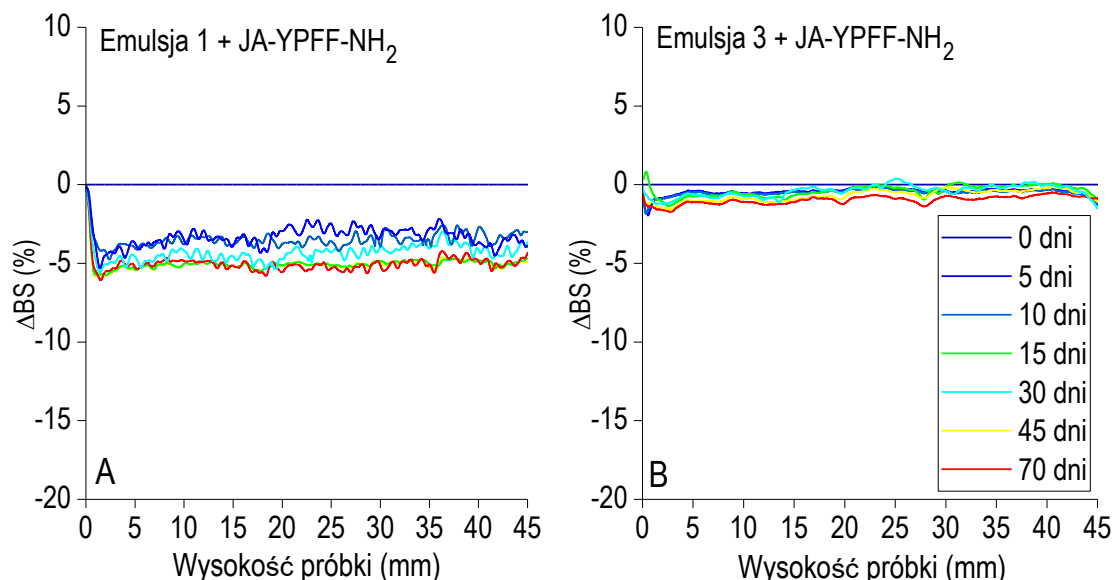
20.6. Badanie stabilności emulsji z wykorzystaniem metody wielokrotnego rozpraszania światła

W celu zbadania stabilności otrzymanych emulsji kosmetycznych wykorzystano zjawisko wielokrotnego rozpraszania światła. Otrzymane wyniki zaprezentowano w trybie niereferencyjnym oraz referencyjnym. Tryb niereferencyjny przedstawiał zależność intensywności wstecznego rozproszenia światła (BS) od wysokości próbki w czasie (rys. 57).



Rys. 57. Wykres intensywności wstecznego rozproszenia światła (BS) w funkcji wysokości próbki dla Emulsji 1 (A) oraz Emulsji 3 (B) zawierających koniugat kwasu jasmonowego oraz tetrapeptydu YPFF-NH₂ przechowywanych przez 70 dni w temperaturze 25°C.

W analizie stabilności emulsji preferowanym trybem prezentacji wyników jest tryb referencyjny przedstawiający zmiany intensywności wstecznego rozproszenia światła (Δ BS) od wysokości próbki (rys. 58), ponieważ na jego podstawie można określić rodzaj zmian zachodzących w próbce. Parametr Δ BS oznacza różnicę pomiędzy pomiarem referencyjnym, wykonanym natychmiast po przygotowaniu próbki (oznaczonym jako „0 dni”), a pomiarem wykonanym po czasie (w przypadku badanych formułacji pomiary wykonane były w różnych odstępach czasowych do 70 dni od otrzymania danego preparatu).

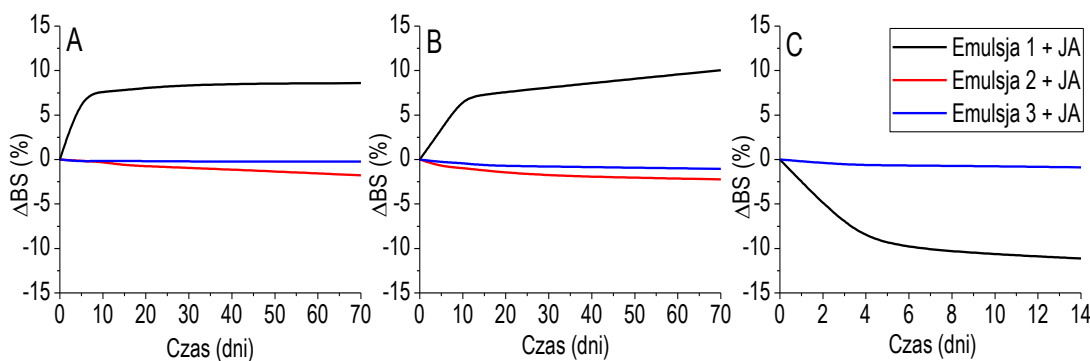


Rys. 58. Wykres zmian intensywności wstecznego rozproszenia światła (Δ BS) od wysokości próbki dla Emulsji 1 (A) oraz Emulsji 3 (B) zawierających koniugat kwasu jasmonowego oraz tetrapeptydu YPFF-NH₂ przechowywanych przez 70 dni w temperaturze 25°C.

Analiza zmian intensywności wstecznego rozproszenia światła od wysokości próbki umożliwia identyfikację rodzaju niestabilności próbki. W nawiązaniu do danych literaturowych [390], wartość parametru Δ BS \leq 2% badanej formułacji oznacza brak zmian w rozmiarze wielkości jej cząstek. Z kolei preparaty, dla których wartość parametru Δ BS przekracza 10%, są uznawane za układy niestabilne [391]. W przypadku Emulsji 1 + JA-YPFF-NH₂



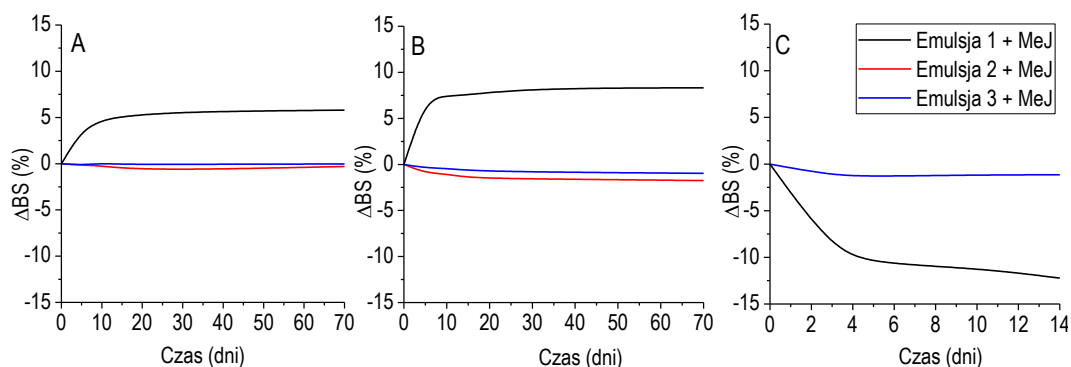
zaobserwowano większą zmianę wartości wstecznego rozproszenia światła (ok. 5%) w porównaniu z Emulsją 3, zawierającą tę samą substancję aktywną. Proces ten jest związany z występowaniem zjawiska flokulacji, ponieważ zmiany wartości parametru Δ BS zachodzą na całej wysokości badanej próbki (zmiana rozmiaru cząstek emulsji bez ich migracji w celi pomiarowej). Stwierdzono jednak, że wartość wstecznego rozproszenia dla obu próbek nie przekracza poziomu 10%, w związku z czym Emulsja 1 + JA-YPPFF-NH₂ oraz Emulsja 3 + JA-YPPFF-NH₂ przechowywane w temperaturze 25 °C przez okres 70 dni mogą zostać uznane za preparaty stabilne (rys. 58). W celu oceny kinetyki procesów destabilizacji, dla każdej przygotowanej formułacji przedstawiono profile zmian wstecznego rozpraszania światła (Δ BS) w funkcji czasu.



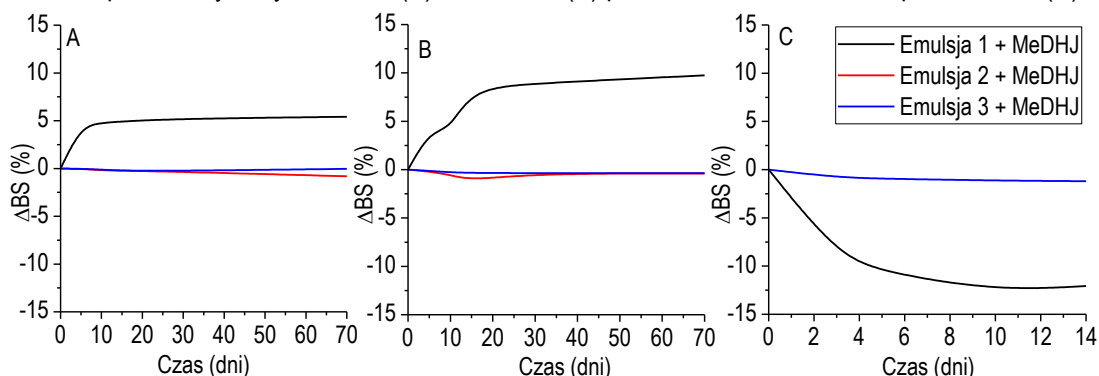
Rys. 59. Profile zmian wstecznego rozproszenia światła w czasie dla emulsji zawierających JA przechowywanych w 4 °C (A) oraz 25°C (B) przez 70 dni oraz w 45°C przez 14 dni (C).

Na rys. 59 zaprezentowano profile zmian wstecznego rozproszenia światła dla formułacji zawierających kwas jasmonowy przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych. Niezależnie od temperatury przechowywania preparatów, największe zmiany parametru Δ BS zaobserwowano dla Emulsji 1 + JA. Preparat ten uległ gwałtownemu procesowi flokulacji, którego intensywność wzrastała przez pierwsze dwa tygodnie od dnia jej przygotowania, zarówno podczas przechowywania w temperaturze 4°C (rys. 59A) oraz 25°C (rys. 59B). W obu przypadkach wartość parametru Δ BS nie przekroczyła jednak 10%, w związku z czym preparat ten można uznać za stabilny. Po upływie 70 dni nie zaobserwowano znaczących zmian we wstecznym rozpraszaniu światła dla Emulsji 1 + JA. W przypadku Emulsji 2 oraz Emulsji 3 zawierających JA oraz przechowywanych w temperaturze 4°C (rys. 59A) oraz 25°C (rys. 59B) zaobserwowano niewielkie zmiany parametru Δ BS (poniżej 3%), co wskazuje na wysoką stabilność tychże preparatów [390,391].

Przeprowadzono również testy przyspieszonego starzenia (paragraf 5.4) otrzymanych preparatów. W tym celu próbki przechowywano w temperaturze 45°C przez 14 dni. Stwierdzono, że Emulsja 1 + JA uległa procesowi flokulacji (rys. 59C), którego intensywność wzrastała przez pierwsze 5 dni od dnia jej otrzymania. Wartość parametru Δ BS przekroczyła poziom 10%, co oznacza, że formułacja ta ulega destabilizacji podczas jej przechowywania przez 14 dni w temperaturze 45 °C. Po upływie tego czasu nie odnotowano znaczących zmian wstecznego rozproszenia światła dla tej formułacji. Jak już wcześniej wspomniano, w przypadku Emulsji 2 + JA, zaobserwowano jej rozwarstwienie (złamanie). W związku z powyższym, wyniki zmian parametru Δ BS w czasie dla Emulsji 2 + JA, przechowywanej w temperaturze 45°C nie zostały przedstawione na rys. 59C. W oparciu o przedstawione wyniki badań stwierdzono, że Emulsja 3 zawierająca kwas jasmonowy wykazała największą stabilność we wszystkich wspomnianych warunkach przechowywania.



Rys. 60. Profile zmian wstecznego rozproszenia światła w czasie dla emulsji zawierających MeJ przechowywanych w 4 °C (A) oraz 25 °C (B) przez 70 dni oraz w 45 °C przez 14 dni (C).



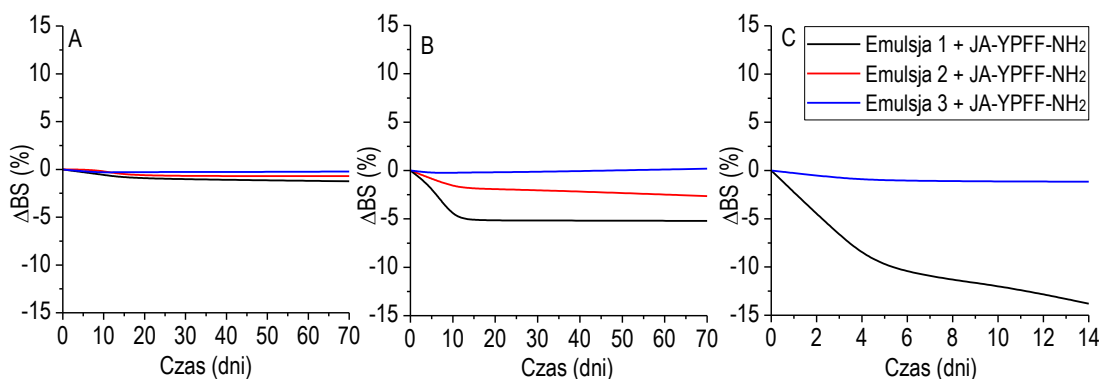
Rys. 61. Profile zmian wstecznego rozproszenia światła w czasie dla emulsji zawierających MeDHJ przechowywanych w 4°C (A) oraz 25°C (B) przez 70 dni oraz w 45°C przez 14 dni (C).

W pracy przedstawiono także profile ΔBS dla formułacji zawierających jasmonian metylu oraz dihydrojasmonian metylu przechowywanych w temperaturze 4, 25 oraz 45°C. Podobnie, jak w przypadku Emulsji 1 + JA, Emulsja 1 + MeJ przechowywana w temperaturze 4°C (rys. 60A) oraz 25°C (rys. 60B), jak również Emulsja 1 + MeDHJ przechowywana w temperaturze 4°C (rys. 61A) oraz 25°C (rys. 61B) wykazały najmniejszą stabilność spośród wszystkich analizowanych formułacji. Wartość parametru ΔBS tychże formułacji we wspomnianych warunkach przechowywania nie przekracza jednak poziomu 10%, w związku z czym preparaty te są uznawane za stabilne [391]. Zaobserwowano również, że Emulsja 1 + JA, przechowywana w temperaturze 4°C (rys. 59A) jest mniej stabilna, niż Emulsja 1, zawierająca MeJ oraz MeDHJ przechowywana w tych samych warunkach (rys. 60A and 61A). Wartość zmian wstecznego rozproszenia światła dla Emulsji 2 oraz Emulsji 3, zawierających MeJ oraz MeDHJ, przechowywanych w temperaturze 4°C (odpowiednio rys. 60A oraz rys. 61A) oraz 25°C (odpowiednio rys. 60B oraz 61B), nie przekroczyła wartości 2%, co świadczy o wysokiej stabilności tychże preparatów [390].

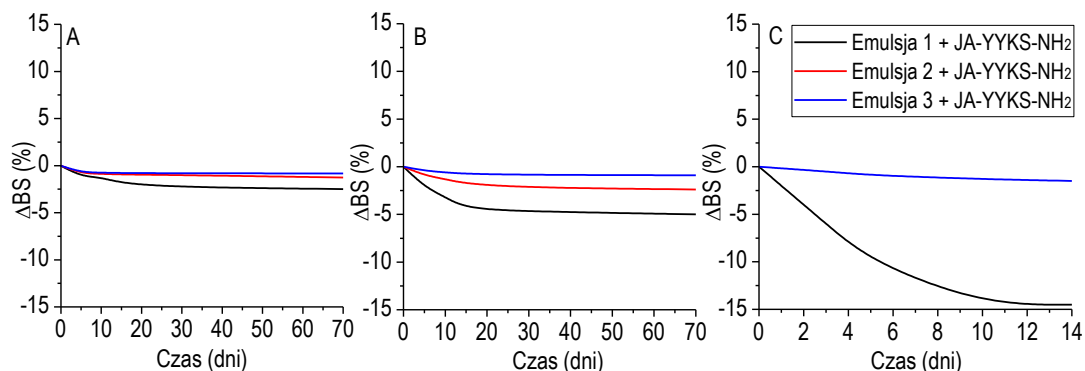
Przeprowadzone testy przyspieszonego starzenia dowiodły, że Emulsja 1 + MeJ (rys. 60C), jak również Emulsja 1 + MeDHJ (rys. 61C) przechowywane w 45°C, wykazują mniejszą stabilność ($\Delta BS > 10\%$) w porównaniu z Emulsją 3 ($\Delta BS < 10\%$), zawierającą te same jasmonidy oraz przechowywaną w tych samych warunkach. W związku z powyższym, Emulsję 1 + MeJ, jak również Emulsję 1 + MeDHJ uznano za preparaty niestabilne w 45°C [391]. Analogicznie do obserwacji odnotowanych dla preparatów zawierających JA, wszystkie zmiany wartości parametru ΔBS dla Emulsji 1 zawierającej jasmonian metylu oraz dihydrojasmonian metylu były spowodowane flokulacją preparatów. Spośród wszystkich przygotowanych preparatów zawierających jasmonian metylu oraz dihydrojasmonian metylu, największą stabilnością charakteryzowała się Emulsja 3 + MeJ oraz Emulsja 3 + MeDHJ ($\Delta BS < 1\%$) [390]. Podobnie, jak w przypadku Emulsji 2 zawierającej kwas jasmonowy, Emulsja 2 + MeJ oraz Emulsja 2 + MeDHJ uległy rozwarstwieniu po upływie 24 godzin przechowywania w 45 °C, w związku



z czym wyniki zmian parametru Δ BS w czasie dla tychże formulacji nie zostały zaprezentowane na rys. 60C oraz 61C.



Rys. 62. Profile zmian wstecznego rozproszenia światła w czasie dla emulsji zawierających JA-YPPF-NH₂ przechowywanych w 4°C (A) oraz 25°C (B) przez 70 dni oraz w 45°C przez 14 dni (C).



Rys. 63. Profile zmian wstecznego rozproszenia światła w czasie dla emulsji zawierających JA-YYKS-NH₂ przechowywanych w 4°C (A) oraz 25°C (B) przez 70 dni oraz w 45°C przez 14 dni (C).

W niniejszej rozprawie doktorskiej zaprezentowano także profile Δ BS dla formulacji zawierających koniugat JA-YPPF-NH₂ (rys. 62) oraz koniugat JA-YYKS-NH₂ (rys. 63), przechowywanych w temperaturze 4, 25 oraz 45 °C. Zaobserwowano, że Emulsja 1 + JA-YPPF-NH₂ oraz Emulsja 1 + JA-YYKS-NH₂ przechowywane w temperaturze 4°C (rys. 62A oraz rys. 63A) wykazały największą stabilność spośród wszystkich formulacji na bazie Emulsji 1, przechowywanych w tej samej temperaturze. Wartość parametru Δ BS wspomnianych preparatów nie przekracza poziomu 2% [390]. Analogicznie do obserwacji odnotowanych dla preparatów zawierających JA, MeJ oraz MeDHJ, wszystkie zmiany wartości parametru Δ BS dla formulacji zawierających koniugaty były spowodowane zjawiskiem flokulacji emulsji, czyli zmianą wielkości cząstek.

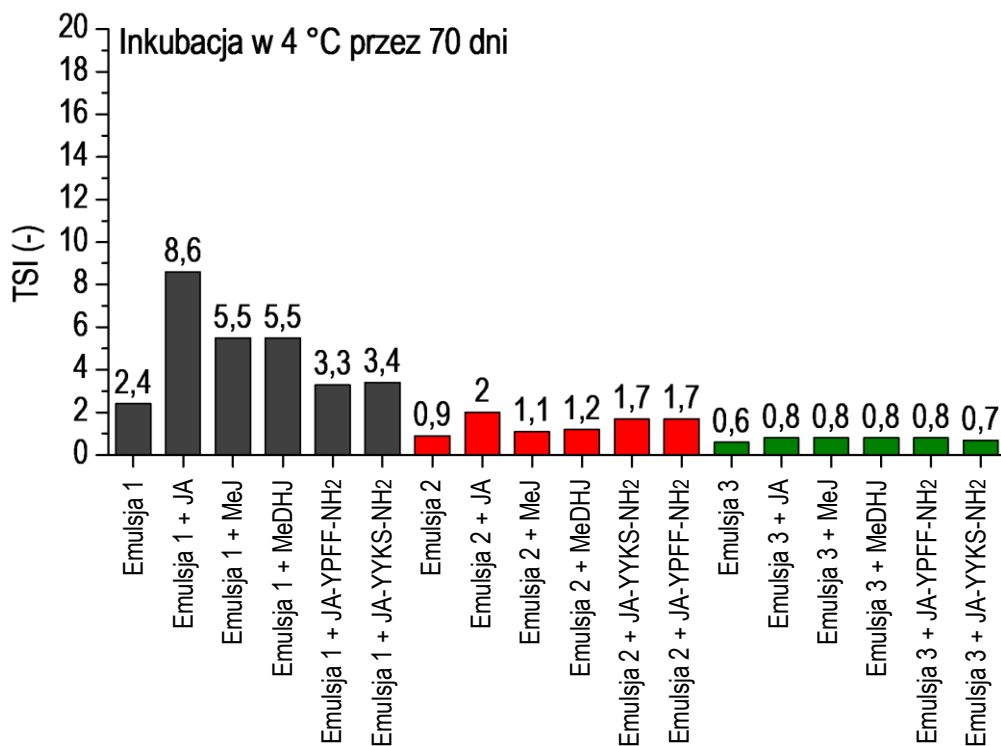
Przeprowadzone testy przyspieszonego starzenia dowiodły, że Emulsja 1 + JA-YPPF-NH₂ (rys. 62C), jak również Emulsja 1 + JA-YYKS-NH₂ (rys. 63C) przechowywane w 45°C są preparatami niestabilnymi, bowiem wartość zmian wstecznego rozproszenia światła przekracza poziom 10% [391]. Zaobserwowano również, że niezależnie od temperatury przechowywania, najstabilniejszą formulacją zawierającą koniugaty była Emulsja 3 + JA-YPPF-NH₂, jak również Emulsja 3 + JA-YYKS-NH₂. Analogicznie do wszystkich przygotowanych preparatów na bazie Emulsji 2, przechowywanych w temperaturze 45°C, zarówno Emulsja 2 + JA-YPPF-NH₂, jak i Emulsja 2 + JA-YYKS-NH₂ uległy złamaniu, w związku z czym nie przedstawiono profili zmian parametru Δ BS tychże formulacji.

Wyniki badania stabilności przygotowanych formulacji metodą MLS dowiodły, że niezależnie od warunków przechowywania oraz rodzaju dodanej substancji aktywnej

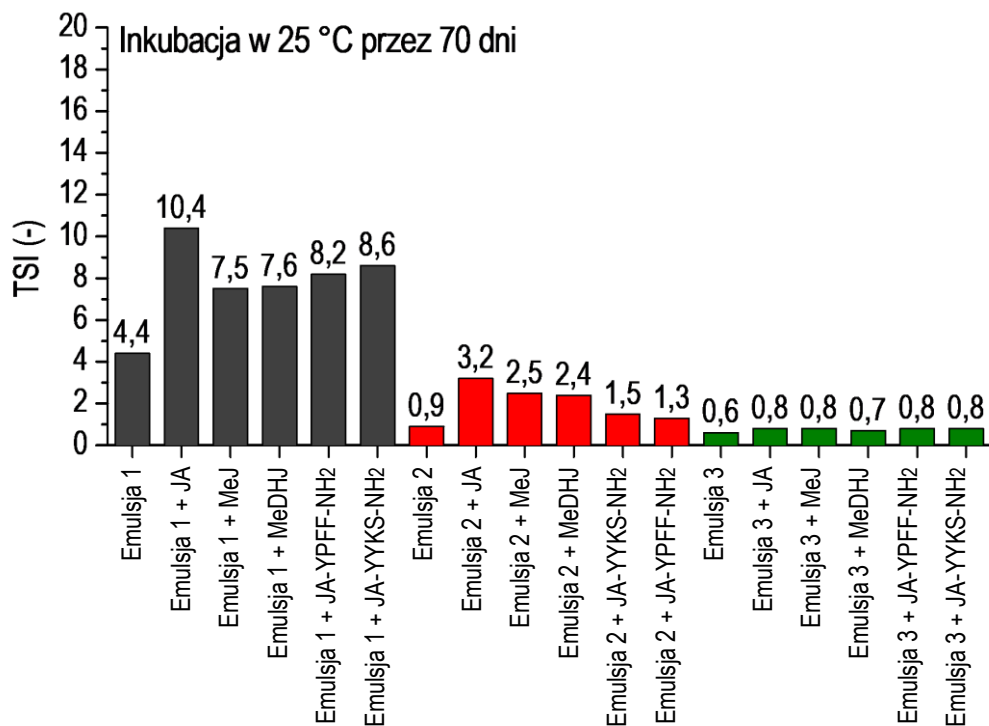


najstabilniejszą formacją jest Emulsja 3. Wysoka stabilność tejże emulsji może wynikać z temperatury jej otrzymywania (25°C) oraz obecności autoemulgatora w kompozycji preparatu. Emulsja 1 oraz 2 zawierają w swoim składzie takie same ilości emulgatorów. Emulsja 1 zawiera bowiem 6,00 % w/w alkoholu cetylowego oraz 4,00 % wag monostearynianu glicerolu, natomiast Emulsja 2 - 10,00 % w/w alkoholu cetearylowego. Pomimo tego faktu stwierdzono mniejszą stabilność Emulsji 1. Jest to prawdopodobnie wynikiem słabej rozpuszczalności jasmonidów w fazie wodnej, stanowiącej większość (76,50 % w/w) kompozycji Emulsji 1. Emulsja 2 z kolei składa się z 79 % w/w fazy tłuszczowej stanowiącej dobry rozpuszczalnik dla badanych związków. Ponadto, stabilność tejże emulsji w temperaturze 4 oraz 25°C jest również związana z jej lepkością. Wysoka lepkość Emulsji 2 (powyżej 107 000 mPa × s) redukuje prawdopodobieństwo występowania ruchów Browna, prowadzących do aglomeracji cząstek fazy rozproszonej emulsji oraz jej destabilizacji [392,393]. Formułacja ta ulega natomiast rozwarstwieniu w temperaturze 45°C, co jest związane z upłynnieniem fazy tłuszczowej, znacznym obniżeniem lepkości oraz zniszczeniem struktury emulsji. Zaobserwowano także różnicę w przebiegu profili Δ BS preparatów na bazie Emulsji 1. Stwierdzono, że w przypadku Emulsji 1+JA, Emulsji 1+MeJ oraz Emulsji 1+MeDHJ, wartości parametru Δ BS są dodatnie, podczas gdy dla Emulsji 1+ JA-YPPFF-NH₂ oraz Emulsji 1+ JA-YYKS-NH₂ wartości te są ujemne. Jest to związane z początkowym rozmiarem cząstek tychże formułacji. Zgodnie z informacjami zawartymi w instrukcji obsługi aparatu Turbiscan LabExpert [394], dla formułacji o początkowym rozmiarze cząstek <0,6 μ m wartości parametru Δ BS są dodatnie, natomiast dla formułacji o początkowym rozmiarze cząstek >0,6 μ m są one ujemne. W nawiązaniu do wyników analizy rozkładu wielkości cząstek przygotowanych preparatów metodą LD (tabela 17), wartości parametru D(4,3) dla Emulsji 1, zawierającej JA, MeJ oraz MeDHJ wynoszą odpowiednio 0,577±0,007 μ m, 0,454±0,001 μ m oraz 0,446±0,001 μ m, a zatem nie przekraczają rozmiaru 0,6 μ m. W przypadku Emulsji 1, zawierającej koniugat JA-YPPFF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂, wartości te są większe, niż 0,6 μ m i wynoszą odpowiednio 0,611±0,051 μ m oraz 0,609±0,007 μ m. Można zatem stwierdzić, że wyniki analizy stabilności formułacji metodą MLS są zgodne z wynikami otrzymanymi metodą LD.

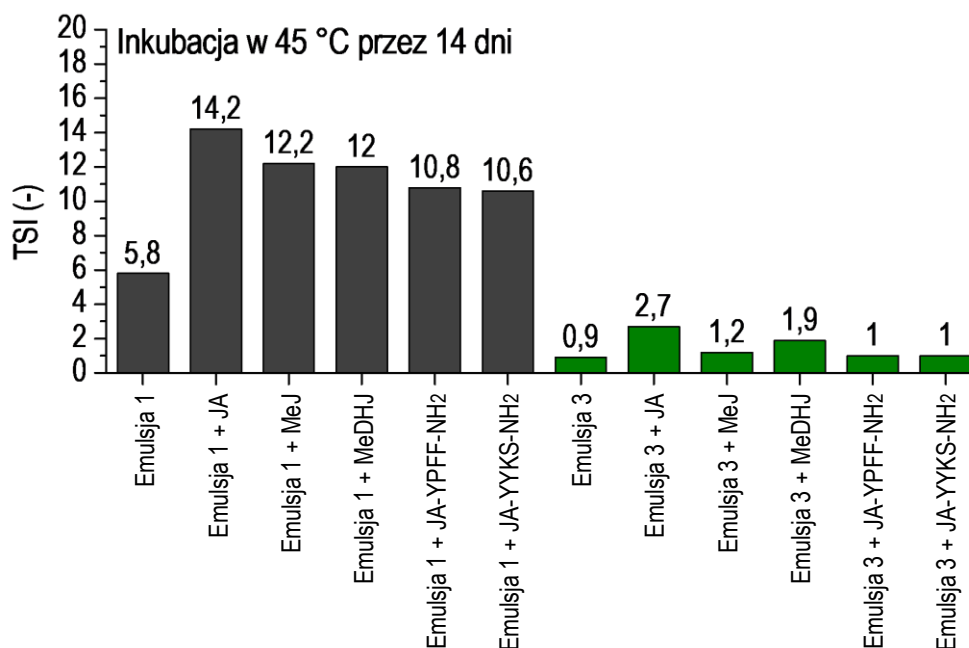
Każde zjawisko destabilizacji zachodzące w badanej próbce ma wpływ na wartość wstecznego rozpraszania oraz transmisji światła padającego na tę próbkę. Emulsja 1, 2 oraz 3 to preparaty nieprzejrzyste, w związku z czym analizę ich stabilności prowadzono w oparciu o zmiany intensywności światła wstecznie rozpraszanego przez próbkę. Należy jednak wspomnieć, że nawet dla próbek nieprzejrzystych obserwuje się niewielką transmisję światła. W celu porównania stabilności wszystkich otrzymanych preparatów obliczono wartość parametru TSI dla przygotowanych formułacji. Indeks stabilności określa globalną stabilność produktu i jest wykorzystywany do porównania stabilności różnych próbek Im większa wartość parametru TSI, tym większa jest niestabilność badanego układu. W związku z powyższym, parametr TSI nazywany jest współczynnikiem niestabilności [395]. W celu determinacji wpływu dodatku substancji aktywnej na stabilność badanych formułacji, obliczono parametr TSI zarówno baz kosmetycznych, jak i preparatów zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. Wyniki obliczeń parametru TSI przygotowanych preparatów przedstawiono na rys. 64 - 66.



Rys. 64. Wartość parametru TSI dla formulacji przechowywanych przez okres 70 dni w temperaturze 4 °C.



Rys. 65. Wartość parametru TSI dla formulacji przechowywanych przez okres 70 dni w temperaturze 25 °C.



Rys. 66. Wartość parametru TSI dla formulacji przechowywanych przez okres 14 dni w temperaturze 45°C.

Stwierdzono, że wyniki kalkulacji parametru TSI są zgodne z wynikami analizy parametru Δ B_S dla wszystkich badanych formulacji zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. Zaobserwowano, że największą stabilnością charakteryzują się preparaty przechowywane w 4°C, natomiast najmniejszą - preparaty przechowywane w 45°C. Stwierdzono również, że spośród wszystkich preparatów przechowywanych w temperaturze 4 oraz 25°C, najmniej stabilne są formulacje na bazie Emulsji 1, natomiast najbardziej stabilne są preparaty na bazie Emulsji 3. Odnotowano także wpływ dodatku jasmonidów na stabilność próbki. Stwierdzono, że niezależnie od warunków przechowywania formulacji, dodatek każdego z badanych związków powoduje jej pewną destabilizację. W oparciu o otrzymane wyniki TSI dla preparatów przechowywanych w temperaturze 4°C (rys. 64) stwierdzono, że spośród wszystkich substancji aktywnych, dodatek kwasu jasmonowego powodował największą destabilizację Emulsji 1 (TSI = 8,6) oraz Emulsji 2 (TSI = 2,0). Dla pozostałych preparatów zawierających pochodne kwasu jasmonowego wartości TSI były niższe. Podobne obserwacje odnotowano w przypadku formulacji przechowywanych w temperaturze 25°C (rys. 65), bo wartości parametru TSI dla Emulsji 1 + JA oraz Emulsji 2 + JA wynosiły odpowiednio 10,4 oraz 3,2. W przypadku preparatów na bazie Emulsji 3, przechowywanych w temperaturze 4 oraz 25°C, dodatek jasmonidu powodował niewielką zmianę parametru TSI w porównaniu z bazą kosmetyczną. Fakt ten wskazuje na dużą stabilność formulacji na bazie Emulsji 3, zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne.

Na rys. 66 przedstawiono wartości parametru TSI dla preparatów na bazie Emulsji 1 oraz 3, przechowywanych przez okres 14 dni w temperaturze 45 °C. W związku z rozwarstwieniem wszystkich preparatów na bazie Emulsji 2 wskutek działania wysokiej temperatury, ich wartości TSI nie zostały zaprezentowane. Zaobserwowano, że dodatek JA powoduje największy wzrost parametru TSI Emulsji 1 oraz Emulsji 3 w porównaniu z pozostałymi substancjami aktywnymi. Wartość TSI dla Emulsji 1 + JA oraz Emulsji 3 + JA, przechowywanych w temperaturze 45°C, wynosi odpowiednio 14,7 oraz 2,7. Destabilizacja próbki wskutek dodatku kwasu jasmonowego, niezależnie od warunków przechowywania, wynika prawdopodobnie z jego gęstości. JA cechuje się bowiem większą gęstością ($1,1 \pm 0,1$ g/mL), niż MeJ oraz MeDHJ ($1,1 \pm 0,1$ g/mL), co może utrudniać otrzymanie homogenicznego układu i w efekcie prowadzić do spadku jego stabilności.

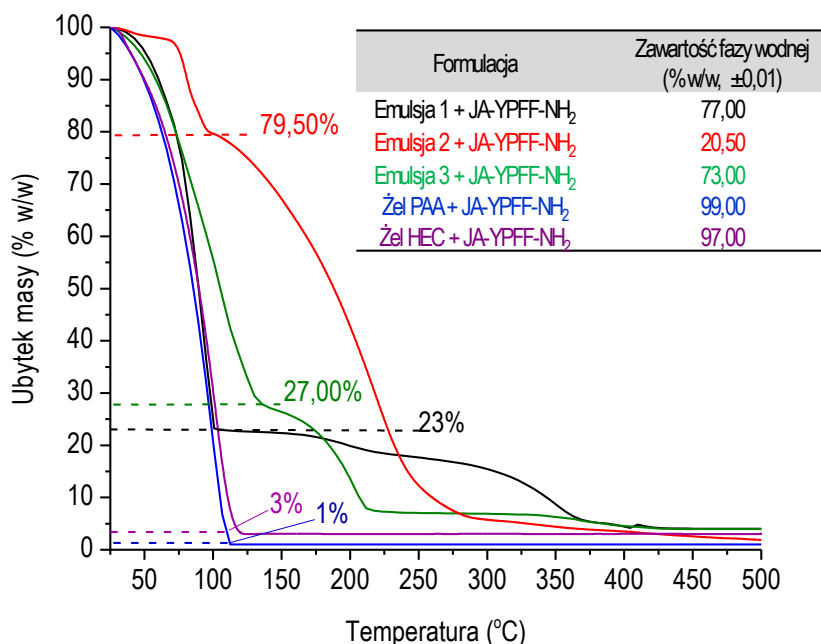


PODSUMOWUJĄC, w niniejszej pracy doktorskiej zbadano wpływ warunków przechowywania na stabilność przygotowanych preparatów zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. W tym celu wykorzystano zjawisko wielokrotnego rozpraszania światła, które umożliwia detekcję wszystkich rodzajów niestabilności próbki. W oparciu o otrzymane wartości wstecznego rozproszenia światła stwierdzono, że największą stabilnością wykazały preparaty przechowywane w 4°C, natomiast najmniejszą - preparaty przechowywane w 45°C. Zaobserwowano również, że niezależnie od warunków przechowywania, największą stabilnością cechowały się preparaty na bazie Emulsji 3. Jest to związane z obecnością autoemulgatora w kompozycji wspomnianych formułacji. Wysoką stabilność odnotowano także dla preparatów na bazie Emulsji 2, przechowywanych w temperaturze 4 oraz 25 °C. W wyniku przechowywania w 45°C preparaty te ulegają natomiast rozwarstwieniu, co jest związane z obniżeniem ich lepkości wskutek upłynnienia fazy tłuszczowej. Najmniejszą stabilność w temperaturze przechowywania 4 oraz 25°C wykazały natomiast preparaty na bazie Emulsji 1. Jest to prawdopodobnie związane z ich niską lepkością oraz brakiem autoemulgatora w kompozycji. Ponadto, stwierdzono zależność pomiędzy stabilnością preparatu a rozpuszczalnością substancji aktywnej w podłożu kosmetycznym. Im większa lipofilowość substancji aktywnych, tym lepsza ich rozpuszczalność w podłożu o dużej zawartości fazy tłuszczowej. Badane substancje aktywne mają charakter lipofilowy, w związku z czym słabo rozpuszczają się w bazie Emulsji 1 o niskiej zawartości fazy tłuszczowej (22,50 % w/w).

W pracy zbadano także wpływ dodatku kwasu jasmonowego i jego pochodnych na stabilność przygotowanych preparatów. Stwierdzono, że dodatek kwasu jasmonowego powoduje największą destabilizację Emulsji 1 oraz 2 w temperaturze przechowywania 4 oraz 25 °C. Jest to prawdopodobnie związane z właściwościami fizykochemicznymi JA. Związek ten charakteryzuje się bowiem większą gęstością, niż MeJ czy MeDHJ, co może utrudniać otrzymanie homogenicznego układu i w efekcie prowadzić do obniżenia jego stabilności. Wartość parametru ΔBS wszystkich przygotowanych formułacji, przechowywanych w temperaturze 4 oraz 25°C nie przekracza jednak progu 10%, w związku z czym są one uznawane za preparaty stabilne. Wartość $\Delta BS > 10\%$ została odnotowana w przypadku preparatów na bazie Emulsji 1 przechowywanych w temperaturze 45°C. W związku z powyższym, zostały one uznane za niestabilne we wspomnianych warunkach przechowywania [390,391].

20.7. Badanie wpływu dodatku kwasu jasmonowego i jego pochodnych na stabilność termiczną formułacji z wykorzystaniem analizy termogravimetrycznej

Stabilność termiczna preparatów kosmetycznych stanowi niezwykle ważny aspekt podczas określania warunków ich transportu oraz przechowywania. W niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiono wyniki analizy dodatku jasmonidów i ich pochodnych na stabilność termiczną formułacji z wykorzystaniem analizy termogravimetrycznej. Analiza TGA pozwala również na potwierdzenie udziału fazy wodnej oraz tłuszczowej w kompozycji emulsji. Podczas przechowywania produktu, po jego otwarciu może nastąpić zmiana zawartości procentowej fazy wodnej wskutek jej parowania. Tendencja preparatu do utraty wody może świadczyć o jego niestabilności. W związku z powyższym przeprowadzono jakościową analizę składu faz przygotowanych formułacji na podstawie analizy etapów ubytku masy próbki. Badania prowadzono po czasie 70 dni od preparatyki formułacji, przechowywanych w temperaturze 25°C. Wybór warunków przechowywania próbki przeznaczonej do analizy TGA był celowy ze względu na większe narażenie próbki na parowanie wody w 25°C, aniżeli w 4°C. Ponadto, preparaty zakupione przez konsumentów są przechowywane po otwarciu w pomieszczeniu, w którym temperatura oscyluje zwykle w granicach 25°C.

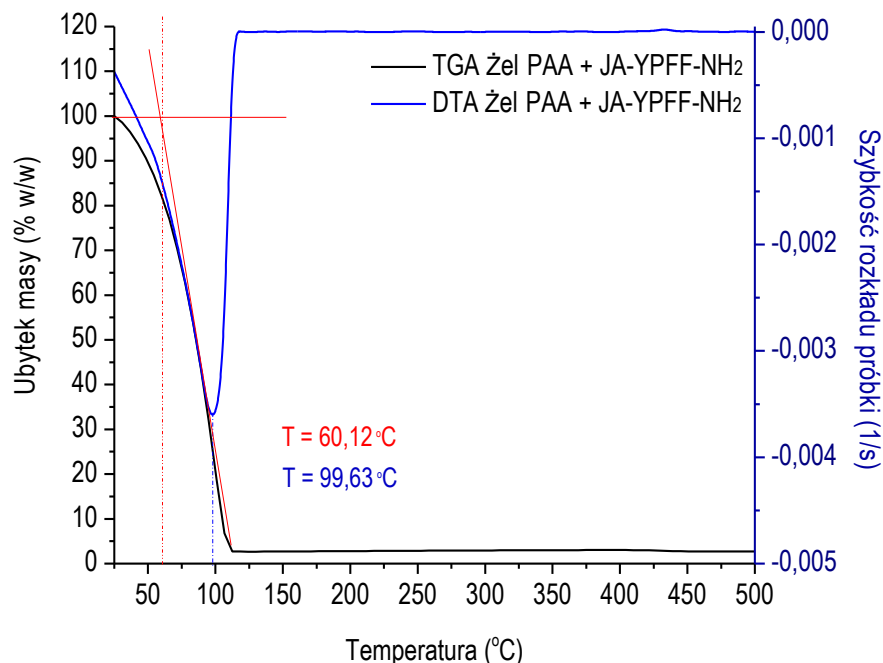


Rys. 67. Wykres termograwimetryczny przygotowanych formułacji zawierających koniugat JA-YPPF-NH₂.

Na rys. 67 przedstawiono wykres termograwimetryczny przygotowanych preparatów zawierających koniugat JA-YPPF-NH₂. Krzywa TGA badanej formułacji przedstawia spadek jej masy wskutek wzrostu temperatury. Stopnie widoczne na krzywych TGA formułacji (zaznaczone przerywaną linią na rys. 67) stanowią etapy ubytku masy próbki i są związane odparowaniem fazy wodnej próbki. Potwierdzeniem tego założenia jest fakt, że wysokość pierwszego stopnia krzywej TGA każdej formułacji odpowiada procentowej zawartości wody w kompozycji preparatu. Ponadto, gwałtowne nachylenie krzywych odpowiadające spadkowi masy próbki, zachodzi wówczas, gdy układ zbliża się do wartości temperatury 100°C (temperatura wrzenia wody). Dalsze stopnie przedstawionych krzywych TGA są związane z rozkładem pozostałych komponentów badanych preparatów. W przypadku Emulsji 1, 2 oraz 3 są to komponenty fazy tłuszczowej, natomiast w przypadku hydrożeli obserwuje się rozkład komponentów konsystencjotwórczych (karbomer kwasu akrylowego w żelu PAA oraz hydroksyetyloceluloza w żelu HEC). W oparciu o otrzymane wyniki badań stwierdzono, że zawartość fazy wodnej przygotowanych formułacji kosmetycznych zawierających JA-YPPF-NH₂ nie ulega zmianie w okresie ich przechowywania w temperaturze 25°C, co świadczy o ich stabilności termicznej. Analogiczne obserwacje odnotowano dla preparatów zawierających pozostałe substancje aktywne (JA, MeJ, MeDHJ oraz JA-YYKS-NH₂). Wykorzystanie analizy termograwimetrycznej do oceny zawartości fazy wodnej formułacji zostało już przedstawione w literaturze. Frenkel i Garti [396] wykorzystali TGA do oceny stabilności emulsji typu o/w, podczas gdy Kim i in. [397] przeprowadzili analizę zawartości wody w hydrożelach zawierających kwas hialuronowy.

Głównym celem przeprowadzonej analizy TGA było zbadanie wpływu dodatku jasmonidów i ich pochodnych na stabilność termiczną przygotowanych preparatów. W związku z powyższym przeprowadzono badania samych baz kosmetycznych oraz formułacji zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. W celu lepszej interpretacji wyników do otrzymanych krzywych TGA wyznaczono styczne, których przecięcie odzwierciedla temperaturę, przy której próbka zaczyna ulegać zmianom masy. Ponadto, wyznaczono pierwszą pochodną każdej z otrzymanych krzywych termograwimetrycznych względem temperatury. Wyznaczanie pochodnej krzywej TGA jest nazywane różnicową analizą termograwimetryczną (*ang.* differential thermal analysis, DTA) i umożliwia ocenę zmiany szybkości rozkładu próbki wraz ze wzrostem temperatury. Minimum krzywej DTA

stanowi odzwierciedlenie momentu, w którym przemiana próbki związana z jej utratą masy zachodzi najszybciej. Im niższa temperatura układu, w której krzywa DTA osiągnie swoje minimum, tym mniejsza stabilność termiczna badanej próbki [398]. Na rys. 68 przedstawiono krzywe TGA oraz DTA dla żelu PAA + JA-YPPF-NH₂.



Rys. 68. Wykres przedstawiający krzywe TGA oraz DTA dla żelu PAA + JA-YPPF-NH₂.

W oparciu o styczną do krzywej TGA wyznaczono początkową temperaturę zmian próbki [399], która wynosi 60,12°C (kolor czerwony). Dodatkowo, w oparciu o wyznaczoną krzywą DTA (kolor niebieski) odnotowano najszybszy rozkład próbki w temperaturze 99,63°C, co jest związane z utratą wody (97% w/w całkowitej masy próbki). W ramach niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono analizę TGA i DTA wszystkich przygotowanych formułacji w celu porównania ich stabilności termicznej, a otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 18.

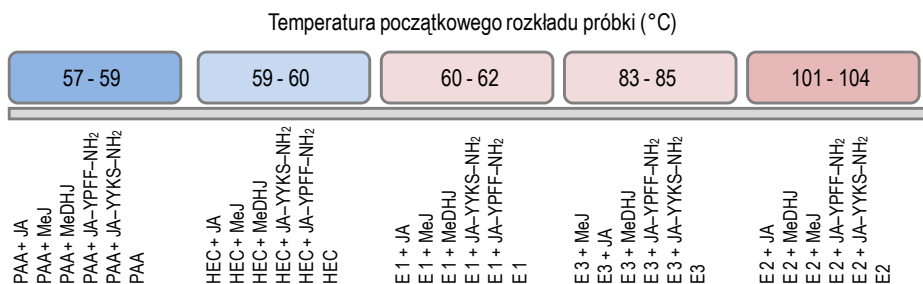
**Tabela 18.** Zestawienie wyników analizy TGA oraz DTA przygotowanych formułacji zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne.

FORMULACJA	POCZĄTKOWA TEMPERATURA ROZKŁADU PRÓBKII (°C)	TEMPERATURA NAJSZYBSZEGO ROZKŁADU PRÓBKII (°C)
Emulsja 1	61,86	96,94
Emulsja 1 + JA	60,34	94,37
Emulsja 1 + MeJ	60,41	95,45
Emulsja 1 + MeDHJ	60,45	95,23
Emulsja 1 + JA-YPFF-NH ₂	61,25	94,50
Emulsja 1 + JA-YYKS-NH ₂	60,75	94,97
Emulsja 2	103,68	110,17
Emulsja 2 + JA	101,89	106,33
Emulsja 2 + MeJ	102,91	108,12
Emulsja 2 + MeDHJ	102,14	107,98
Emulsja 2 + JA-YPFF-NH ₂	103,18	109,50
Emulsja 2 + JA-YYKS-NH ₂	103,25	109,32
Emulsja 3	84,25	110,50
Emulsja 3 + JA	82,99	108,23
Emulsja 3 + MeJ	82,81	108,85
Emulsja 3 + MeDHJ	83,65	109,10
Emulsja 3 + JA-YPFF-NH ₂	83,79	109,64
Emulsja 3 + JA-YYKS-NH ₂	84,11	109,78
Żel PAA	58,64	100,17
Żel PAA + JA	57,02	97,15
Żel PAA + MeJ	57,15	98,22
Żel PAA + MeDHJ	57,36	98,56
Żel PAA + JA-YPFF-NH ₂	58,11	99,17
Żel PAA + JA-YYKS-NH ₂	58,23	99,24
Żel HEC	60,35	99,86
Żel HEC + JA	58,97	97,12
Żel HEC + MeJ	59,45	98,88
Żel HEC + MeDHJ	59,61	98,92
Żel HEC + JA-YPFF-NH ₂	60,12	99,63
Żel HEC + JA-YYKS-NH ₂	60,04	99,75

W oparciu o wyniki badań przedstawione w tabeli 18 stwierdzono, że spośród wszystkich przygotowanych emulsji najmniejszą stabilnością termiczną cechują się preparaty na bazie żelu PAA, których początkowa temperatura rozkładu mieści się w zakresie od 57,02 °C (żel PAA + JA) do 58,64 °C (baza żelu PAA). Najszybszy rozkład preparatów na bazie żelu PAA zaobserwowano w przedziale temperaturowym od 97,15°C (żel PAA + JA) do 100,17°C (baza żelu PAA). Największą stabilnością termiczną wykazały preparaty na bazie Emulsji 2, których temperatura rozkładu mieści się w przedziale od 103,68 °C (Emulsja 2 + JA) do 101,89 °C (baza Emulsji 2). Najszybszy rozkład preparatów na bazie żelu PAA następuje w przedziale temperatur od 108,23°C (Emulsja 2 + JA) do 110,50 °C (baza Emulsji 2). Zaobserwowano zależność pomiędzy zawartością wody a stabilnością termiczną preparatu; im mniejsza zawartość wody w kompozycji, tym wyższa temperatura początkowa rozkładu próbki. Wynika to z faktu, że wzrost temperatury powoduje parowanie fazy wodnej, a dopiero następnie - termiczny rozkład oraz spoielenie pozostałych komponentów formułacji.



Zgodnie z powyższym, przygotowane preparaty można uszeregować zgodnie z rosnącą stabilnością termiczną według następującego schematu (rys. 69):



Rys. 69. Schemat stabilności termicznej przygotowanych formułacji.

W oparciu o wyniki badań przedstawione w tabeli 18 oraz na rys. 69 stwierdzono, że rodzaj substancji aktywnej nie ma znaczącego wpływu na stabilność termiczną przygotowanych formułacji. Zaobserwowano, że moment początkowej temperatury rozkładu próbki, jak również temperatury, w której następuje najszybszy jej rozkład wykazują podobne wartości dla danej bazy kosmetycznej, jak i preparatu zawierającego substancję aktywną. Należy wspomnieć, że stabilność termiczna (badana przy użyciu metody TGA i DTG) nie jest tożsama ze stabilnością w czasie (badaną metodą MLS).

PODSUMOWUJĄC, w przedkładanej rozprawie doktorskiej przeprowadzono ocenę wpływu dodatku jasmonidów i ich pochodnych na stabilność termiczną formułacji z wykorzystaniem analizy termogravimetrycznej. Odnotowano brak wpływu dodatku substancji aktywnych na stabilność termiczną wszystkich przygotowanych preparatów. Stwierdzono, że stabilność termiczna formułacji zależy przede wszystkim od ich kompozycji. Zaobserwowano, że im większa zawartość fazy wodnej formułacji, tym szybsza jej degradacja w wyniku działania wysokich temperatur. W związku z powyższym, największą stabilnością termiczną cechowały się preparaty na bazie Emulsji 2 (20,50 % w/w fazy wodnej), natomiast najmniejszą - preparaty na bazie żelu PAA (99 % w/w fazy wodnej). Analiza TGA została również wykorzystana do oceny zmian składu kompozycji preparatów w czasie. W oparciu o wyniki badań nie odnotowano zmian w składzie przygotowanych formułacji zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne.

20.8. Oznaczanie kwasu jasmonowego i jego pochodnych w preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Skuteczność działania produktów pielęgnacyjnych zależy nie tylko od ilości substancji aktywnej, jaka uwalnia się z danego podłoża do skóry, ale również od stabilności tejże substancji w danym preparacie kosmetycznym. Wysokosprawna chromatografia cieczowa została wykorzystana w niniejszej pracy doktorskiej do jakościowego i ilościowego oznaczenia jasmonidów i ich pochodnych w przygotowanych formułacjach kosmetycznych.

20.8.1. Wyznaczanie czasów retencji badanych związków

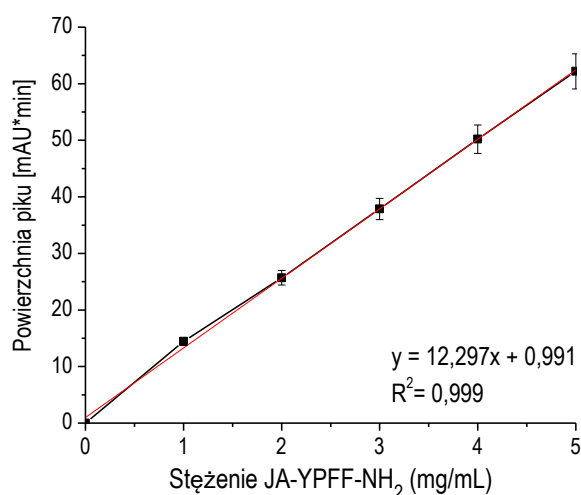
W oparciu o analizę jakościową przygotowanych roztworów wzorcowych ustalono czas retencji badanych związków, które przedstawiono w tabeli 19.

**Tabela 19.** Wyznaczone czasy retencji badanych jasmonidów i ich pochodnych.

WZORZEC	CZAS RETENCJI (MIN)
JA	11,1
MeJ	13,9
MeDHJ	14,7
JA-YPFF-NH ₂	10,7
JA-YYKS-NH ₂	8,6

20.8.2. Sporządzenie krzywych kalibracyjnych oraz walidacja metody

Kolejnym etapem badań było sporządzenie krzywych kalibracyjnych z wykorzystaniem roztworów wzorcowych badanych jasmonidów i ich pochodnych. Następnie dla otrzymanych krzywych kalibracyjnych, wyznaczono równanie regresji liniowej oraz współczynnik korelacji R^2 . Dla każdej serii pomiarów stężeń substancji aktywnej obliczono również odchylenia standardowe. Na rys. 70 przedstawiono krzywą kalibracyjną dla koniugatu JA-YPFF-NH₂. Przedstawiona krzywa, jak również krzywe kalibracyjne dla pozostałych jasmonidów miały charakter prostoliniowy.

**Rys. 70.** Krzywa kalibracyjna dla koniugatu JA-YPFF-NH₂.

W tabeli 20 przedstawiono równania regresji liniowej opisujące krzywe wzorcowe dla badanych związków. Zaobserwowano, że współczynniki korelacji R^2 dla wszystkich sporządzonych krzywych są bliskie jedności, co oznacza wysoki wskaźnik dopasowania modelu do danych empirycznych [400].

Tabela 20. Równania regresji liniowej, opisujące krzywe wzorcowe dla badanych jasmonidów.

WZORZEC	RÓWNANIE REGRESJI LINIOWEJ	WSPÓŁCZYNNIK KORELACJI R^2 (-)
JA	$y = 1,468x + 0,283$	0,985
MeJ	$y = 1,696x + 0,319$	0,996
MeDHJ	$y = 2,715x - 0,666$	0,995
JA-YPFF-NH ₂	$y = 12,297x + 0,991$	0,999
JA-YYKS-NH ₂	$y = 12,264x + 0,781$	0,999

Współczynnik korelacji dla wszystkich wyznaczonych krzywych kalibracyjnych mieści się w przedziale wartości 0,9 - 1,0. Zgodnie ze Skalą Guilforda świadczy to o bardzo dobrym dopasowaniu modelu i oznacza, że równanie regresji w wysokim stopniu wyjaśnia

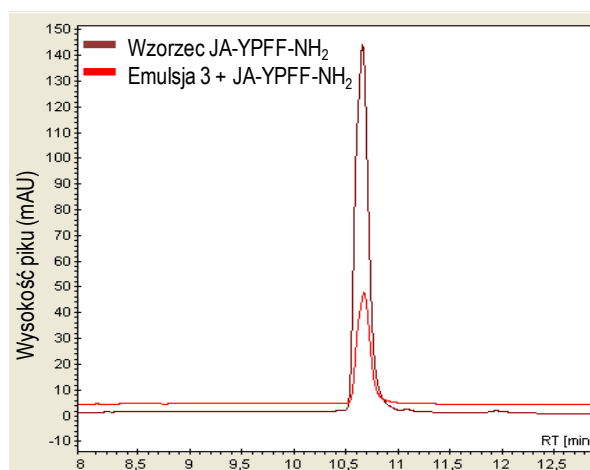
zmienność zmiennej zależnej (powierzchni piku, oś y) od zmiennej niezależnej (stężenie jasmonidu, oś x) [401]. Otrzymane krzywe kalibracyjne dowodzą o szerokim zakresie liniowości opracowanej metody przy zachowaniu wysokich współczynników korelacji. Otrzymane wartości odchyłeń standardowych wskazywały na wysoką powtarzalność metody. Przed rozpoczęciem analizy HPLC przygotowanych preparatów wyznaczono również parametry LOD i LOQ opracowanej metody analitycznej. Otrzymane wartości parametrów LOD i LOQ wynoszą odpowiednio 0,307 mg/mL oraz 0,921 mg/mL.

20.8.3. Ocena potencjalnego wpływu podłoża kosmetycznego na wyniki analizy

Kolejnym etapem badań było ustalenie, czy przygotowane bazy kosmetyczne nie posiadają w swoim składzie substancji o czasie retencji takim samym z badanymi jasmonidami. W tym celu przeprowadzono analizę HPLC formułacji niezawierających jasmonidów i ich pochodnych. Na otrzymanych chromatogramach nie stwierdzono obecności pików w przedziale czasowym, w którym odnotowano czasy retencji badanych jasmonidów (10 - 15 min).

20.8.4. Oznaczanie jakościowe oraz ilościowe kwasu jasmonowego i jego pochodnych w preparatach kosmetycznych

Znaczny spadek stężenia substancji aktywnej w preparacie kosmetycznym jest zmianą ilościową i może świadczyć o niestabilności tejże substancji w zdefiniowanych warunkach przechowywania. Indykatorem niestabilności substancji może być również zmiana jej czasu retencji przy niezmiennych warunkach analizy HPLC (zmiana jakościowa substancji). Na rys. 71 przedstawiono zestawienie chromatogramów wzorca koniugatu JA-YPFF-NH₂, jak również koniugatu obecnego w Emulsji 3 przechowywanej przez czas 70 dni w 25°C. Zgodność czasów retencji potwierdza, że koniugat nie ulega zmianom jakościowym jako substancja aktywna formułacji przechowywanej w wyżej wspomnianych warunkach. W pracy potwierdzono zgodność czasów retencji wzorców wszystkich badanych jasmonidów z tymi obecnymi w przygotowanych formułacjach przechowywanych przez okres 70 dni w temperaturze 4 oraz 25°C.



Rys. 71. Zestawienie chromatogramów wzorca koniugatu JA-YPFF-NH₂ oraz koniugatu obecnego w Emulsji 3 przechowywanej przez czas 70 dni w 25°C

Przeprowadzono także oznaczanie ilościowe JA i jego pochodnych w przygotowanych formułacjach przechowywanych w wyżej wspomnianych warunkach. Analiza ilościowa miała na celu określenie zmian stężenia jasmonidów w otrzymanych preparatach kosmetycznych. W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono wyniki analizy ilościowej jasmonidów w przygotowanych preparatach po okresie przechowywania 70 dni w temperaturze 4 oraz 25°C. Nie przedstawiono natomiast wyników dla preparatów



przechowywanych w temperaturze 45°C. W oparciu o wyniki badań stabilności preparatów metodą MLS oraz LD w 45°C stwierdzono, że Emulsja 3 jest jedyną stabilną formacją podczas przechowywania w temperaturze 45°C. Pozostałe emulsje (1 oraz 2) zostały uznane za niestabilne podczas przechowywania w 45°C. Substancja aktywna stanowi część kompozycji preparatu kosmetycznego. W związku z powyższym, brak stabilności preparatu czyni go niezdatnym do użytku nawet, jeśli ilość substancji aktywnej nie zmienia się w czasie.

Stężenie badanych substancji obliczono w oparciu o równania regresji liniowej, przedstawione w tabeli 20. Dodatkowo, obliczono procentowy ubytek jasmonidu w odniesieniu do jego początkowej zawartości w analizowanej formacji. Przy założeniu, że jasmonidy nie ulegają degradacji w otrzymanych preparatach kosmetycznych, ich całkowite, teoretyczne stężenie w próbce przygotowanej do analizy HPLC wynosi 5 mg/mL (paragraf 17.9.3). Wyniki analizy ilościowej kwasu jasmonowego i jego pochodnych w przygotowanych formacjach przedstawiono w tabeli 21.

Tabela 21. Analiza ilościowa kwasu jasmonowego i jego pochodnych w przygotowanych preparatach po okresie przechowywania 70 dni w temperaturze 4 oraz 25 °C, część I.

BADANY ZWIĄZEK	PREPARAT	TEMPERATURA PRZECHOWYWANIA (°C)	OBLICZONE STĘŻENIE (mg/mL, ± S.D ¹)	ŚREDNIA WARTOŚĆ UBYTKU JASMONIDU (%)	
JA	Emulsja 1	4	5,155 ± 0,000	0,00*	
		25	4,830 ± 0,460	3,4	
	Emulsja 2	4	4,830 ± 0,460	3,4	
		25	4,480 ± 0,956	10,4	
	Emulsja 3	4	5,155 ± 0,000	0,00*	
		25	4,480 ± 0,956	10,4	
	Żel PAA	4	4,830 ± 0,460	3,4	
		25	4,480 ± 0,956	10,4	
	Żel HEC	4	4,830 ± 0,460	3,4	
		25	4,480 ± 0,956	10,4	
	MeJ	Emulsja 1	4	5,000 ± 0,000	0,00
			25	4,680 ± 0,460	6,40
Emulsja 2		4	4,354 ± 0,000	12,92	
		25	4,354 ± 0,000	12,92	
Emulsja 3		4	5,205 ± 0,283	0,00*	
		25	4,354 ± 0,000	12,92	
Żel PAA		4	4,680 ± 0,460	6,40	
		25	4,354 ± 0,000	12,92	
Żel HEC		4	4,680 ± 0,460	6,40	
		25	4,354 ± 0,000	12,92	
MeDHJ		Emulsja 1	4	5,205 ± 0,425	0,00*
			25	5,005 ± 0,000	0,00*
	Emulsja 2	4	5,005 ± 0,000	0,00*	
		25	4,805 ± 0,283	3,90	
	Emulsja 3	4	5,155 ± 0,212	0,00*	
		25	4,955 ± 0,495	0,90	
	Żel PAA	4	5,155 ± 0,212	0,00*	
		25	5,005 ± 0,000	0,00*	
	Żel HEC	4	5,155 ± 0,212	0,00*	
		25	5,005 ± 0,000	0,00*	



Tabela 21, część II.

BADANY ZWIĄZEK	PREPARAT	TEMPERATURA PRZECHOWYWANIA (°C)	OBLICZONE STĘŻENIE (mg/mL, ± S.D ¹)	ŚREDNIA WARTOŚĆ UBYTKU JASMONIDU (%)
JA-YPPF-NH ₂	Emulsja 1	4	5,205 ± 0,425	0,00*
		25	5,005 ± 0,000	0,00*
	Emulsja 2	4	5,005 ± 0,000	0,00*
		25	4,805 ± 0,283	3,90
	Emulsja 3	4	5,155 ± 0,212	0,00*
		25	4,955 ± 0,495	0,90
	Żel PAA	4	5,005 ± 0,000	0,00*
		25	4,955 ± 0,495	0,90
	Żel HEC	4	5,005 ± 0,000	0,00*
		25	4,955 ± 0,495	0,90
JA-YYKS-NH ₂	Emulsja 1	4	4,955 ± 0,322	0,90
		25	4,940 ± 0,322	1,20
	Emulsja 2	4	4,800 ± 0,088	4,00
		25	4,800 ± 0,088	4,00
	Emulsja 3	4	4,955 ± 0,322	0,90
		25	4,940 ± 0,322	1,20
	Żel PAA	4	5,000 ± 0,00	0,00
		25	4,955 ± 0,322	0,90
	Żel HEC	4	4,964 ± 0,376	0,80
		25	4,955 ± 0,322	0,90

¹S.D. - ang. standard deviation, odchylenie standardowe

W oparciu o wyniki badań przedstawione w tabeli 21 stwierdzono, że wszystkie badane jasmonidy wykazują większą stabilność w preparatach przechowywanych w temperaturze 4°C. Związek MeDHJ wykazał się największą stabilnością spośród badanych jasmonidów, bowiem zaobserwowano jego najniższy ubytek w formułacji po 70 dniach przechowywania w temperaturze 4 oraz 25°C. Stwierdzono również wysoką stabilność koniugatów JA-YPPF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂, ponieważ ich ubytek w formułacji nie przekraczał odpowiednio 3,90 % oraz 4,00 % początkowego stężenia. Stwierdzono również, że najmniej stabilnym jasmonidem spośród badanych związków jest MeJ przechowywany w temperaturze 25°C, bowiem jego ubytek wynosił 12,92 %. Zaobserwowano, że w niektórych przypadkach (m.in. MeDHJ + Emulsja 1, JA-YPPF-NH₂ + Emulsja 1) obliczone stężenie przekracza początkową, teoretyczną zawartość jasmonidu w otrzymanym preparacie (5 mg/mL). Wówczas średnia wartość ubytku jasmonidu została oznaczona jako 0,00%* i jest ona prawdopodobnie wynikiem błędów aparaturowego oraz/lub analitycznego, popełnionego przy odważaniu substancji aktywnej podczas przygotowywania formułacji kosmetycznej, bądź przy przygotowywaniu naważki preparatu, z której wykonywano próbki do analizy HPLC.

PODSUMOWUJĄC, w niniejszej pracy doktorskiej opracowano metodykę oznaczania jasmonidów i ich pochodnych w formułacjach kosmetycznych. Przed rozpoczęciem badań przeprowadzono walidację metody analitycznej. Wyznaczone krzywe regresji liniowej charakteryzowały się wysokimi współczynnikami korelacji, co świadczy o liniowości metody w określonym przedziale stężeń substancji aktywnej. Wyznaczono także czasy retencji badanych związków. Ponadto, zdeterminowano wpływ warunków przechowywania przygotowanych preparatów na stabilność jasmonidów w ich kompozycji. Stwierdzono, że wszystkie badane jasmonidy wykazują większą stabilność w preparatach przechowywanych w temperaturze 4°C. Jest to prawdopodobnie związane z faktem,

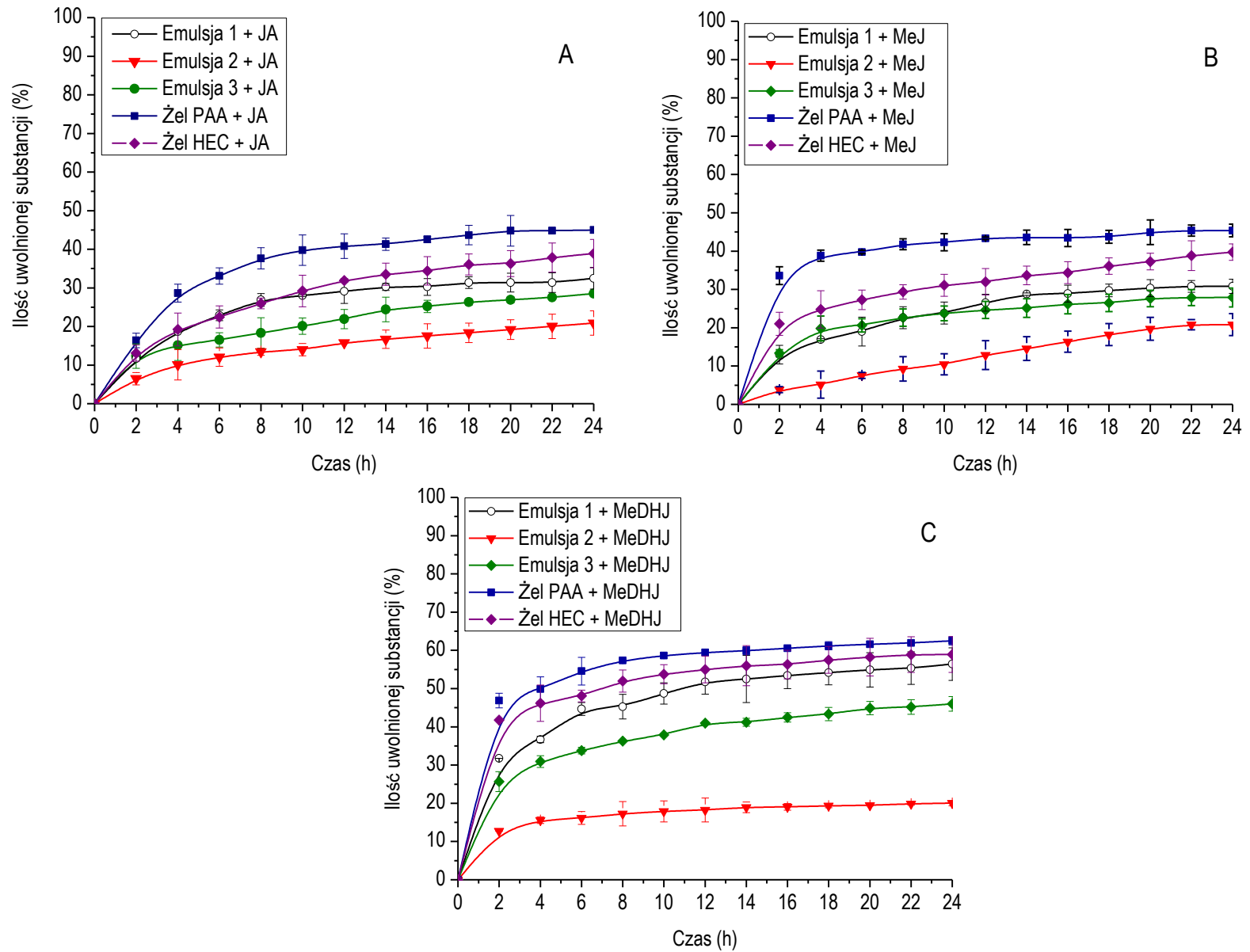


że kwas jasmonowy i jego pochodne zaliczane są do grupy VOCs, które w wyższych temperaturach łatwo przechodzą w postać pary lub gazu. Dzięki takim właściwościom, jasmonidy biorą udział w tzw. „komunikacji” między sąsiadującymi roślinami, co jest nieodzownym elementem ich obrony na atak patogenów i innych czynników stresowych [402]. W związku z powyższym, im niższa temperatura przechowywania, tym lepsza stabilność preparatów zawierających jasmonidy. Ponadto, producenci wzorców kwasu jasmonowego i jego pochodnych zalecają przechowywanie produktów w niskich temperaturach w celu przedłużenia okresu ich trwałości i stabilności [403].

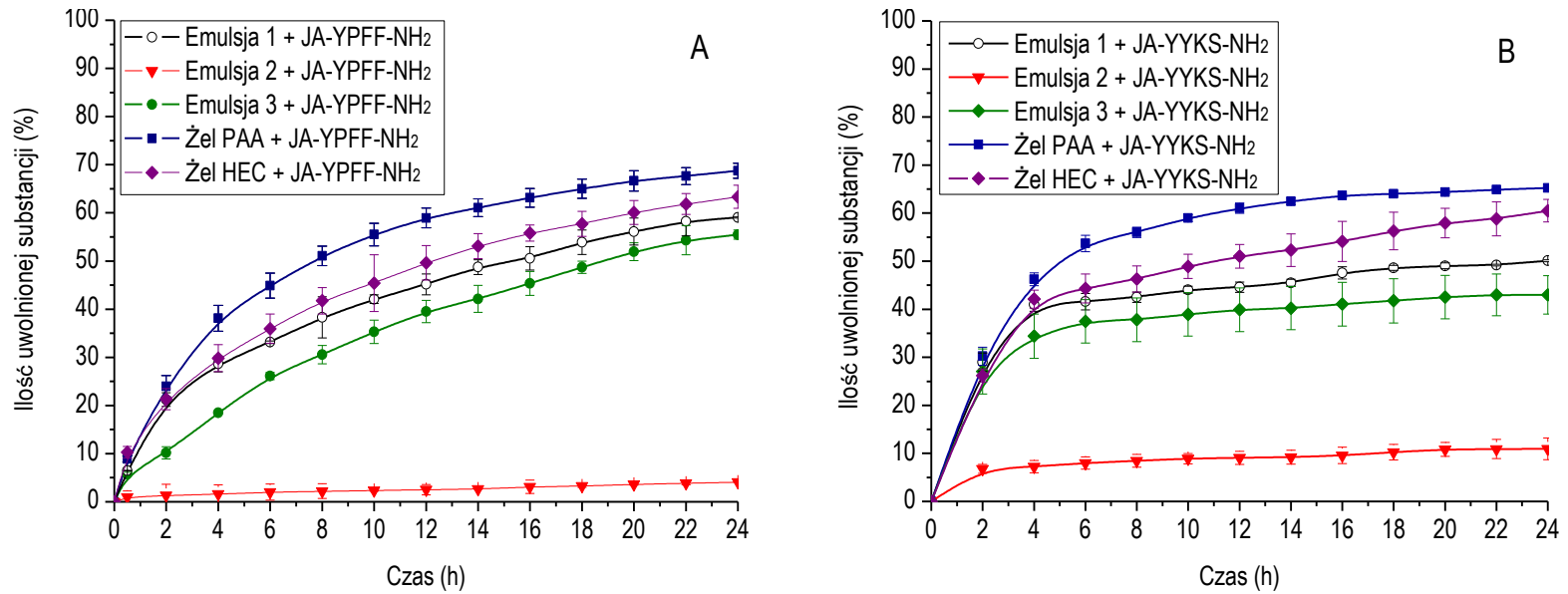
20.9. Badanie przenikania substancji aktywnych przez bariery imitujące skórę *in vitro*

Ilość substancji aktywnej, jaka uwalnia się z podłoża kosmetycznego, ma znaczący wpływ na skuteczność jej działania. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badania *in vitro*, przeprowadzonego w celu oceny teoretycznej ilości jasmonidów i ich pochodnych uwalnianych z przygotowanych preparatów kosmetycznych wskutek dyfuzji przez semiprzepuszczalne membrany imitujące bariery skórne. W pracy zbadano również wpływ poszczególnych czynników (lepkości formacji oraz modyfikacji cząsteczki) na stopień przenikania substancji aktywnych przez membrany imitujące skórę *in vitro*.

W wyniku uwalniania cząsteczek substancji aktywnej z podłoża, następuje zmiana jej stężenia w roztworze akceptorowym. W związku z powyższym, ilość uwolnionej substancji jest obliczana w oparciu o pomiar zmian absorbancji w czasie zgodnie z prawem Lamberta-Beera. Pomiar ten prowadzony jest przy analitycznej długości fali badanego związku. Wyniki badań kinetyki uwalniania substancji aktywnych *in vitro* przedstawiane są w postaci profilu uwalniania mającego charakter krzywej zależności % uwalniania substancji aktywnej od czasu. Dostępność substancji aktywnej jest mierzona w warunkach laboratoryjnych i określa ilość tejże substancji, jaka uwalnia się z preparatu i przechodzi przez membranę do płynu akceptorowego. Każdy pomiar powtarzano trzykrotnie, a następnie obliczono wartość średnią oraz odchylenie standardowe. Na rys. 72 - 73 przedstawiono profile uwalniania jasmonidów i ich pochodnych z przygotowanych formacji kosmetycznych.



Rys. 72. Profile uwalniania JA (A), MeJ (B) oraz MeDHJ (C) z przygotowanych formułacji kosmetycznych.



Rys. 73. Profile uwalniania JA- YPFF-NH₂ (A) oraz JA- YYKS-NH₂ (B) z przygotowanych formułacji kosmetycznych.

20.9.1. Wpływ lepkości na ilość uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych z przygotowanych formułacji

W oparciu o przedstawione profile uwalniania stwierdzono, że bez względu na badaną substancję aktywną, największa ilość jasmonidów jest uwalniana z żelu PAA. Wartości te dla JA, MeJ oraz MeDHJ wynoszą odpowiednio 44,99, 45,37 oraz 62,50 % (rys. 72). Podobne obserwacje odnotowano w przypadku koniugatów JA-YPFF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂, których dyfuzja transmembranowa z żelu PAA do roztworu akceptorowego zachodziła odpowiednio w 68,75 % oraz 65,28 % (rys. 73). W przypadku żelu HEC ilość uwolnionych jasmonidów jest niższa, niż w przypadku żelu PAA, bowiem dla JA, MeJ oraz MeDHJ wynosi odpowiednio 38,87 %, 39,74 % oraz 58,91 %. Analogiczne spostrzeżenia otrzymano dla badanych koniugatów, których cząsteczki dyfundowały z żelu HEC do medium w 63,34 % (JA-YPFF-NH₂) oraz 60,51 % (JA-YYKS-NH₂). Analizując wyniki uwalniania jasmonidów z Emulsji 1 stwierdzono, że ilość uwolnionych substancji aktywnych jest mniejsza, niż w przypadku żelu PAA oraz HEC i wynosi 32,48 % dla JA, 30,82 % dla MeJ, 56,42% dla MeDHJ, 59,06% dla JA-YPFF-NH₂ oraz 50,09% dla JA-YYKS-NH₂. Odnotowano również, że w porównaniu z wynikami otrzymanymi dla Emulsji 1, dyfuzja cząsteczek badanych substancji z Emulsji 3 zachodzi w mniejszym stopniu i dla JA, MeJ, MeDHJ wynosi odpowiednio 28,50, 27,91 oraz 46,02 %. Podobne obserwacje otrzymano dla badanych koniugatów, dla których ilość uwalniania z Emulsji 3 była równa 55,45 % dla JA-YPFF-NH₂ oraz 42,99 % dla JA-YYKS-NH₂. W przeciwieństwie do żelu na bazie karbomeru kwasu akrylowego, uwalnianie JA, MeJ oraz MeDHJ z Emulsji 2 zachodziło w najmniejszym stopniu, a ilość uwolnionej substancji aktywnej wynosiła odpowiednio 20,89, 20,42 oraz 20,01 %. Analogiczne wnioski otrzymano w oparciu o analizę profili uwalniania badanych koniugatów z Emulsji 2, bowiem ilość JA-YPFF-NH₂ uwalnianego do medium wynosiła 4,09 %, natomiast ilość uwalnianego JA-YYKS-NH₂ wynosiła 10,93 %.

Otrzymane wyniki wskazują na kluczowy wpływ lepkości podłoża na ilość uwalnianej substancji. Uwalnianie badanych jasmonidów zachodzi w największym stopniu z żelu PAA, charakteryzującego się najmniejszą lepkością spośród wszystkich przygotowanych formułacji (zakres 7 100 - 7 700 mPa × s). Nieco mniejsza ilość badanych substancji jest uwalniania z żelu HEC, którego lepkość mieści się w zakresie 8 000 - 8 400 mPa × s. Analizując wyniki uwalniania jasmonidów z Emulsji 1 (zakres lepkości 14 400 - 15 400 mPa × s) stwierdzono, że ilość uwolnionych substancji aktywnych jest mniejsza w porównaniu z żelem PAA, ale większa w porównaniu z Emulsją 3 (zakres lepkości 24 600 - 25 400 mPa × s). Formułacją o największej lepkości jest Emulsja 2 (zakres 106 800 - 107 700 mPa × s), z której badane substancje aktywne dyfundują w najmniejszym stopniu.

20.9.2. Wpływ lepkości na współczynnik dyfuzji kwasu jasmonowego i jego pochodnych z przygotowanych formułacji

W pracy obliczono także współczynnik dyfuzji (D) badanych substancji aktywnych, wykorzystując równanie Einsteina-Smoluchowskiego:

$$D = \frac{kT}{6\pi r \eta} \quad (14),$$

gdzie:

D - współczynnik dyfuzji (m²/s),

T - temperatura w stopniach Kelvina (K),

K - stała Boltzmanna [1,380658E-23 ± 1.2E-28 (J/K),

η - lepkość preparatu (Pa × s),

r - promień dyfundującej cząsteczki (Å).



Promień cząsteczki (r), obecny we wzorze na współczynnik dyfuzji, obliczono wykorzystując równanie (15). Wartości objętości cząsteczek, niezbędne do kalkulacji ich promienia, obliczono z wykorzystaniem programu Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score, Molinspiration Cheminformatics [404].

$$r = \sqrt[3]{\frac{3V}{4\pi}} \quad (15),$$

gdzie:

r - promień dyfundującej cząsteczki (\AA),
 V - objętość dyfundującej cząsteczki (\AA^3).

Wyniki kalkulacji wartości promieni cząsteczek badanych substancji aktywnych przedstawiono w tabeli 22.

Tabela 22. Wartości objętości oraz promieni cząsteczek kwasu jasmonowego i jego pochodnych.

BADANY ZWIĄZEK	V (\AA^3 , \pm S.D. ¹)	r (\AA , \pm S.D. ¹)
JA	209,42 \pm 0,52	3,68 \pm 0,01
MeJ	226,95 \pm 0,57	3,78 \pm 0,01
MeDHJ	233,13 \pm 0,58	3,82 \pm 0,02
JA-YPFF-NH ₂	718,14 \pm 1,79	5,56 \pm 0,01
JA-YYKS-NH ₂	698,05 \pm 1,74	5,50 \pm 0,02

¹S.D. - *ang.* standard deviation, odchylenie standardowe

Zaobserwowano, że największym promieniem cechuje się cząsteczka koniugatu JA-YPFF-NH₂ (5,56 \pm 0,01 \AA), natomiast najmniejszym – cząsteczka kwasu jasmonowego (3,68 \pm 0,01 \AA). W tabeli 23 przedstawiono wartości współczynnika dyfuzji dla otrzymanych formulacji kosmetycznych zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne.

**Tabela 23.** Wartości współczynników dyfuzji dla substancji aktywnych uwalnianych z przygotowanych formułacji.

FORMULACJA	Lepkość (mPa × s, ± S.D.)	D × 10 ⁻¹⁴ (m ² /s)
Emulsja 1+ JA	14 900 ± 400	40,69
Emulsja 2 + JA	107 200 ± 300	5,66
Emulsja 3 + JA	25 100 ± 300	24,25
Żel PAA + JA	7 500 ± 100	80,95
Żel HEC + JA	8 300 ± 100	63,16
Emulsja 1+ MeJ	14 900 ± 400	39,61
Emulsja 2 + MeJ	107 300 ± 400	5,51
Emulsja 3 + MeJ	25 000 ± 400	23,61
Żel PAA + MeJ	7 400 ± 300	78,81
Żel HEC + MeJ	8 200 ± 200	61,49
Emulsja 1+ MeDHJ	14 800 ± 400	39,26
Emulsja 2 + MeDHJ	107 100 ± 400	5,46
Emulsja 3 + MeDHJ	25 000 ± 300	23,40
Żel PAA + MeDHJ	7 400 ± 100	78,11
Żel HEC + MeDHJ	8 100 ± 200	60,94
Emulsja 1+ JA-YPFF-NH ₂	14 900 ± 500	26,99
Emulsja 2 + JA-YPFF-NH ₂	107 300 ± 200	3,75
Emulsja 3 + JA-YPFF-NH ₂	25 100 ± 300	16,08
Żel PAA + JA-YPFF-NH ₂	7 500 ± 200	53,58
Żel HEC + JA-YPFF-NH ₂	8200 ± 300	41,88
Emulsja 1+ JA-YYKS-NH ₂	14 900 ± 500	27,24
Emulsja 2 + JA-YYKS-NH ₂	107 200 ± 300	3,79
Emulsja 3 + JA-YYKS-NH ₂	25 000 ± 400	16,24
Żel PAA + JA-YYKS-NH ₂	7 400 ± 200	54,19
Żel HEC + JA-YYKS-NH ₂	8200 ± 100	42,28

¹S.D. - *ang.* standard deviation, odchylenie standardowe

W oparciu o wyniki kalkulacji przedstawionych w tabeli 23 wykazano ścisłą zależność pomiędzy lepkością podłoża a szybkością dyfuzji cząsteczek substancji aktywnych. Wartość współczynnika D jest odwrotnie proporcjonalna do lepkości, tak więc im większa lepkość badanej formułacji, tym wolniejsza dyfuzja cząsteczek substancji czynnej do medium. Najmniejszą wartość współczynnika dyfuzji jasmonidów zaobserwowano dla Emulsji 2, która cechuje się największą lepkością spośród wszystkich przygotowanych formułacji. W związku z powyższym dyfuzja danej substancji czynnej z Emulsji 2 do medium zachodzi najwolniej. Żel na bazie karbomeru kwasu akrylowego charakteryzuje się największą wartością współczynnika D, co jest związane z jego niewielką lepkością, dzięki czemu stanowi najlepsze podłoże do uwalniania badanych substancji. Przykładowo, wartość współczynnika dyfuzji dla cząsteczki koniugatu JA-YYKS-NH₂ z Emulsji 2 wynosi 3,79 m²/s, natomiast z żelu PAA - 54,19 m²/s. Zależność pomiędzy lepkością a szybkością dyfuzji substancji aktywnej została już opisana w literaturze naukowej m.in. przez Masaro i Zhu [405] oraz Li i in. [406]. Wnioskować zatem można, że lepkość podłoża jest czynnikiem limitującym nie tylko ilość, ale również szybkość dyfuzji substancji aktywnej. Zaobserwowano także zależność pomiędzy promieniem cząsteczki a szybkością jej dyfuzji do medium. W oparciu o wyniki kalkulacji wnioskować można, że im mniejsza cząsteczka, tym szybsza jej dyfuzja przez semiprzuszczalną membranę. Przykładowo, wartość współczynnika D dla cząsteczki JA z żelu PAA wynosi 80,95 × 10⁻¹⁴ m²/s, natomiast dla koniugatu JA-YPFF-NH₂ jest ona równa 53,58 × 10⁻¹⁴ m²/s. Analogiczne obserwacje odnotowano w przypadku pozostałych formułacji. Otrzymane obserwacje prowadzą do wniosków, że szybkość dyfuzji cząsteczek substancji aktywnej z preparatu do medium zależy przede wszystkim od lepkości podłoża oraz wielkości cząsteczki. Należy jednak



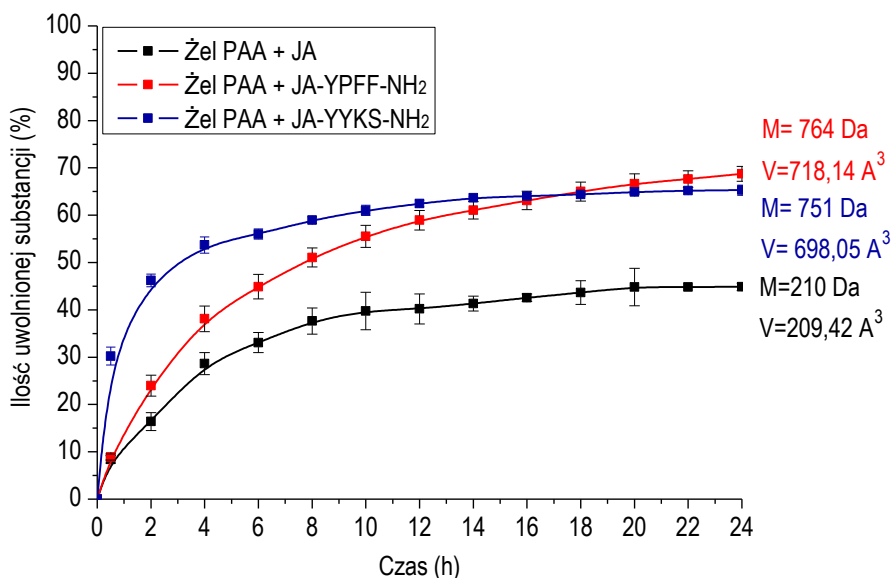
wspomnieć, że kalkulacja wartości współczynnika D ma charakter teoretyczny. Objętość cząsteczki nie jest bowiem mierzona doświadczalnie, jest natomiast wynikiem estymacji z wykorzystaniem programu komputerowego. Obliczona wartość r cząsteczki może być zatem obarczona błędem matematycznym. Ponadto, wzór na współczynnik dyfuzji nie uwzględnia wpływu lipofilowości cząsteczki na ilość jej uwalniania z danego podłoża.

20.9.3. Wpływ lipofilowości cząsteczki kwasu jasmonowego i jego pochodnych na ilość ich uwalniania z przygotowanych formułacji

W nawiązaniu do danych literaturowych, ilość uwalnianej substancji może zależeć także od lipofilowości cząsteczki [407]. W celu lepszej interpretacji wyników obliczono teoretyczny współczynnik podziału oktanol-woda ($\log P$) badanych związków. W tym celu wykorzystano program Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score, Molinspiration Cheminformatics [404]. Zgodnie z deklaracją producenta, błąd statystyczny przekracza wartość 1% jedynie dla 3,5% estymacji parametru $\log P$, natomiast 80,2% analiz jest obciążonych błędem poniżej 0,25%, co może oznaczać wysoką wiarygodność obliczeń uzyskanych za pomocą prezentowanego programu. Wyniki estymacji wskazały, że wartość $\log P$ wszystkich badanych jasmonidów przekraczają wartość jedności. W nawiązaniu do danych literaturowych, związki o wartości $\log P < 1$ mają charakter hydrofilowy, natomiast związki o wartości $\log P > 1$ mają charakter hydrofobowy [408]. W związku z powyższym, wszystkie badane jasmonidy są związkami lipofilowymi, które mogą oddziaływać z fazą tłuszczową Emulsji 2, co może utrudniać ich dyfuzję z podłoża kosmetycznego do medium o charakterze hydrofilowym.

20.9.4. Wpływ grupy modyfikującej kwas jasmonowy na ilość jego uwalniania z przygotowanych formułacji

W pracy zbadano również wpływ grupy modyfikującej kwas jasmonowy na ilość substancji uwalnianej z badanej formułacji. Na rys. 74 przedstawiono porównanie profili uwalniania kwasu jasmonowego oraz koniugatów JA-YPPF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂ z żelu PAA, stanowiącego według przedstawionych powyżej badań najlepsze podłoże do uwalniania substancji aktywnych.



Rys. 74. Wpływ modyfikacji cząsteczki kwasu jasmonowego na ilość jego uwalniania z żelu PAA.

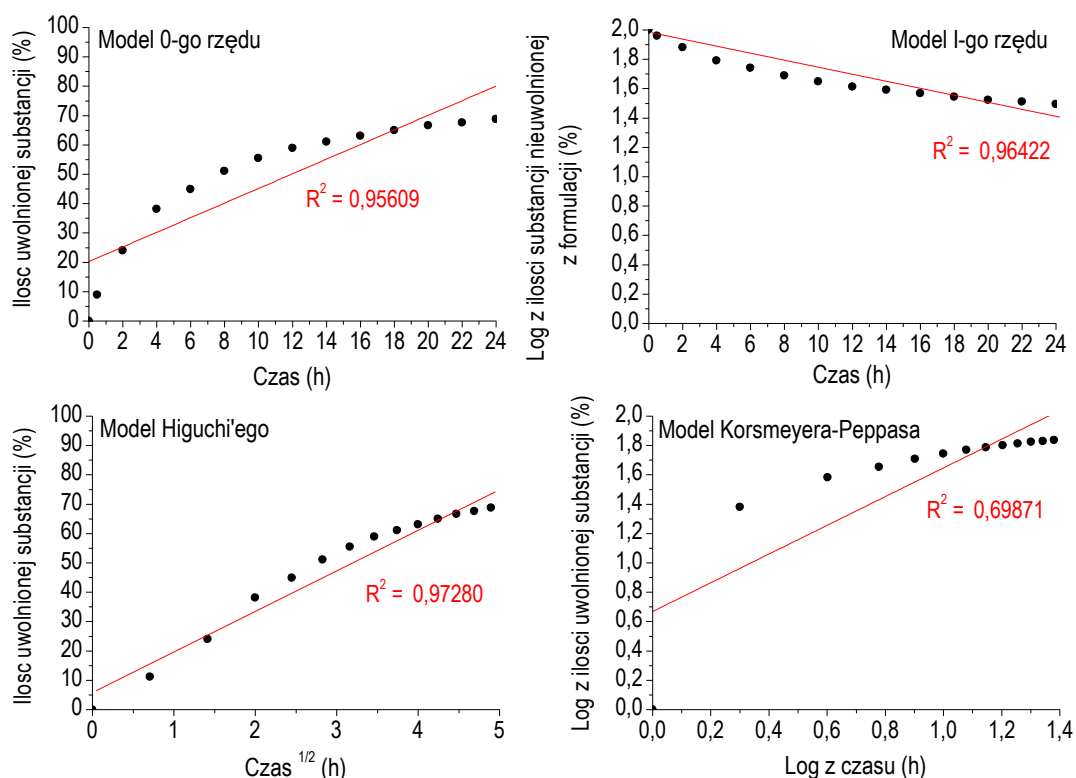
Zaobserwowano, że pomimo zwiększenia objętości cząsteczki substancji aktywnej, modyfikacja cząsteczki JA za pomocą tetrapeptydu YPPF-NH₂ oraz YYKS-NH₂ pozytywnie wpływa na ilość uwalnianej substancji aktywnej. Wzrost ilości substancji aktywnej,

uwalnianej z żelu PAA wskutek modyfikacji cząsteczki kwasu jasmonowego jest prawdopodobnie spowodowany zmianą jej lipilowości. Odwrotny efekt zaobserwowano w przypadku uwalniania JA oraz obu koniugatów z Emulsji 2. Najmniej lipofilowy związek (JA) uwalnia się z Emulsji 2 w 20,89 %, podczas gdy koniugat JA-YPPF-NH₂ - jedynie w 4,09%.

20.9.5. Dopasowanie modelu kinetycznego do profili uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych z przygotowanych formułacji

W niniejszej pracy przedstawiono również ocenę dopasowania wybranych modeli kinetycznych (zerowego rzędu, pierwszego rzędu, Higuchiego oraz Korsmeyera-Peppasa) do uzyskanych danych empirycznych uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych z przygotowanych formułacji. Analiza kinetyki uwalniania substancji aktywnych z podłoża ma kluczowe znaczenie w farmacji oraz przemyśle kosmetycznym. Parametr ten umożliwia ocenę szybkości działania substancji i może być niezwykle pomocny na etapie projektowania oraz modyfikacji formy transportu substancji aktywnej w celu osiągnięcia pożądanego efektu terapeutycznego.

W celu oceny dopasowania modelu kinetycznego sporządzono wykresy zależności zaprezentowanych w tabeli 24, a następnie wyznaczono współczynnik korelacji R² dla uzyskanych profili uwalniania. Na rys. 75 przedstawiono profile uwalniania koniugatu JA-YPPF-NH₂ z żelu PAA reprezentujące zależności charakterystyczne dla wszystkich badanych modeli kinetycznych.



Rys. 75. Profile uwalniania koniugatu JA-YPPF-NH₂ z żelu PAA reprezentujące zależności charakterystyczne dla wszystkich badanych modeli kinetycznych.

Analogiczne profile uwalniania sporządzono również dla pozostałych jasmonidów (JA, MeJ, MeDHJ oraz JA-YYKS-NH₂) uwalnianych ze wszystkich przygotowanych formułacji. Następnie wyznaczono równania profili uwalniania oraz współczynnik korelacji R² (tabela 24) będący jedną z podstawowych miar jakości dopasowania modelu. Dopasowanie modelu jest tym lepsze, im wartość współczynnika R² jest bliższa jedności [409].

**Tabela 24.** Ocena dopasowania równania profilu uwalniania do wybranych modeli kinetycznych w oparciu o wartość współczynnika korelacji R².

BADANA FORMULACJA	MODEL KINETYCZNY ^c						CAŁKOWITA ILOŚĆ SUBSTANCJI UWOLNIONEJ Z FORMULACJI (%)
	0-GO RZĘDU	1-GO RZĘDU	HIGUCHIEGO		KORSMEYERA-PEPPASA		
	R ²	R ²	R ²	K _H (h ^{-1/2})	R ²	<i>n</i>	
Emulsja 1 + JA	0,95815	0,97259	0,98400	9,12404	0,98419	0,85	32,48
Emulsja 2 + JA	0,94702	0,95557	0,98986	4,95542	0,99090	0,34	20,89
Emulsja 3 + JA	0,76656	0,78313	0,97415	7,77269	0,98867	0,58	28,50
Żel PAA + JA	0,95470	0,96747	0,97905	13,81698	0,98603	1,51	44,99
Żel HEC + JA	0,91592	0,97634	0,99841	11,55069	0,99921	1,23	38,87
Emulsja 1 + MeJ	0,92306	0,94301	0,99722	9,83238	0,69471	-	30,82
Emulsja 2 + MeJ	0,85291	0,85854	0,99682	2,60252	0,50000	-	20,42
Emulsja 3 + MeJ	0,82871	0,84861	0,99226	8,59553	0,64059	-	27,91
Żel PAA + MeJ	0,69805	0,74245	0,94648	20,21224	0,55927	-	45,37
Żel HEC + MeJ	0,95235	0,82157	0,9873	16,73938	0,73897	-	39,74
Emulsja 1 + MeDHJ	0,69867	0,7398	0,94676	19,10605	0,56040	-	56,42
Emulsja 2 + MeDHJ	0,76070	0,79913	0,97206	15,94979	0,57322	-	20,01
Emulsja 3 + MeDHJ	0,74684	0,78392	0,96690	16,04966	0,60650	-	46,02
Żel PAA + MeDHJ	0,58092	0,64531	0,98632	36,91254	0,51967	-	62,50
Żel HEC + MeDHJ	0,78304	0,72257	0,97971	30,92274	0,5997	-	58,91
Emulsja 1 + JA-YPFF-NH ₂	0,85634	0,95628	0,96713	11,1715	0,63291	-	59,06
Emulsja 2 + JA-YPFF-NH ₂	0,78256	0,98853	0,99489	0,775	0,87876	-	4,09
Emulsja 3 + JA-YPFF-NH ₂	0,95570	0,89207	0,99363	8,864	0,79281	-	55,48
Żel PAA + JA-YPFF-NH ₂	0,95609	0,96422	0,97280	19,207	0,69871	-	68,75
Żel HEC + JA-YPFF-NH ₂	0,95784	0,81445	0,98419	15,008	0,71811	-	63,34
Emulsja 1 + JA-YYKS-NH ₂	0,89106	0,94188	1,00000	20,47405	0,63829	-	50,09
Emulsja 2 + JA-YYKS-NH ₂	0,94451	0,95267	0,99093	11,35177	0,70403	-	10,93
Emulsja 3 + JA-YYKS-NH ₂	0,80255	0,96498	0,98562	17,55727	0,60125	-	42,99
Żel PAA + JA-YYKS-NH ₂	0,96583	0,84794	0,97859	24,83203	0,69693	-	65,28
Żel HEC + JA-YYKS-NH ₂	0,79636	0,87675	0,98383	22,91877	0,59970	-	60,51

^c K_H - stała szybkości procesu uwalniania zgodnie z modelem Higuchiego, *n* - wykładnik dyfuzyjny, R² - współczynnik korelacji.

W oparciu o analizę wartości parametru R^2 obliczonego dla profili uwalniania badanych jasmonidów z przygotowanych formułacji stwierdzono, że uwalnianie kwasu jasmonowego zachodzi zgodnie z modelem Korsmeyera-Peppasa. Wysokie dopasowanie danych empirycznych do modelu kinetycznego umożliwia ocenę mechanizmu dyfuzji cząsteczek JA przez semiprzepuszczalną membranę w oparciu o analizę wykładnika dyfuzyjnego n . Wartość wykładnika dyfuzyjnego wyznaczana jest z nachylenia krzywej i jest równa współczynnikowi kierunkowemu w równaniu opisującym profil uwalniania zgodnie z modelem Korsmeyera-Peppasa (paragraf 8.2). Dla $n < 0,5$ kinetyka uwalniania substancji aktywnej zachodzi na drodze dyfuzji Ficka, podczas gdy dla $0,5 < n < 1$ ma ona charakter anomalny (*ang.* anomalous transport). W przypadku, gdy $n = 1$, mechanizm transportu uwalniania zmierza do zerowego rzędu (tzw. „przypadek II”), natomiast dla $n > 1$ określane jest jako transport super zerowego rzędu [410]. W związku z powyższym stwierdzono, że uwalnianie JA z Emulsji 2 zachodzi na drodze dyfuzji Ficka, w przypadku Emulsji 1 oraz 3 ma ono charakter anomalny, natomiast w przypadku żelu PAA oraz HEC, uwalnianie kwasu jasmonowego ma charakter transportu super zerowego rzędu. Zauważyć można również, że im mniejsza lepkość formułacji (Emulsja 2 > Emulsja 3 > Emulsja 1 > Żel HEC > Żel PAA), tym mniejsza zgodność uwalniania kwasu jasmonowego z mechanizmem dyfuzji wg. Ficka. Ze względu na słabe dopasowanie profili uwalniania pozostałych jasmonidów do modelu Korsmeyera-Peppasa, wiarygodne wartości ich wykładników dyfuzyjnych nie zostały zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej.

W oparciu o wyniki przedstawione w tabeli 24 stwierdzono, że uwalnianie MeJ, MeDHJ, JA-YFFF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂ ze wszystkich przygotowanych formułacji zachodzi zgodnie z modelem Higuchiego ze względu na najwyższy współczynnik korelacji R^2 w porównaniu z pozostałymi modelami kinetycznymi. Zgodność profilu uwalniania z modelem Higuchiego umożliwia kalkulację tzw. „stałej Higuchiego” (K_H), charakteryzującej szybkość uwalniania substancji aktywnej z badanych formułacji. Pomimo najlepszego dopasowania profili uwalniania JA do modelu Korsmeyera-Peppasa, wartości współczynnika R^2 dla modelu Higuchiego były również zadowalające ($>0,97900$). W związku z powyższym, w pracy przedstawiono wyniki kalkulacji parametru K_H dla wszystkich badanych jasmonidów i ich pochodnych. Niezależnie od rodzaju badanej substancji, najniższe wartości stałej Higuchiego zaobserwowano dla Emulsji 2 (formułacja o największej lepkości), natomiast najwyższe - dla Żelu PAA (formułacja o najmniejszej lepkości). Zależność pomiędzy lepkością a stałą szybkości uwalniania substancji aktywnej została już opisana w literaturze naukowej m.in. przez Malzfeldta [411], Babara i in. [412] oraz Welina-Bergera i in [413].

Odnotowano także różnice pomiędzy obliczonymi wartościami współczynnika dyfuzji D (m²/s), a wartościami stałej Higuchiego K_H (h^{-1/2}), wyznaczonymi w oparciu o profile uwalniania substancji aktywnych z przygotowanych formułacji. Jak już wspomniano, wartość współczynnika D jest ściśle związana z rozmiarem dyfundującej cząsteczki - im mniejsza cząsteczka, tym szybsza jej dyfuzja przez pory membrany. W związku z powyższym stwierdzić można, że podczas kalkulacji parametru D , rozmiar cząsteczki należy uznać za czynnik limitujący uwalnianie substancji do medium. Teoria ta jest prawidłowa w przypadku, gdy rozmiary cząstek dyfundującej substancji są zbliżone do rozmiarów porów membrany [414]. Jak już wcześniej wspomniano (paragraf 8.1.1), wartość parametru MWCO membrany Cuprophan, wykorzystywanej w badaniach uwalniania jasmonidów z przygotowanych formułacji, wynosi 7-17 kDa. Rozmiar cząsteczki badanych substancji mieści się natomiast w zakresie 210 - 751 Da, w związku z czym nie jest on czynnikiem limitującym uwalnianie badanych substancji aktywnych. Stwierdzono więc, że wartości stałej Higuchiego stanowią dokładniejsze odzwierciedlenie stałej szybkości uwalniania substancji, bowiem zostały wyznaczone w oparciu o dane empiryczne, przedstawione w postaci profili uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych z badanych formułacji. Należy także podkreślić, że zarówno wartość współczynnika D , jak



i stałej K_H odzwierciedlają szybkość dyfuzji cząsteczek substancji aktywnej, a nie całkowitą ilość tejże substancji, jaka jest uwalniania z podłoża do medium. Wnioskować zatem można, że lepkość podłoża jest czynnikiem limitującym nie tylko ilość, ale również szybkość uwalniania substancji aktywnej.

PODSUMOWUJĄC, przeprowadzone badania uwalniania *in vitro* jasmonidów i ich pochodnych z przygotowanych formułacji, jak również kalkulacje teoretyczne wykazały, że dobór właściwego podłoża warunkuje ich dostępność oraz skuteczność działania. Zaobserwowano ścisłą zależność pomiędzy lepkością podłoża a ilością uwolnionej substancji aktywnej. Najlepsze podłoże do uwalniania jasmonidów stanowi hydrofilowy żel PAA, charakteryzujący się niewielką lepkością, natomiast najgorsze podłoże stanowi Emulsja 2 typu w/o, charakteryzująca się największą lepkością spośród wszystkich przygotowanych formułacji. Zaobserwowano także, że podłoża o niskiej lepkości warunkują szybsze uwalnianie jasmonidów i ich pochodnych do medium w porównaniu z preparatami o większej lepkości. Ponadto, badania wykazały, że poprzez modyfikacje kwasu jasmonowego za pomocą wybranych tetrapeptydów zmienia się lipofilowość JA. W konsekwencji zwiększa się ilość uwolnionej substancji aktywnej z przygotowanych hydrożeli (PAA oraz HEC) w porównaniu z kwasem jasmonowym. W oparciu o wyniki obliczeń teoretycznych stwierdzono, że wszystkie profile uwalniania JA z badanych preparatów są najbardziej zgodne z modelem Korsmeyera-Peppasa, natomiast profile uwalniania pozostałych jasmonidów i ich pochodnych są zgodne z modelem kinetycznym Higuchiego. Dobre dopasowanie danych empirycznych umożliwiło obliczenie stałej Higuchiego, stanowiącej teoretyczny wyznacznik stałej szybkości uwalniania jasmonidów i ich pochodnych z przygotowanych formułacji.

20.10. Badanie *in vivo* efektywności działania przygotowanych formułacji zawierających pochodne kwasu jasmonowego

W niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono również badanie *in vivo* efektywności działania przygotowanych formułacji zawierających pochodne kwasu jasmonowego. Spośród przygotowanych preparatów do badań na probantach wybrano żel HEC, dla którego otrzymano zadowalające wyniki badań uwalniania substancji aktywnych *in vitro*. Ze względu na obszar skóry, na którym testowano preparaty (okolica oka), nie wykorzystano do badań żelu PAA, który ze względu na zawartość izopropanolu mógłby powodować wysuszenie skóry probantów. Do badań wybrano zaprojektowane koniugaty (JA-YPFF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂), ponieważ są to nowe substancje, które nie zostały dotychczas przebadane pod kątem potencjalnego działania pielęgnacyjnego.

Przed przystąpieniem do badań *in vivo*, oszacowano potencjalne szkodliwe działanie badanych związków na skórę z wykorzystaniem aplikacji Toxtree [415]. Odnotowano, że zaprojektowane koniugaty nie wykazują działania geno- oraz cytotoksycznego. Ponadto, nie mają one działania drażniącego na skórę.

Tetrapeptyd Ac-YPFF-NH₂ jest dostępny komercyjnie jako składnik preparatu Skinasensyl i jest syntetycznym związkiem, który naśladuje naturalny peptyd opioidowy (jest agonistą receptorów opioidowych) [416]. Związek ten redukuje wydzielanie CGRP, głównego neuromediatora nerwowych włókien czuciowych, odpowiedzialnego między innymi za przekazywanie uczucia bólu [417]. Miejscowa aplikacja Ac-YPFF-NH₂ osłabia stymulację zakończeń nerwowych umiejscowionych w skórze. Skutkuje to obniżeniem wrażliwości skóry podatnej na działanie zewnątrzpochodnych czynników drażniących [418]. Ponadto, wyniki badań przeprowadzonych przez Gillesa [418] dowiodły, że stosowanie preparatu zawierającego Ac-YPFF-NH₂ powoduje wzrost progu tolerancji probantów na wysoką temperaturę (uczucie dyskomfortu i bólu) w porównaniu do emulsji „placebo”. Ponadto, w sekwencji tetrapeptydu Ac-YPFF-NH₂ obecna jest prolina, która wraz z hydroksyproliną oraz



glicyną stanowi podstawową jednostkę budulcową α -kolagenu typu I, najbardziej powszechnego ze wszystkich rodzajów kolagenu występujących w ludzkiej skórze [419]. Na etapie projektowania cząsteczki koniugatu JA-YPFF-NH₂ zakładano, że substancja ta będzie łączyć aktywność biologiczną zarówno kwasu jasmonowego, jak i tetrapeptydu YPFF-NH₂, w związku z czym będzie redukować nadwrażliwość oraz widoczne oznaki starzenia się skóry, jak również poprawiać jej elastyczność [420].

Sekwencja tetrapeptydu wchodzącego w skład cząsteczki koniugatu JA-YYKS-NH₂ została z kolei zaprojektowana w oparciu o skład aminokwasowy α -kolagenu typu I, którego zawartość w skórze oscyluje w granicach 90% oraz α -kolagenu typu III (tzw. kolagenu natywnego), który ma znaczący wpływ na poziom nawilżenia skóry [421,422]. Na 100 jednostek aminokwasowych, łańcuchy α -kolagenu typu I zawierają w swoim składzie 39% L-Ser oraz 31% L-Lys, natomiast łańcuchy α -kolagenu typu III - 39% L-Ser oraz 30% L-Lys [423]. W nawiązaniu do danych literaturowych, pentapeptyd sygnałowy, zawierający sekwencję aminokwasową L-Lys-L-Ser (KTTKS) stanowi fragment prokolagenu typu I i wykazuje aktywność stymulującą syntezę kolagenu-I *in vitro*. Pentapeptyd KTTKS jest dostępny komercyjnie m.in. w preparacie Matrixyl® (Sederma) [424]. Łańcuchy α -kolagenu typu I oraz III zawierają w swoim składzie niewiele (odpowiednio 2 i 3%) tyrozyny. Pomimo tego faktu, wyniki badań przeprowadzonych przez Draelos [425] dowodzą, że heptapeptyd zawierający w swoim składzie sekwencję L-Tys-L-Tyr wykazuje zdolność inhibicji proteiny prokolagenowej C, mającej pośredni wpływ na degradację kolagenu w ludzkiej skórze. W związku z powyższym zakładano, że koniugat JA-YYKS-NH₂ będzie redukował oznaki starzenia się skóry, zwiększał jej elastyczność oraz poziom nawilżenia.

Wyniki przeprowadzonych badań *in vitro* porównywano statystycznie w obrębie każdej grupy:

- I grupa - Preparat 0 (placebo) - żel HEC,
- II grupa - Preparat 1 - żel HEC + JA-YPFF-NH₂,
- III grupa - Preparat 2 - żel HEC + JA-YYKS-NH₂,

jak również pomiędzy grupami: Porównywanie wyników badań w obrębie grupy miało na celu analizę zmian wartości badanego parametru (nawilżenie, elastyczność oraz TEWL) po 1, 2, 3 oraz 4 tygodniach aplikacji tego samego preparatu (preparat placebo, 1 lub 2). Porównywanie wyników badań pomiędzy grupami natomiast miało na celu analizę różnic wartości danego parametru wskutek działania różnych formułacji po 1, 2, 3 oraz 4 tygodniach ich aplikacji

20.10.1. Porównywanie wyników w obrębie grupy

W celu dopasowania odpowiednich testów statystycznych do analizy otrzymanych wyników przeprowadzono test Shapiro-Wilka, służący do określania podobieństwa rozkładu danej zmiennej do rozkładu normalnego. Istotny statystycznie wynik testu Shapiro-Wilka świadczy o braku podobieństwa rozkładu zmiennej obserwowanej do rozkładu normalnego [426]. Stwierdzono, że uzyskane wartości parametru TEWL nie wykazują zgodności z rozkładem normalnym w żadnej grupie, natomiast uzyskane wartości elastyczności i nawilżenia wykazują taką zgodność w obrębie każdej z grup. Zgodność rozkładu danej zmiennej z rozkładem normalnym umożliwia zastosowanie testów parametrycznych, natomiast w przypadku braku podobieństwa rozkładu danej zmiennej do rozkładu normalnego zaleca się stosowanie testów nieparametrycznych. W związku z powyższym, do analizy parametru nawilżenia oraz elastyczności w obrębie danej grupy wykorzystano analizę wariancji ANOVA, podczas gdy do analizy parametru TEWL wykorzystano test Friedmana [369,370,371].

Analizę statystyczną otrzymanych wyników pomiarów nawilżenia oraz elastyczności w obrębie danej grupy rozpoczęto od analizy wariancji ANOVA, mającej na celu sprawdzenie czy zmienne niezależne (stosowany preparat - placebo, preparat 1 oraz preparat 2) mają wpływ na poziom zmiennej zależnej (mierzony parametr - nawilżenie,



elastyczność). Przyjęto poziom istotności statystycznej, który wynosił 0,0001. Następnie obliczono wartość p testu statystycznego, która w przypadku obu parametrów i w obrębie każdej z grup była mniejsza, niż zakładany poziom istotności statystycznej ($p < 0,0001$). Otrzymana wartość p oznacza, że wielkość zmian wartości nawilżenia i elastyczności w obrębie grupy po 1,2,3 oraz 4 tygodniach aplikacji jest statystycznie istotna, tak więc badana zmienna niezależna ma wpływ na zmienną zależną.

Jak już wspomniano, analizę statystyczną otrzymanych wyników pomiarów TEWL w obrębie danej grupy rozpoczęto od przeprowadzenia testu Friedmana, stanowiącego nieparametryczny odpowiednik jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Przyjęty poziom istotności statystycznej wynosił również 0,0001. Kolejnym etapem było obliczenie wartości p testu nieparametrycznego, która w obrębie każdej z grup była mniejsza, niż zakładany poziom istotności statystycznej ($p < 0,0001$). Otrzymana wartość p oznacza, że wielkość zmian wartości parametru TEWL w obrębie grupy po 1,2,3 oraz 4 tygodniach aplikacji jest statystycznie istotna, tak więc badana zmienna niezależna (stosowany preparat) ma wpływ na zmienną zależną (wartość TEWL).

Testy ANOVA oraz Friedmana pozwalają uzyskać ogólną informację na temat występowania różnic statystycznie istotnych (różnica występuje / różnica nie występuje) pomiędzy wynikami w obrębie danej grupy, jednakże bez szczegółowego wskazania, które wyniki różnią się między sobą. W celu wykazania różnic w wynikach badań w poszczególnych tygodniach ich trwania wykonano porównania wielokrotne (testy post-hoc), które stanowią dodatkowe testy dla analizy wariancji. Do analizy nawilżenia i elastyczności wybrano test Tukey'a, natomiast zmiany parametru TEWL analizowano z wykorzystaniem testu wielokrotnych porównań średnich rang dla wszystkich prób (tzw. test Dunna) [372,373,374].

20.10.2. Wpływ żelu HEC (preparat placebo - grupa I) na nawilżenie, elastyczność oraz TEWL

Badanie wpływu preparatu placebo na zmianę nawilżenia, elastyczności oraz TEWL miało na celu wyeliminowanie wpływu podłoża na ocenę aktywności biologicznej badanych koniugatów.

Na rys. 76 przedstawiono wyniki analizy statystycznej zmian parametru nawilżenia (A), elastyczności (B) oraz TEWL (C) w wyniku stosowania żelu HEC, niezawierającego substancji aktywnej (preparat placebo) przez czas 4 tygodni od pierwszego dnia jego aplikacji. Tak zwany „tydzień zero” (T0) oznacza w każdym przypadku pomiar wykonany przed pierwszą aplikacją danego preparatu (tj. przed rozpoczęciem badań) w celu weryfikacji stanu skóry probantów.

Stwierdzono, że nawilżenie skóry wzrosło od średniej wartości 53,00 CU (jednostka korneometru, *ang. corneometer unit*) do wartości 61,50 CU ($\Delta_{T0-T4} = 8,5$ CU). Najbardziej istotne statystycznie różnice w wartościach wyników odnotowano pomiędzy T0 i T2, T3 oraz T4, jak również pomiędzy T1 i T3 oraz T4 ($p < 0,001$). Z kolei, różnice nieistotne statystycznie stwierdzono pomiędzy T2 i T3, jak również pomiędzy T3 i T4 ($p > 0,05$). Stwierdzić można zatem, że preparat placebo nieznacznie zwiększa nawilżenie skóry, które po upływie 2 tygodni jego aplikacji osiąga poziom 57,63 CU, a następnie wzrasta w nieznaczny sposób do momentu zakończenia badań (rys. 76 A).

Przeprowadzono także analizę wpływu stosowania żelu HEC na elastyczność skóry (rys. 76 B). Stwierdzono, że preparat ten ma niewielki wpływ na poprawę elastyczności skóry, bowiem wartość średnia z uzyskanych wyników wzrosła z 0,66 j.u. (T0) do wartości 0,75 j.u. (T4). W wyniku zastosowania testu Tukey'a otrzymano najbardziej istotne statystycznie różnice pomiędzy T0 i T2, T3 oraz T4, T1 i T3 oraz T4, a także T2 i T4 ($p < 0,001$). Różnice nieistotne statystycznie odnotowano pomiędzy T0 i T1, jak również pomiędzy T2 i T3 ($p > 0,05$). Stwierdzono zatem, że preparat placebo nieznacznie

($\Delta_{T0-T4} = 0,09$ j.u.) zwiększa elastyczność skóry, która wzrasta w sposób istotny statystycznie po upływie 1 tygodnia aplikacji (0,71 j.u.). Stwierdzono jednak, że po upływie 2 tygodnia aplikacji preparatu, wzrost wartości elastyczności skóry postępuje w nieznacznym stopniu do momentu zakończenia badań.

Na rys 76 C przedstawiono wyniki analizy statystycznej wpływu aplikacji żelu HEC na średnią wartość parametru TEWL. Stwierdzono, że aplikacja preparatu placebo powoduje nieznaczny wzrost TEWL z 18,21 g/m² h (T0) do 21,94 g/m² h (T4). W oparciu o wyniki testu Dunna, najbardziej istotne statystycznie różnice w wartościach TEWL odnotowano pomiędzy T0 i T2, T3 oraz T4, T2 i T4, jak również pomiędzy T1 i T3 oraz T4 ($p < 0,001$). Różnice nieistotne statystycznie stwierdzono pomiędzy T0 i T1, T1 i T2, T2 i T3, oraz T3 i T4 ($p > 0,05$). Stwierdzono zatem, że preparat placebo nieznacznie zwiększa transepidermalną utratę wody, która po upływie 2 tygodni jego aplikacji wynosi 20,32 g/m² h i różni się w sposób istotnie statystyczny od średniej wartości wyników otrzymanych przed rozpoczęciem badań (T0). Występowanie różnic nieistotnych statystycznie pomiędzy T2 i T3, oraz T3 i T4 oznacza, że po upływie 2 tygodni aplikacji, wzrost wartości TEWL postępuje w nieznacznym stopniu do momentu zakończenia badań.

20.10.3. Wpływ żelu HEC + JA-YPFF-NH₂ (preparat 1 - grupa II) na nawilżenie, elastyczność oraz TEWL

W niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono analizę statystyczną wpływu stosowania żelu HEC + JA-YPFF-NH₂ na nawilżenie skóry (rys. 77 A). Stwierdzono, że nawilżenie skóry wzrosło od średniej wartości 53,00 CU do wartości 67,19 CU ($\Delta_{T0-T4} = 14,9$ CU). Najbardziej istotne statystycznie różnice w wartościach wyników odnotowano pomiędzy T0 i T2, T3 oraz T4, T2 i T4, jak również pomiędzy T1 i T3 oraz T4 ($p < 0,001$). Różnice na poziomie istotności statystycznej $p < 0,01$ stwierdzono pomiędzy T0 i T1, T1 i T2 oraz T2 i T3. Brak różnic nieistotnych statystycznie oznacza, że aplikacja preparatu 1 powodowała stopniowy wzrost nawilżenia skóry od T0 do T4.

Na rys. 77 B przedstawiono wyniki analizy statystycznej wpływu aplikacji preparatu 1 na średnią wartość elastyczności skóry. Stwierdzono, że aplikacja żelu HEC z dodatkiem JA-YPFF-NH₂ powoduje wzrost odporności skóry na odkształcenie (elastyczności) z 0,66 j.u. (T0) do 0,87 j.u. (T4), co stanowi różnicę wielkości 0,21 j.u. W oparciu o wyniki testu Tukey'a, najbardziej istotne statystycznie różnice w wartościach średnich elastyczności odnotowano pomiędzy T0 i T1, T2, T3 oraz T4, pomiędzy T1 i T2, T3 oraz T4, jak również pomiędzy T2 i T4 oraz T3 i T4 ($p < 0,001$). Jedynie różnica pomiędzy T2 i T3 kształtuje się na niższym poziomie istotności statystycznej ($p < 0,05$). Ten fakt, jak również brak różnic nieistotnych statystycznie oznacza, że aplikacja żelu HEC z dodatkiem JA-YPFF-NH₂ powodowała znaczący i systematyczny wzrost elastyczności skóry, postępujący od T0 do momentu zakończenia badań.

W niniejszej pracy przedstawiono także wyniki analizy statystycznej wpływu aplikacji preparatu 1 na średnią wartość parametru TEWL (rys. 77 C). Odnotowano, że aplikacja HEC z dodatkiem JA-YPFF-NH₂ powoduje nieznaczny wzrost TEWL ($\Delta_{T0-T4} = 3,63$ g/m² h) z 18,21 g/m² h (T0) do 21,84 g/m² h (T4). Test Dunna wykazał, że najbardziej istotne statystycznie różnice w wartościach TEWL występują pomiędzy T0 i T2, T3 oraz T4, T1 i T3 oraz T4, jak również pomiędzy T2 i T4 ($p < 0,001$). Różnice nieistotne statystycznie odnotowano natomiast pomiędzy T0 i T1, T1 i T2, T2 i T3, oraz T3 i T4 ($p > 0,05$). Stwierdzono zatem, że transepidermalna utrata wody nieznacznie wzrosła wskutek stosowania preparatu 1. Po upływie dwóch tygodni aplikacji, średnia wartość parametru TEWL wyniosła 19,94 g/m² h i różniła się w sposób istotnie statystyczny od średniej wartości wyników otrzymanych przed rozpoczęciem badań (T0). Występowanie różnic nieistotnych statystycznie pomiędzy T0 i T1, T1 i T2, T2 i T3, oraz T3 i T4 oznacza,



że wzrost wartości TEWL postępował w nieznacznym stopniu do momentu zakończenia badań.

20.10.4. Wpływ żelu HEC + JA-YYKS-NH₂ (preparat 2 - grupa III) na nawilżenie, elastyczność oraz TEWL

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono również analizę statystyczną wpływu stosowania żelu HEC z dodatkiem koniugatu JA-YYKS-NH₂ na nawilżenie skóry. Odnotowano wzrost nawilżenia skóry od średniej wartości 53,00 CU (T₀) do 70,59 CU (T₄), co daje różnicę 17,59 CU (rys. 78A). W oparciu o wyniki testu Tukey'a, najbardziej istotne statystycznie różnice w wartościach średnich nawilżenia odnotowano pomiędzy T₀ i T₁, T₂, T₃ oraz T₄, pomiędzy T₁ i T₂, T₃ oraz T₄, jak również pomiędzy T₂ i T₄ ($p < 0,001$). Jedynie różnica pomiędzy T₃ i T₄ kształtuje się na niższym poziomie istotności statystycznej ($p < 0,05$), co oznacza, że aplikacja żelu HEC z dodatkiem JA-YYKS-NH₂ powodowała znaczący i systematyczny wzrost nawilżenia skóry T₀ do T₃, oraz mniej znaczący wzrost od T₃ do T₄. W analizie wpływu aplikacji preparatu 2 na poziom nawilżenia skóry nie odnotowano różnic nieistotnych statystycznie.

Na rys. 78 B przedstawiono wyniki analizy statystycznej wpływu aplikacji żelu HEC z dodatkiem JA-YYKS-NH₂ na średnią wartość elastyczności skóry. Stwierdzono, że aplikacja preparatu 2 powoduje wzrost odporności skóry na odkształcenie (elastyczności) z 0,66 j.u. (T₀) do 0,81 j.u. (T₄), co stanowi różnicę wielkości 0,15 j.u. Najbardziej istotne statystycznie różnice w wartościach średnich elastyczności odnotowano pomiędzy T₀ i T₁, T₂, T₃ oraz T₄, pomiędzy T₁ i T₃ oraz T₄, a także pomiędzy T₂ i T₄ ($p < 0,001$). Z kolei, różnice nieistotne statystycznie stwierdzono pomiędzy T₂ i T₃, jak również pomiędzy T₃ i T₄ ($p > 0,05$). Stwierdzono zatem, że aplikacja preparatu 2 powoduje istotny statystycznie wzrost elastyczności do drugiego tygodnia badań (0,76 j.u.). Po upływie tego czasu wzrost elastyczności postępuje w niewielkim stopniu do momentu zakończenia badań.

Na rys. 78 C przedstawiono z kolei wyniki analizy statystycznej wpływu aplikacji preparatu 2 na średnią wartość parametru TEWL. Odnotowano nieznaczny wzrost średniej wartości parametru TEWL ($\Delta_{T_0-T_4} = 3,66 \text{ g/m}^2 \text{ h}$) z 18,21 g/m² h (T₀) do 21,87 g/m² h (T₄). Test Dunna wykazał, że najbardziej istotne statystycznie różnice w wartościach TEWL występują pomiędzy T₀ i T₂, T₃ oraz T₄, T₁ i T₃ oraz T₄, jak również pomiędzy T₂ i T₄ ($p < 0,001$). Różnice nieistotne statystycznie odnotowano natomiast pomiędzy T₀ i T₁, T₁ i T₂, T₂ i T₃, oraz T₃ i T₄ ($p > 0,05$). W związku z powyższym stwierdzono, że transepidermalna utrata wody nieznacznie wzrosła wskutek stosowania żelu HEC z dodatkiem JA-YYKS-NH₂. Po upływie dwóch tygodni aplikacji preparatu 2, średnia wartość parametru TEWL wyniosła 19,98 g/m² h i różniła się w sposób istotnie statystyczny od średniej wartości wyników otrzymanych przed rozpoczęciem badań (T₀). Występowanie różnic nieistotnych statystycznie pomiędzy T₀ i T₁, T₁ i T₂, T₂ i T₃, oraz T₃ i T₄ oznacza, że (analogicznie do preparatu placebo oraz 1), wzrost wartości TEWL postępował w nieznacznym stopniu do momentu zakończenia badań.

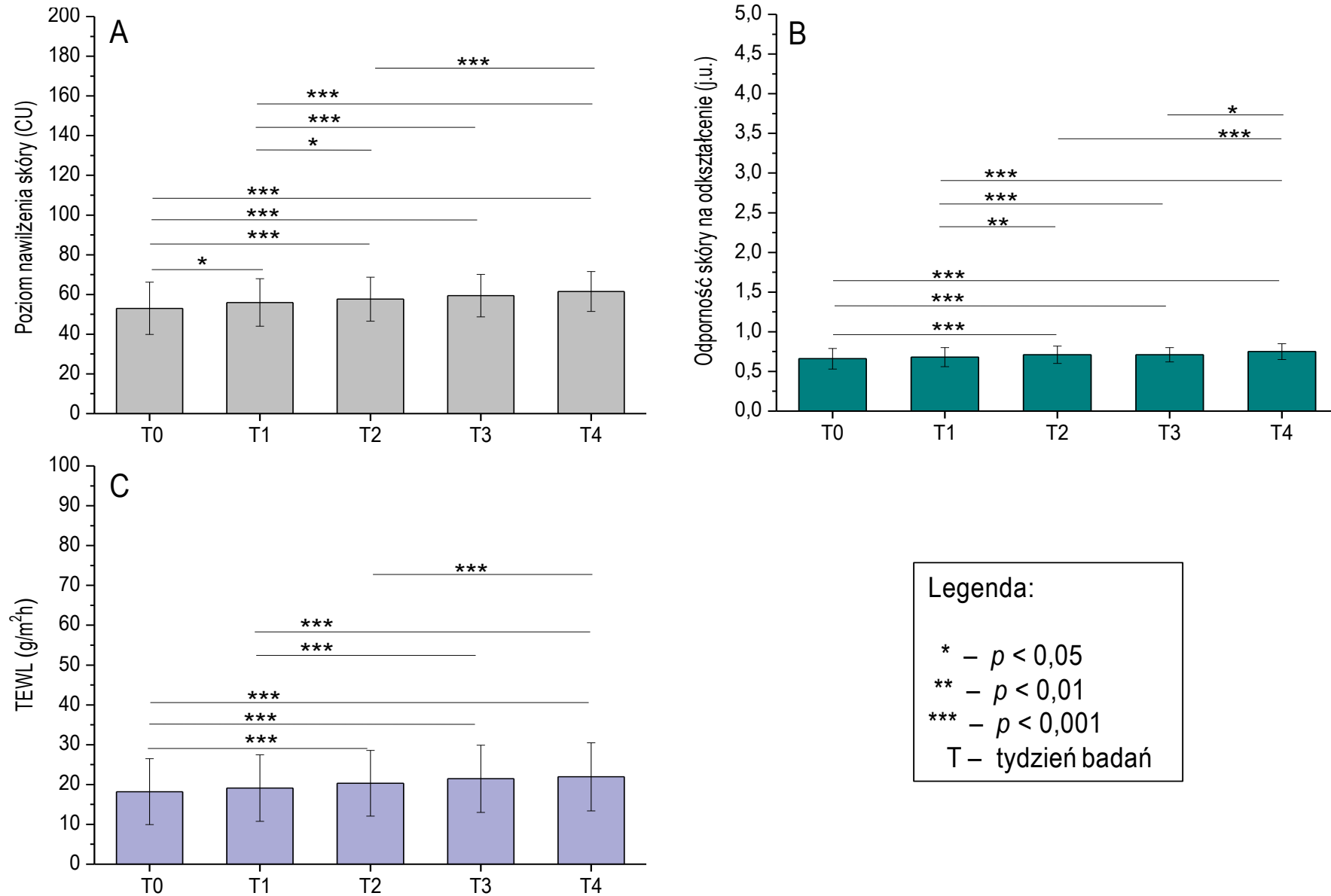
Tabela 25. Zestawienie różnic średnich wartości mierzonych parametrów ($\Delta_{T_0-T_4}$) przed rozpoczęciem badań (T₀) oraz po 4 tygodniach aplikacji (T₄) badanych preparatów.

BADANY PREPARAT	$\Delta_{T_0-T_4}$		
	NAWILŻENIE (CU)	ELASTYCZNOŚĆ (j.u.)	TEWL (g/m ² × h)
Preparat 0 (placebo, żel HEC)	8,5	0,09	3,73
Preparat 1 (żel HEC + JA-YPFF-NH ₂)	14,9	0,21	3,63
Preparat 2 (żel HEC + JA-YYKS-NH ₂)	17,59	0,15	3,66

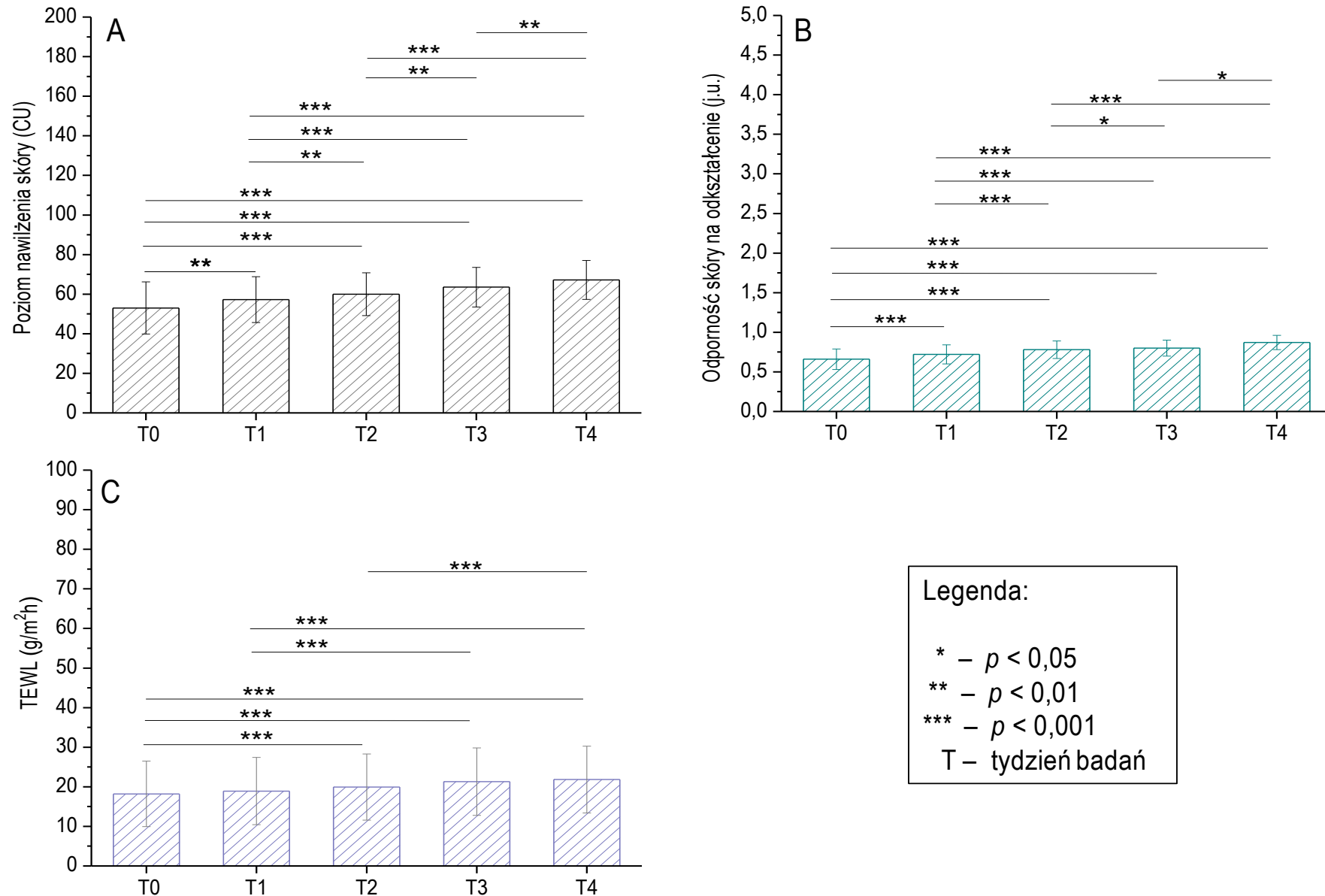


W celu łatwiejszej interpretacji wyników porównań w obrębie każdej z grup, w tabeli 25 zaprezentowano zestawienie różnic średnich wartości mierzonych parametrów ($\Delta_{T_0 - T_4}$) przed rozpoczęciem badań (T_0) oraz po 4 tygodniach aplikacji (T_4) badanych preparatów. Zaobserwowano, że pomimo braku dodatku substancji aktywnej, preparat placebo powoduje nieznaczny wzrost nawilżenia skóry. Jest to prawdopodobnie spowodowane działaniem gliceryny, stanowiącej 10 % w/w kompozycji żelu HEC. Nawilżające działanie gliceryny jest już dobrze znane i zostało przedstawione w wielu publikacjach naukowych [427,428,429]. Stwierdzono również wpływ aplikacji preparatu 1 oraz 2 na wzrost nawilżenia i elastyczności skóry. Wyniki te zostały omówione szczegółowo podczas ich porównywania pomiędzy grupami.

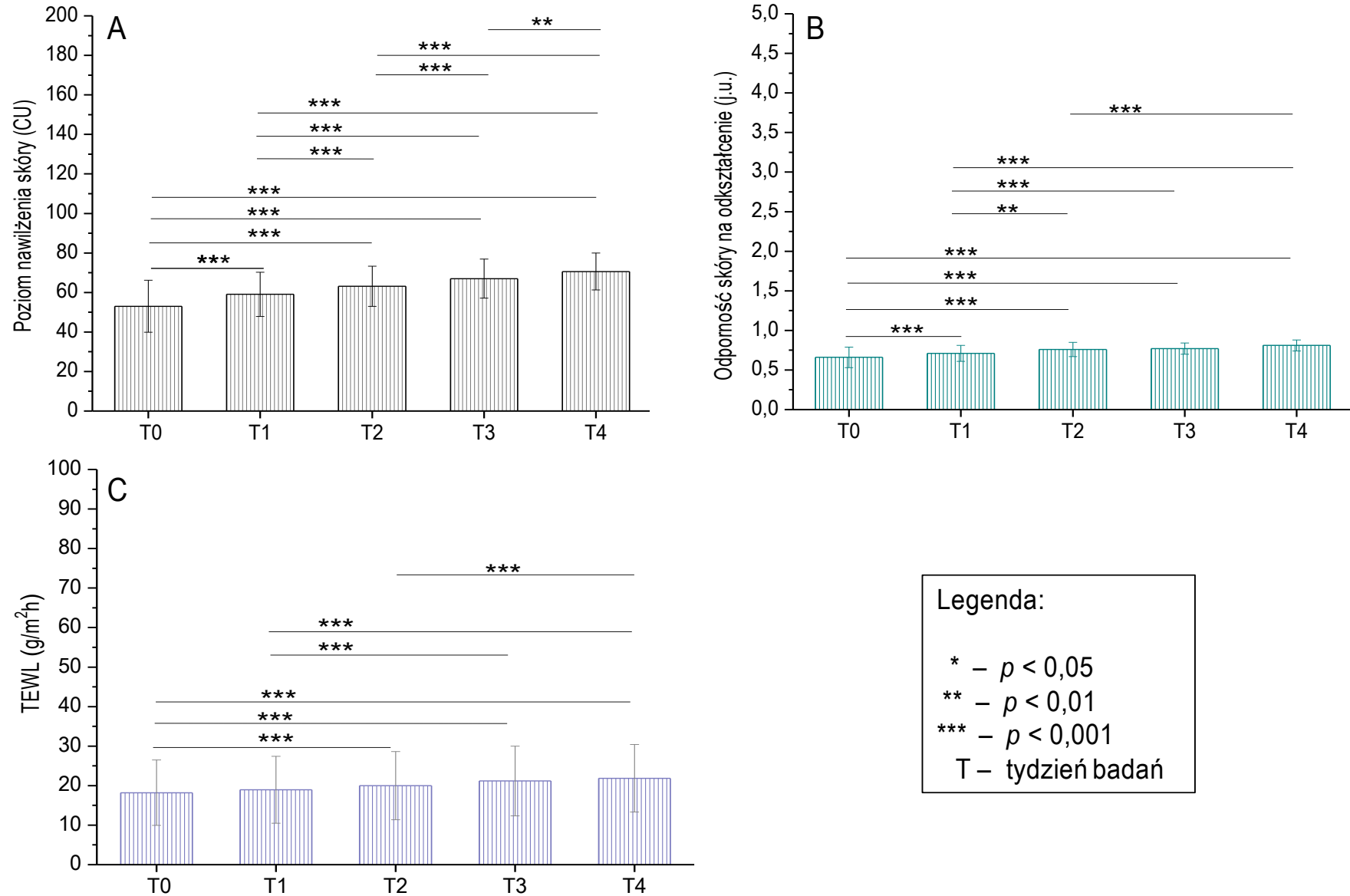
Odnotowano nieznaczny wzrost transepidermalnej utraty wody wskutek stosowania badanych preparatów. Wartość parametru TEWL jest ściśle związana z zawartością lipidów w naskórku. Im słabsza bariera lipidowa skóry, tym łatwiejsza migracja wody ze skóry właściwej do otoczenia [430,431]. Bariera lipidowa skóry może zostać wzmocniona nie tylko poprzez odpowiednią dietę, ale także poprzez stosowanie preparatów pielęgnacyjnych, bogatych w składniki lipidowe [432,433]. Żel HEC nie zawierał w swoim składzie lipidów, co skutkowało nieznacznym osłabieniem bariery lipidowej skóry, a w następstwie - wzmożoną transepidermalną utratą wody. Zmiana wartości parametru TEWL po czterech tygodniach aplikacji preparatów nie była jednak znacząca (3,63 - 3,73 g/m² h).



Rys. 76. Wyniki analizy statystycznej wpływu preparatu placebo na poziom nawilżenia (A), elastyczności (B) oraz parametru TEWL (C).



Rys. 77. Wyniki analizy statystycznej wpływu preparatu 1 na poziom nawilżenia (A), elastyczności (B) oraz parametru TEWL (C).



Rys. 78. Wyniki analizy statystycznej wpływu preparatu 2 na poziom nawilżenia (A), elastyczności (B) oraz parametru TEWL (C).

**20.10.5. Porównywanie wyników pomiędzy grupami**

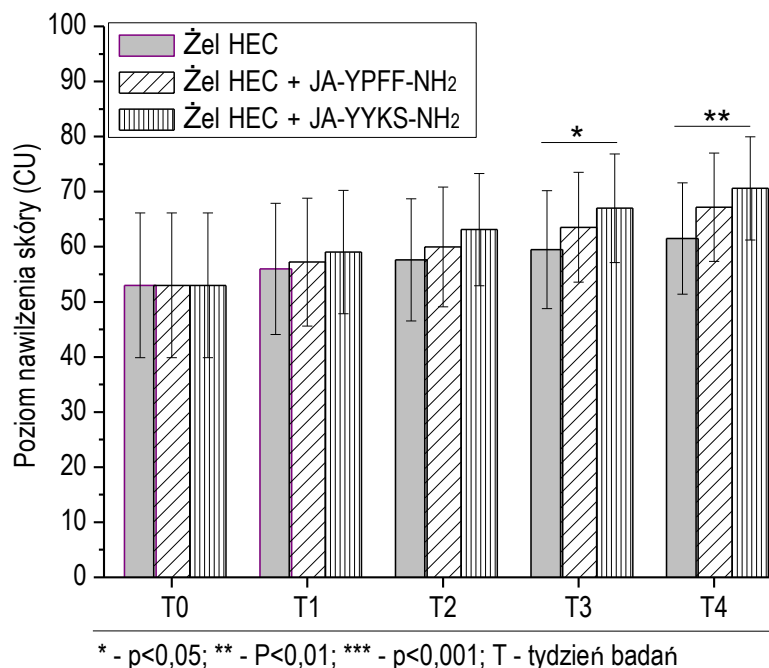
Porównywanie wyników badań pomiędzy grupami miało na celu zestawienie wpływu wszystkich przygotowanych preparatów (preparat placebo, 1 oraz 2) na badany parametr (nawilżenie, elastyczność lub TEWL) po 1, 2, 3 oraz 4 tygodniach ich aplikacji. Podobnie, jak w przypadku porównywania wyników w obrębie grup, analizę statystyczną średnich wyników nawilżenia oraz elastyczności, otrzymanych w różnych grupach rozpoczęto od analizy wariancji ANOVA (test parametryczny), natomiast analizę statystyczną otrzymanych wyników pomiarów TEWL rozpoczęto od przeprowadzenia nieparametrycznego testu Kruskala - Wallisa. Test ten przeprowadza się w przypadku braku spełnienia założeń testu ANOVA.

Tabela 26. Wyniki kalkulacji wartości p testów statystycznych, wykorzystanych do porównania wyników pomiędzy grupami.

BADANY PARAMETR	TYDZIEŃ BADAŃ	TEST STATYSTYCZNY	OBLICZONA p -WARTOŚĆ TESTU
Nawilżenie	T0	ANOVA	1,0000
	T1	ANOVA	0,5989
	T2	ANOVA	0,1446
	T3	ANOVA	0,0256
	T4	ANOVA	0,0021
Elastyczność	T0	ANOVA	0,9994
	T1	ANOVA	0,2982
	T2	ANOVA	0,0251
	T3	ANOVA	0,0009
	T4	ANOVA	0,0001
TEWL	T0	Kruskala - Wallisa	1,0000
	T1	Kruskala - Wallisa	0,9721
	T2	Kruskala - Wallisa	0,8920
	T3	Kruskala - Wallisa	0,8908
	T4	Kruskala - Wallisa	0,9960

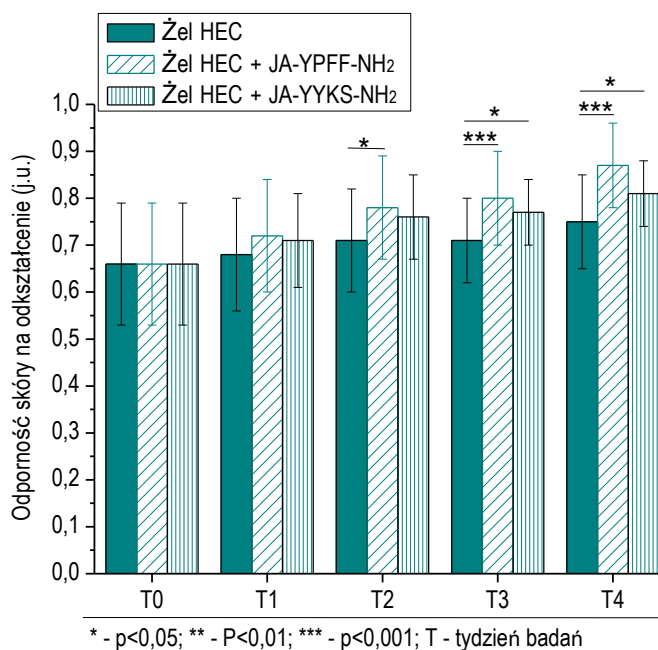
W tabeli 26 przedstawiono obliczone wartości p testów wykorzystanych do porównania grupy 1,2 oraz 3 (statystycznie istotne wartości testu zostały pogrubione). Przy założonym poziomie istotności statystycznej ($p = 0,05$) stwierdzono występowanie różnic pomiędzy grupami w przypadku nawilżenia w T3 ($p = 0,0256 < 0,05$) oraz T4 ($p = 0,0021 < 0,05$), a także w przypadku elastyczności w T3 ($p = 0,0009 < 0,05$) oraz T4 ($p = 0,0001 < 0,05$). Podobnie, jak w przypadku porównywania w obrębie grup, w dalszym toku analizy statystycznej przeprowadzono testy post-hoc, mające na celu określenie, pomiędzy którymi grupami występują wspomniane różnice.

W oparciu o wyniki testu Tukey'a stwierdzono występowanie statystycznie istotnych różnic średniej wartości nawilżenia skóry pomiędzy preparatem placebo, a preparatem 2 po trzech ($p < 0,05$) oraz czterech tygodniach ($p < 0,01$) ich aplikacji. Takich różnic nie odnotowano natomiast w przypadku preparatu 1, oraz preparatu 2 po pierwszym i drugim tygodniu jego aplikacji. Wnioskować można zatem, że preparat 2 wykazuje lepsze działanie nawilżające ($\Delta_{T0 - T4} = 17,59$ CU), niż preparat 1 ($\Delta_{T0 - T4} = 14,9$ CU) oraz preparat placebo. ($\Delta_{T0 - T4} = 8,5$ CU). Ponadto, nawilżenie to zaczyna wzrastać znacząco po trzech tygodniach aplikacji preparatu 2 (rys. 79). Otrzymane wyniki analizy statystycznej potwierdzają więc założenia, że koniugat JA-YYKS-NH₂ wykazuje działanie nawilżające.



Rys. 79. Różnice wpływu poszczególnych preparatów na poziom nawilżenia skóry po 1, 2, 3 oraz 4 tygodniach ich aplikacji.

Odnotowano także występowanie statystycznie istotnych różnic średniej wartości elastyczności skóry pomiędzy preparatem placebo, a preparatem 1 ($p < 0,001$) i preparatem 2 ($p < 0,05$) po trzech oraz czterech tygodniach ich aplikacji (rys. 80). Oznacza to, że aplikacja zarówno preparatu 1 jak i preparatu 2 powoduje wzrost elastyczności skóry, jednakże preparat 1 wykazuje większą efektywność działania ($\Delta_{T0 - T4} = 0,21$ j.u.) w porównaniu z preparatem 2 ($\Delta_{T0 - T4} = 0,15$ j.u.). Otrzymane wyniki analizy statystycznej potwierdzają, więc założenie, że kwas jasmonowy, obecny w cząsteczkach obu koniugatów JA-YPPF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂ powoduje wzrost elastyczności skóry.

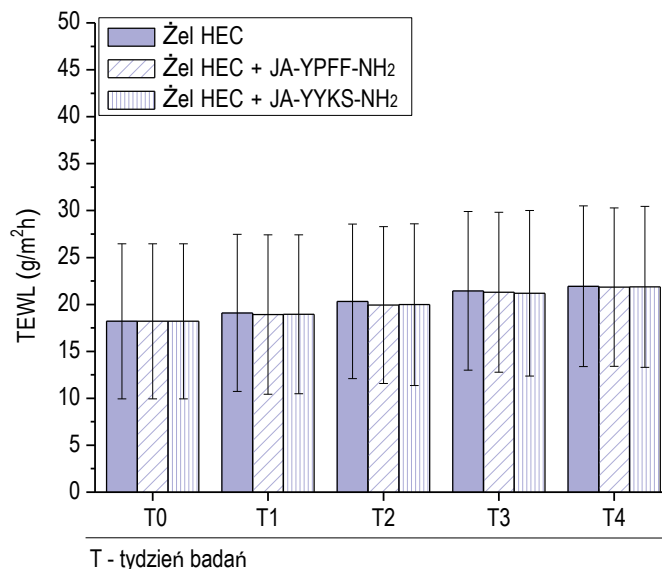


Rys. 80. Różnice wpływu poszczególnych preparatów na poziom elastyczności skóry po 1, 2, 3 oraz 4 tygodniach ich aplikacji.

W oparciu o wyniki testu Dunna stwierdzono brak występowania statystycznie istotnych różnic średniej wartości TEWL w wyniku aplikacji preparatu placebo, 1 oraz 2 przez okres 4

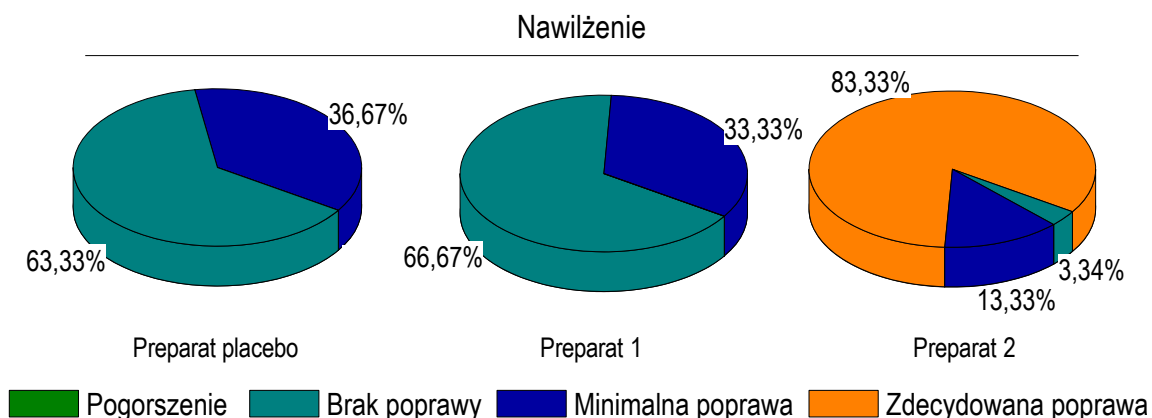


tygodni. Oznacza to, że żaden z przygotowanych preparatów nie ma znaczącego wpływu na wartość transepidermalnej utraty wody (rys. 81).



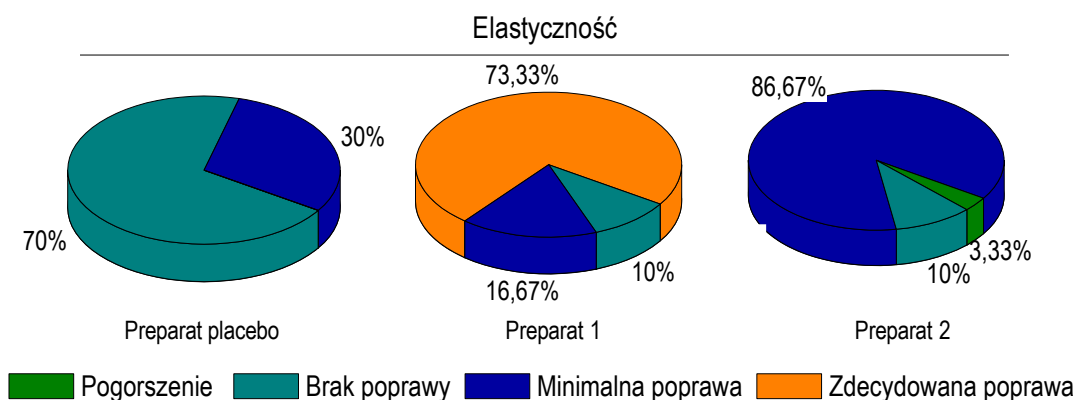
Rys. 81. Różnice wpływu poszczególnych preparatów na poziom TEWL po 1, 2, 3 oraz 4 tygodniach ich aplikacji.

W pracy przedstawiono również wyniki subiektywnej oceny działania preparatów. Po zakończeniu badań probanci wypełnili ankietę, w której ustalono 4-stopniową skalę satysfakcji (rys. 82 - 83). Na podstawie wyników ankiety określono stopień zadowolenia probantów z działania pielęgnacyjnego stosowanych preparatów.



Rys. 82. Wyniki subiektywnej oceny wpływu badanych preparatów na nawilżenie skóry po 4 tygodniach ich stosowania.

Zaobserwowano, że aż 83,33% probantów (25 osób) stwierdziło zdecydowaną poprawę nawilżenia skóry w wyniku czterotygodniowego stosowania preparatu 2, natomiast 13,33% (5 osób) odnotowało minimalną poprawę. Tylko 3,34% badanych (1 osoba) nie zauważyło wzrostu nawilżenia skóry w wyniku stosowania preparatu 2. Zarówno w przypadku placebo, jak i preparatu 1, większość badanych osób (odpowiednio 63,33% oraz 66,67%) nie odnotowała poprawy w nawilżeniu skóry, natomiast 36,67% (placebo) oraz 33,33% (preparat 1) odnotowało minimalną poprawę w nawilżeniu skóry.



Rys. 83. Wyniki subiektywnej oceny wpływu badanych preparatów na elastyczność skóry po 4 tygodniach ich stosowania.

W oparciu o wyniki subiektywnej oceny wpływu badanych preparatów na elastyczność skóry stwierdzono, że 86,67% badanych (26 osób) stwierdziło minimalną poprawę, 10% badanych (3 osoby) odnotowały brak poprawy, a 3,33% (jedna osoba) - pogorszenie elastyczności skóry w wyniku czterotygodniowego stosowania preparatu 2. W przypadku preparatu 1, 73,33% probantów (22 osoby) stwierdziło zdecydowaną poprawę, 16,67% (5 osób) - minimalną poprawę, a 10% (3 osoby) - brak poprawy elastyczności skóry po zakończeniu badań. Stwierdzono, że wszystkie otrzymane wyniki oceny subiektywnej są zbieżne z wynikami pomiarów aparaturowych. Ponadto, ankietowani nie zaobserwowali niepożądanych zmian skórnych w następstwie stosowania testowanych preparatów.

PODSUMOWUJĄC, przeprowadzone badanie *in vivo* efektywności działania przygotowanych formułacji zawierających pochodne kwasu jasmonowego dowiodły, że preparat 2 powoduje największy wzrost nawilżenia skóry, co potwierdza hipotezę na temat potencjalnego działania nawilżającego koniugatu JA-YYKS-NH₂. Wzrost nawilżenia skóry zaobserwowany w przypadku preparatu placebo oraz 1 może być spowodowany zawartością gliceryny (10 % w/w) w składzie kompozycji żelu HEC. Odnotowano również, że zarówno preparat 1, jak i preparat 2 powodują wzrost elastyczności skóry, co potwierdza hipotezę na temat potencjalnego działania uelastyczniającego kwasu jasmonowego. Stwierdzono jednak, że koniugat JA-YFFF-NH₂ powoduje większy wzrost elastyczności skóry, niż koniugat JA-YYKS-NH₂. Wszystkie testowane preparaty spowodowały nieznaczny wzrost transepidermalnej utraty wody. Jest to prawdopodobnie spowodowane brakiem substancji lipidowych (redukujących TEWL) w kompozycji tychże preparatów. Wyniki przeprowadzonych badań nie potwierdziły hipotezy, że koniugat JA-YFFF-NH₂ redukuje nadwrażliwość skóry, ponieważ badania prowadzono na zdrowej, niezmięnionej chorobowo skórze, a do badań nie wykorzystano żadnej substancji wywołującej podrażnienia. Po zakończeniu badań wszyscy probanci wypełnili także ankietę, mającą na celu weryfikację ich opinii na temat wpływu stosowania preparatów na nawilżenie i elastyczność skóry. Wyniki ankiety dowiodły, że wszystkie otrzymane wyniki oceny subiektywnej są zbieżne z wynikami pomiarów aparaturowych.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W oparciu o uzyskane wyniki badań w ramach pracy doktorskiej otrzymano następujące wnioski:

BADANIE STRUKTURY OTRZYMANYCH POCHODNYCH KWASU JASMONOWEGO

- I. Masa cząsteczkowa otrzymanych koniugatów (JA-YPFF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂) została potwierdzona z wykorzystaniem spektrometrii mas ESI-MS. Potwierdzono również ich strukturę oraz obecność charakterystycznych grup funkcyjnych z wykorzystaniem spektroskopii NMR i FTIR.

BADANIE ZDOLNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ KWASU JASMONOWEGO I JEGO POCHODNYCH

- II. Spośród wszystkich badanych substancji aktywnych, koniugat JA-YYKS-NH₂ wykazał największą, a MeDHJ - najmniejszą zdolność wygaszania rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu.
- III. Aktywność antyoksydacyjna jest związana z budową cząsteczki substancji, a zwłaszcza obecnością układu sprzężonych wiązań podwójnych oraz grupy hydroksylowej stanowiącej donor atomu wodoru w reakcji redukcji wolnego rodnika.

OCENA ORGANOLEPTYCZNA PRZYGOTOWANYCH PREPARATÓW

- IV. Przygotowane Emulsje (1, 2 oraz 3) zawierające kwas jasmonowy i jego pochodne cechowały się gładką, jednolitą konsystencją oraz białą barwą, natomiast preparaty na bazie żelu PAA oraz żelu HEC były bezbarwne i klarowne.

ANALIZA MIKROSKOPOWA PRZYGOTOWANYCH PREPARATÓW

- V. Analiza mikroskopowa umożliwiła potwierdzenie typu przygotowanych emulsji (Emulsja 1 oraz 3 - o/w, natomiast Emulsja 2 - w/o). Rozmiar cząstek przygotowanych emulsji nie przekraczał 100 µm, w związku z czym miały one charakter makroemulsji.

BADANIE WARTOŚCI pH ORAZ LEPKOŚCI PRZYGOTOWANYCH PREPARATÓW

- VI. Dodatek substancji aktywnej nie miał istotnego wpływu na wartość pH preparatów. Wartość pH wszystkich preparatów była zbliżona do wartości pH zdrowej skóry, w związku z tym otrzymane preparaty mogą być potencjalnie wykorzystywane do aplikacji naskórných.
- VII. Dodatek substancji aktywnej nie miał istotnego wpływu na zmianę lepkości preparatów. Lepkość przygotowanych formułacji jest determinowana przez zawartość wody w ich kompozycji, ponieważ niezależnie od dodatku jasmonidu, najmniejszą lepkością charakteryzował się żel PAA, natomiast największą - Emulsja 2.

BADANIE KOMPATYBILNOŚCI KRYSTALICZNYCH KONIUAGATÓW ORAZ PRZYGOTOWANYCH FORMULACJI METODĄ

DSC

- VIII. Analiza DSC umożliwiła ocenę czystości chemicznej badanych koniugatów oraz ich kompatybilności z przygotowanymi formułacjami. Związki te są cechowały się dużą czystością chemiczną.
- IX. Kompatybilność lipofilowych koniugatów z daną emulsją jest związana z jej składem recepturowym - im niższa zawartość fazy tłuszczowej, tym gorsza rozpuszczalność badanych substancji w podłożu kosmetycznym. Badane koniugaty wykazały najmniejszą kompatybilność z Emulsją 1, bowiem nie uległy w niej całkowitemu rozpuszczeniu. Związki te dobrze komponują się zarówno z Emulsją 2 i 3, jak i żelem PAA i HEC, zawierającymi w swoim składzie alkohole, stanowiące dobry rozpuszczalnik dla krystalicznych koniugatów.

BADANIE ROZKŁADU WIELKOŚCI CZĄSTEK (PSD) ORAZ STABILNOŚCI (MLS) PRZYGOTOWANYCH FORMULACJI

- X. Temperatura przechowywania ma istotny wpływ na stabilność przygotowanych preparatów. Analiza stabilności preparatów metodą MLS dowiodła, że największą stabilnością wykazały preparaty przechowywane w 4°C, natomiast najmniejszą - preparaty przechowywane w 45°C. Wyniki te są zgodne z analizą zmian rozkładu wielkości cząstek metodą PSD.
- XI. Kompozycja i lepkość preparatów mają znaczący wpływ na ich stabilność. Niezależnie od warunków przechowywaniaprzechowywania, największą stabilnością cechowały się preparaty na bazie Emulsji 3 z dodatkiem autoemulgatora. Najmniejszą stabilność w temperaturze przechowywania 4 oraz 25°C wykazały preparaty na bazie Emulsji 1. Jest to prawdopodobnie związane z ich niską lepkością oraz brakiem autoemulgatora w kompozycji. Najmniejszą stabilność w temperaturze przechowywaniaprzechowywania 45°C wykazały z kolei preparaty na bazie Emulsji 2 (upłynnienie emulsji i jej destabilizacja wskutek obniżenia lepkości).
- XII. Nie stwierdzono znaczących różnic pomiędzy rozkładem wielkości cząstek danej formulacji, zawierającej różne jasmonidy przechowywane w określonych warunkach temperaturowych.
- XIII. Rozpuszczalność substancji aktywnej w podłożu kosmetycznym ma wpływ na stabilność preparatu. Im większa lipofilowość substancji aktywnych, tym lepsza ich rozpuszczalność w podłożu o dużej zawartości fazy tłuszczowej. Badane substancje aktywne mają charakter lipofilowy, w związku z czym słabo rozpuszczają się w Emulsji 1 o niskiej zawartości fazy tłuszczowej (22,50 % w/w).
- XIV. Obecność substancji z grupy alkoholi (izopropanol, gliceryna) w kompozycji preparatu ułatwia rozpuszczanie lipofilowych substancji aktywnych.
- XV. Dodatek kwasu jasmonowego i jego pochodnych do baz emulsji ma wpływ na ich stabilność. Stwierdzono, że dodatek kwasu jasmonowego powoduje największą destabilizację Emulsji 1 oraz 2 w temperaturze przechowywania 4 oraz 25°C. Jest to prawdopodobnie związane z większą gęstością JA, w porównaniu z pozostałymi jasmonidami. Pomimo tego faktu, wartość parametru ΔBS wszystkich przygotowanych formulacji, przechowywanych w temperaturze 4 oraz 25°C nie przekraczała jednak progu 10 %, w związku z czym uznano je za preparaty stabilne. Wartość $\Delta BS > 10\%$ została odnotowana w przypadku preparatów na bazie Emulsji 1, przechowywanychprzechowywanych w temperaturze 45°C. W związku z powyższym, zostały one uznane za niestabilne we wspomnianych warunkach przechowywaniaprzechowywania.

BADANIE WPLYWU DODATKU JASMONIDÓW NA STABILNOŚĆ TERMICZNĄ FORMULACJI Z WYKORZYSTANIEM TGA

- XVI. Dodatek kwasu jasmonowego i jego pochodnych nie ma znaczącego wpływu na stabilność termiczną przygotowanych formulacji.
- XVII. Stabilność termiczna formulacji zależy przede wszystkim od ich kompozycji. Zaobserwowano, że im większa zawartość fazy wodnej formulacji, tym szybsza jej degradacja w wyniku działania wysokich temperatur. W oparciu o wyniki badań nie odnotowano zmian w składzie przygotowanych formulacji zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne.

OZNACZANIE KWASU JASMONOWEGO I JEGO POCHODNYCH W PREPARATACH KOSMETYCZNYCH ZA POMOCĄ HPLC

- XVIII. Opracowana metoda oznaczania jasmonidów w formulacjach kosmetycznych charakteryzowała się wysoką liniowością oraz niską granicą wykrywalności i oznaczalności w określonym przedziale stężeń substancji aktywnej.
- XIX. Wszystkie badane jasmonidy wykazały większą stabilność w preparatach przechowywanych przechowywanych w temperaturze 4°C.

BADANIE PRZENIKANIA SUBSTANCJI AKTYWNYCH PRZEZ BARIERY IMITUJĄCE SKÓRĘ *IN VITRO*

- XX. Lepkość podłoża ma decydujący wpływ na ilość uwolnionej substancji aktywnej. Najlepsze podłoże do uwalniania JA i jego pochodnych stanowi hydrofilowy żel PAA, charakteryzujący się niską lepkością, natomiast najgorsze podłoże stanowi Emulsja 2 typu o/w, charakteryzująca się największą lepkością spośród wszystkich przygotowanych formułacji.
- XXI. Podłoża o niskiej lepkości warunkują szybsze uwalnianie kwasu jasmonowego i jego pochodnych do medium w porównaniu z preparatami o większej lepkości.
- XXII. Modyfikacja kwasu jasmonowego za pomocą wybranych tetrapeptydów zmienia jego lipofilowość. W konsekwencji zwiększa się ilość uwolnionej substancji aktywnej z przygotowanych hydrożeli (PAA oraz HEC) w porównaniu z kwasem jasmonowym.
- XXIII. Wszystkie profile uwalniania JA z badanych preparatów były najbardziej zgodne z modelem Korsmeyera-Peppasa, natomiast profile uwalniania pozostałych pochodnych kwasu jasmonowego były zgodne z modelem kinetycznym Higuchiego.

BADANIE *IN VIVO* EFEKTYWNOŚCI DZIAŁANIA PRZYGOTOWANYCH FORMULACJI ZAWIERAJĄCYCH JASMONIDY

- XXIV. Wykazano, że aplikacja preparatu zawierającego koniugat JA-YYKS-NH₂ na skórę powoduje większy wzrost jej nawilżenia, aniżeli aplikacja preparatu zawierającego koniugat JA-YPFF-NH₂ oraz preparat placebo. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że sekwencja tetrapeptydu wchodzącego w skład koniugatu JA-YYKS-NH₂ przypomina skład aminokwasowy α -kolagenu typu III (tzw. kolagenu natywnego), który ma znaczący wpływ na poziom nawilżenia skóry.
- XXV. Wykazano, że aplikacja preparatu zawierającego koniugat JA-YPFF-NH₂ na skórę powoduje większy wzrost jej elastyczności, aniżeli aplikacja preparatu zawierającego koniugat JA-YYKS-NH₂ oraz preparat placebo. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że koniugat zawiera w swoim składzie cząsteczki proliny, która wraz z hydroksyproliną oraz glicyną stanowią trzy podstawowe jednostki budulcowe α -kolagenu typu I. Jest to najbardziej powszechnie występujący rodzaj kolagenu w ludzkiej skórze.
- XXVI. Wszystkie testowane preparaty spowodowały nieznaczny wzrost transepidermalnej utraty wody. Jest to prawdopodobnie spowodowane brakiem substancji lipidowych (redukujących TEWL) w kompozycji tychże preparatów
- XXVII. Wyniki ankiety prowadzonej wśród probantów po zakończeniu badań dowiodły, że wszystkie otrzymane wyniki oceny subiektywnej są zbieżne z wynikami pomiarów aparaturowych.

STRESZCZENIE

W ostatnich latach nastąpił dynamiczny rozwój przemysłu kosmetycznego. Z tego względu naukowcy i technolodzy nieustannie poszukują nowych substancji aktywnych, które polepszyłyby kondycję i wygląd skóry. Nowością na rynku farmaceutycznym oraz kosmetycznym są jasmonidy - hormony roślinne, które wykazują aktywność terapeutyczną.

W związku z powyższym, głównym celem przedkładanej rozprawy doktorskiej było opracowanie oraz analiza nowych preparatów zawierających kwas jasmonowy (*ang.* jasmonic acid, JA) i jego pochodne - jasmonian metylu (*ang.* methyl jasmonate, MeJ) oraz dihydrojasmonian metylu (*ang.* methyl dihydrojasmonate, MeDHJ). Podjęto także próbę zaprojektowania oraz determinacji aktywności *in vivo* nowych pochodnych kwasu jasmonowego w postaci jego koniugatów z wybranymi tetrapeptydami (JA-YPFF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂). Celem badań w ramach pracy doktorskiej była także ocena potencjalnego zastosowania nowych receptur zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne w preparatach do pielęgnacji skóry.

W niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono charakterystykę fizykochemiczną kwasu jasmonowego i jego pochodnych. Struktury koniugatów JA-YPFF-NH₂ oraz JA-YYKS-NH₂ potwierdzono za pomocą następujących metod spektroskopowych: ESI-MS, FTIR oraz NMR. Zdeterminowano również aktywność przeciwutleniającą badanych związków z wykorzystaniem metody rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu. Wykazano, że spośród wszystkich badanych substancji aktywnych, koniugat JA-YYKS-NH₂ posiadał największą, a MeDHJ - najmniejszą aktywność antyoksydacyjną, która jest związana z budową cząsteczki substancji aktywnej.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej przygotowano pięć różnych preparatów (Emulsja 1, 2 i 3, żel HEC oraz żel PAA) zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. Przeprowadzono ocenę organoleptyczną oraz analizę mikroskopową otrzymanych formułacji. Odnotowano także, że wartość pH wszystkich preparatów była zbliżona do wartości pH zdrowej skóry, a dodatek substancji aktywnej nie miał istotnego wpływu na wartość pH preparatów. Stwierdzono również, że lepkość przygotowanych formułacji jest determinowana przez zawartość wody w ich kompozycji, ponieważ niezależnie od typu dodanego jasmonidu, najmniejszą lepkością charakteryzował się żel PAA, natomiast największą - Emulsja 2.

Kompatybilność substancji aktywnych z bazą kosmetyczną może mieć kluczowy wpływ na stabilność gotowego preparatu. W niniejszej pracy zbadano kompatybilność krystalicznych koniugatów ze wszystkimi przygotowanymi preparatami. Stwierdzono, że badane koniugaty są najmniej kompatybilne z Emulsją 1. Związki te są natomiast kompatybilne z pozostałymi przygotowanymi bazami kosmetycznymi. Wyniki analizy DSC badanych substancji aktywnych potwierdziły wysoką czystość otrzymanych koniugatów.

Preparaty przeznaczone do aplikacji naskórkowej powinny cechować się wysoką stabilnością w czasie. Otrzymane formułacje przechowywano w różnych warunkach temperaturowych (w 4 oraz 25°C przez 70 dni oraz w 45°C przez 14 dni). Następnie przeprowadzono ocenę ich stabilności z wykorzystaniem techniki wielokrotnego rozpraszania światła (*ang.* multiple light scattering, MLS) oraz dyfrakcji laserowej (*ang.* laser diffraction, LD). Stwierdzono, że spośród wszystkich przygotowanych emulsji, najbardziej stabilne są preparaty przechowywane w temperaturze 4°C. Najmniejszą stabilnością cechowały się z kolei preparaty przechowywane w temperaturze 45 °C. W przypadku formułacji na bazie Emulsji 2, uległy one rozwarstwieniu już po 24 godzinach przechowywania w temperaturze 45°C. Odnotowano, że spośród wszystkich preparatów przechowywanych w temperaturze 4 oraz 25 °C, największą stabilnością cechowały się preparaty na bazie Emulsji 3. Jest to związane z obecnością autoemulgatora w kompozycji wspomnianych formułacji. Stwierdzono także, dodatek jasmonidów nie ma znaczącego wpływu na rozkład wielkości cząstek przygotowanych preparatów. Ponadto, potwierdzono wpływ działania ultradźwięków na rozmiar cząstek emulsji. Zmiana

rozkładu wielkości cząstek wskutek działania ultradźwięków na zdyspergowaną próbkę może być bowiem wykorzystywana do detekcji zjawiska aglomeracji cząstek preparatów.

Wyniki analizy stabilności otrzymanych preparatów metodą MLS są zgodne z wynikami analizy metodą LD. Ponadto, w oparciu o wyniki analizy zmian parametru wstecznego rozproszenia w czasie stwierdzono, że najmniejszą stabilność w temperaturze przechowywania 4 oraz 25 °C wykazały preparaty na bazie Emulsji 1. Jest to prawdopodobnie związane z ich niską lepkością oraz brakiem autoemulgatora w kompozycji. Ponadto, stwierdzono zależność pomiędzy stabilnością preparatu a rozpuszczalnością substancji aktywnej w podłożu kosmetycznym. Im większa lipofilowość substancji aktywnych, tym lepsza ich rozpuszczalność w podłożu o dużej zawartości fazy tłuszczowej. Badane substancje aktywne mają charakter lipofilowy, w związku z czym są słabo rozpuszczalne w podłożu Emulsji 1 o niskiej zawartości fazy tłuszczowej (22,50 % w/w).

W pracy zbadano także wpływ dodatku kwasu jasmonowego i jego pochodnych na stabilność przygotowanych preparatów. Stwierdzono, że dodatek kwasu jasmonowego powoduje największą destabilizację Emulsji 1 oraz 2 w temperaturze przechowywania 4 oraz 25°C. Jest to prawdopodobnie związane z właściwościami fizykochemicznymi JA. Związek ten charakteryzuje się większą gęstością, niż MeJ czy MeDHJ, co może utrudniać otrzymanie homogenicznego układu i w efekcie prowadzić do obniżenia jego stabilności. Wartość zmian parametru wstecznego rozproszenia wszystkich przygotowanych formułacji, przechowywanych w temperaturze 4 oraz 25°C nie przekracza jednak progu 10 %, w związku z czym są one uznawane za preparaty stabilne. Wartość graniczna została przekroczona w przypadku preparatów na bazie Emulsji 1 przechowywanych w temperaturze 45°C. W związku z powyższym, zostały one uznane za niestabilne we wspomnianych warunkach przechowywania.

W przedkładanej rozprawie doktorskiej przeprowadzono również ocenę wpływu dodatku JA i jego pochodnych na stabilność termiczną formułacji z wykorzystaniem analizy termogravimetrycznej. Odnotowano brak wpływu dodatku substancji aktywnych na stabilność termiczną wszystkich przygotowanych preparatów. Stwierdzono, że stabilność termiczna formułacji zależy przede wszystkim od ich kompozycji. Zaobserwowano, że im większa zawartość fazy wodnej formułacji, tym szybsza jej degradacja w wyniku działania wysokich temperatur. W związku z powyższym, największą stabilnością termiczną cechowały się preparaty na bazie Emulsji 2 (20,50 % fazy wodnej), natomiast najmniejszą - preparaty na bazie żelu PAA (99% fazy wodnej). Analiza TGA została również wykorzystana do oceny zmian składu kompozycji preparatów w czasie. W oparciu o wyniki badań nie odnotowano zmian w składzie przygotowanych formułacji zawierających kwas jasmonowy i jego pochodne. Należy wspomnieć, że stabilność termiczna preparatu nie jest tożsama z jego stabilnością w czasie.

Skuteczność działania preparatu zależy w dużej mierze od ilości substancji aktywnej, jaka uwalnia się z podłoża kosmetycznego. W związku z powyższym, badania uwalniania substancji aktywnej mogą stanowić kluczowy etap badań podczas opracowywania nowych receptur kosmetycznych oraz farmaceutycznych. Ze względu na brak danych literaturowych dotyczących uwalniania jasmonidów z półstałych form kosmetycznych, w niniejszej pracy doktorskiej opracowano metodykę badań uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych z przygotowanych preparatów przez semiprzepuszczalne membrany syntetyczne *in vitro* do roztworu akceptorowego o określonej wartości pH oraz temperatury. Ocenę ilości uwolnionej substancji prowadzono z wykorzystaniem spektrofotometrii UV-Vis. Wykazano, że lipofilowość cząsteczki substancji aktywnej może być czynnikiem limitującym jej uwalnianie z podłoża o dużej zawartości komponentów tłuszczowych. Stwierdzono również, że rodzaj formułacji determinuje szybkość uwalniania jasmonidów, bowiem wraz ze wzrostem lepkości preparatu maleje ilość uwolnionej substancji. W oparciu o uzyskane dane empiryczne, przeprowadzono również ocenę kinetyki uwalniania jasmonidów z przygotowanych formułacji. Wysoka wartość współczynnika korelacji R^2 wskazała na dobre dopasowanie profilu uwalniania JA do modelu Korsmeyera-Peppasa. Profile uwalniania pozostałych substancji aktywnych były natomiast zgodne z modelem Higuchiego.

Nie tylko formuła, ale również substancja aktywna powinna być stabilna w określonych warunkach przechowywania preparatu. Znaczny spadek stężenia substancji aktywnej w preparacie kosmetycznym jest zmianą ilościową i może świadczyć o niestabilności tejże substancji w zdefiniowanych warunkach przechowywania. W celu określenia stabilności JA i jego pochodnych w przygotowanych preparatach, opracowano metodykę ich oznaczania z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (*ang.* high performance liquid chromatography, HPLC). Stwierdzono, że wszystkie badane jasmonidy wykazują większą stabilność w preparatach przechowywanych w temperaturze 4°C. Jest to prawdopodobnie związane z faktem, że kwas jasmonowy i jego pochodne zaliczane są do grupy VOCs, które w wyższych temperaturach łatwo przechodzą w postać pary lub gazu. W związku z powyższym, im niższa temperatura przechowywania, tym lepsza stabilność preparatów zawierających jasmonidy. Nadto, należy nadmienić, iż jest to zgodne z tym co zalecają producenci wzorców kwasu jasmonowego i jego pochodnych (przechowywanie produktów w niskich temperaturach w celu przedłużenia okresu ich trwałości i stabilności).

Wyniki analizy uwalniania kwasu jasmonowego i jego pochodnych przez syntetyczne membrany skłoniły do podjęcia oceny skuteczności działania przygotowanych preparatów w badaniach *in vivo* z udziałem grupy probantów. Na podstawie obliczeń statystycznych stwierdzono, że preparaty zawierające koniugaty wykazują lepsze działanie pielęgnacyjne (wzrost elastyczności / nawilżenia skóry) w porównaniu z preparatami *placebo*. Odnotowano, że preparat 2 (żel HEC + JA-YYKS-NH₂) powoduje największy wzrost nawilżenia skóry, co potwierdza hipotezę na temat potencjalnego działania nawilżającego koniugatu JA-YYKS-NH₂. Odnotowano również, że zarówno preparat 1 (żel HEC + JA-YPPF-NH₂), jak i preparat 2 powodują wzrost elastyczności skóry, co potwierdza hipotezę na temat potencjalnego działania uelastyczniającego kwasu jasmonowego. Stwierdzono jednak, że koniugat JA-YPPF-NH₂ powoduje większy wzrost elastyczności skóry, niż koniugat JA-YYKS-NH₂. Wyniki subiektywnej ankiety po zakończeniu badań były zgodne z wynikami aparaturowymi. Rezultaty badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej dowodzą, że kwas jasmonowy i jego pochodne mogą stanowić ciekawe zagadnienie dla przemysłu kosmetycznego.

SUMMARY

Recent dynamic development of cosmetic industry has implied the search for new active ingredients that will improve skin appearance and its condition. One group of such new ingredients are jasmonates, plant hormones, that exhibit therapeutic activity.

The main aim of the doctoral dissertation presented was to develop and analyze new formulations containing jasmonic acid (JA) and its derivatives such as methyl jasmonate (MeJ) and methyl dihydrojasmonate (MeDHJ). An attempt was also made to design new derivatives of jasmonic acid in the form of its conjugates with selected tetrapeptides (JA-YPPF-NH₂ and JA-YYKS-NH₂) as well as to determine their biological activity *in vivo*. Another objective of this PhD thesis was to evaluate the potential use of new formulations containing jasmonic acid and its derivatives in skin care.

Jasmonic acid and its derivatives were subjected to detail physicochemical characterization. The structures of new conjugates (JA-YPPF-NH₂ and JA-YYKS-NH₂) were confirmed using the following spectral methods: ESI-MS, FTIR and NMR. Antioxidant activity of tested jasmonates was also determined using free radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method. It was established that the conjugate JA-YYKS-NH₂ exhibited the strongest antioxidant activity, whereas MeDHJ showed the smallest antioxidant potential among all tested compounds. The antioxidant activity was found to be strongly connected with the structure of a tested compound.

Five different formulations (Emulsion 1, 2 and 3 as well as HEC gel and PAA gel) containing JA and its derivatives were prepared. Organoleptic assessments as well as microscopic analysis of obtained products were performed. It was observed that the pH value of all obtained formulations was similar to the pH value of healthy skin and the addition of an active compound had no significant influence on the pH value of formulation base. The viscosity of prepared products was found to be determined by the amount of water in their composition, because regardless of the addition of jasmonate, the most viscous was Emulsion 2 and the least viscous was PAA gel.

The compatibility of the active substance to the cosmetic base may have a key influence on the stability of the final product. Thus, the compatibility of crystal conjugates and all prepared cosmetic bases was investigated. It was found that the designed conjugates are less compatible with Emulsion 1. However, these compounds are compatible with all other prepared formulations. Results of DSC analysis confirmed high purity of obtained conjugates.

Formulations intended for topical application should exhibit good stability over time. Therefore, the obtained products were stored at different temperatures (4 and 25 °C for 70 days and at 45 °C for 14 days). The stability studies of these formulations were performed using multiple light scattering (MLS) and laser diffraction (LD) techniques. It was found that the formulation stored at 4 °C was the most stable, whereas the products stored at 45 °C were the least stable. All formulation based on Emulsion 2 underwent delamination already after 24 hours of storage at 45 °C. From among all prepared products stored at 4 and 25 °C, the most stable were the products based on Emulsion 3. This fact is related to the presence of co-emulsifier in its composition. Moreover, the addition of jasmonates had no significant influence on a particle size distribution of obtained products. However, the influence of ultrasounds on the particles size distribution of emulsion was confirmed. Changes in particle size distribution as a result of ultrasounds treatment may be used for the detection of aggregation phenomenon of the emulsion particles.

The results of stability studies performed using MLS are in compliance with LD measurements. On the basis of changes in the backscattering parameter value over time it was concluded that from among all formulations stored at 4 and 25 °C, less stable were the products based on Emulsion 1. It was probably caused by their low viscosity and lack of co-emulsifier in their composition. A relationship between the formulation stability and the solubility of the active substance in cosmetic base was observed. The more lipophilic the active ingredient, the better solubility of this ingredient in the cosmetic base containing a little amount of an oil phase. The tested jasmonates are lipophilic, therefore they are poorly soluble in the base of Emulsion 1, containing only 22.50% of water phase.

Another problem studied was the influence of JA and its derivatives on the stability of prepared products. It was determined that the addition of jasmonic acid caused the greatest destabilization of Emulsion 1 and 2, stored at 4 and 25 °C. It was probably related to the physicochemical properties of JA. This compound exhibited higher density than MeJ or MeDHJ that might cause difficulties in obtaining homogenous system and hence led to a decrease in its stability. The value of delta backscattering of all prepared formulations, stored at 4 and 25 °C, did not exceed 10 %, therefore they can be treated as stable samples. This limiting value was exceeded for the products based on Emulsion 1 and stored at 45 °C. Therefore, these formulations are presumed to be unstable in the mentioned storage conditions.

The influence of JA and its derivatives on thermal stability of formulations was also studied by thermogravimetric analysis. No influence of the addition of jasmonates on thermal stability of the prepared products was observed. The thermal stability of formulations mainly depended on their composition. The higher the amount of water phase in the formulation, the faster the degradation of the product effected by high temperature. Therefore, the products based on Emulsion 2 were the most stable (22.50% of water phase), and products on the basis of PAA gel – the least stable (99% of water phase) from among all prepared formulations. TGA analysis was also used to evaluate the changes in composition of the obtained products over time. According to the results, no changes in the composition of prepared products containing Ja and its derivatives were observed over time. It should be mentioned that thermal stability of a formulation is not identical with its stability over time.

The effectiveness of cosmetic product mainly depends on the amount of an active substance released from cosmetic base. Therefore, release of the active substance may be a key stage of studies during development of new cosmetic and pharmaceutical products. There is no literature data on release of jasmonates from semisolid dosage forms. Therefore, a methodology for release studies of jasmonates from prepared formulations to the medium (with known pH value and temperature) through semipermeable synthetic membranes in vitro was developed. The assessment of the amount of released substance was performed using UV-Vis spectrophotometry. It was determined that lipophilicity of the active compound might be a limiting factor of its release from the base-containing majority of fat components. It was also concluded that the type of formulation determined the release kinetics of jasmonates because the amount of released compound decreased with the increasing viscosity of formulation. The release kinetics of jasmonates from the obtained products was also evaluated. High value of correlation coefficient R² indicated a good fit of JA release to the Korsmeyer-Peppas model. Release profiles of other tested jasmonates were compliant with the Higuchi model.

Not only formulation, but also the active ingredient should be stable in certain storage conditions. Considerable decrease in the active ingredient concentration in the formulation is a quantitative change and may indicate the instability of this substance in certain storage conditions. To determine the stability of JA and its derivatives in the prepared products, the methodology for analysis of their stability using high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. It was determined that all tested jasmonates were the most stable as components of products stored at 4°C. This is probably caused by the fact that jasmonates are VOCs, which sublime easily in higher temperature. Therefore, the lower the temperature of storage, the better the stability of formulations containing jasmonates. Furthermore, it should be mentioned that this is compliant with the recommendations given by the suppliers of JA and its derivatives (the storage of products at low temperature conditions to prolong their shelf-life and stability).

Results of jasmonates release studies through synthetic membranes prompted the assessment of effectiveness of the prepared products in in vivo studies on human volunteers. According to the results of statistical analysis it was found that the products containing conjugates exhibited better activity (increase in the skin elasticity/moisturization) than placebo products. Product 2 (HEC gel + JA-YYKS-NH₂) caused the highest increase in the human skin moisturization that confirmed the hypothesis on the potential moisturizing activity of the JA-YYKS-NH₂ conjugate. Product 1 (HEC gel + JA-YPPFF-NH₂) as well as product 2 caused an increase in the human skin elasticity that confirmed the hypothesis on a potential influence of jasmonic acid on increase in skin elasticity. The JA-YPPFF-NH₂ conjugate caused

higher increase in skin elasticity than the JA-YYKS-NH₂ conjugate. The results of subjective survey performed after in vivo studies were compliant with the instrumental results. The results of the studies performed as a part of presented doctoral thesis proved that jasmonic acid and its derivatives might be interesting ingredients for cosmetic industry.

SPIS PUBLIKACJI ORAZ ZGŁOSZEŃ PATENTOWYCH

ZGŁOSZENIA PATENTOWE

1. **Kapuścińska, A.**, Olejnik, A., Nowak, I., Kamysz, W. Koniugat kwasu jasmonowego oraz tetrapeptydu YPFF. Numer zgłoszenia patentowego P.415331. Data przyjęcia zgłoszenia patentowego: 2015-12-22.

PUBLIKACJE Z LISTY A CZASOPISM PUNKTOWANYCH PRZEZ MNiSW

1. Olejnik, A., **Kapuścińska, A.**, Schroeder, G., & Nowak, I. (2017). Physico-chemical characterization of formulations containing endomorphin-2 derivatives. *Amino Acids*, 49(10), 1719-1731 (IF = 3,173; punkty MNiSW = 30).
2. Fabrowska J., **Kapuścińska A.**, Łęska B., Feliksik-Skrobich K., Nowak I., In vivo studies and stability study of *Cladophora glomerata* extract as a cosmetic active ingredient, *Acta Poloniae Pharmaceutica. Drug Research* 74(2), 633-641 (IF = 0,96; punkty MNiSW = 15).
3. **Kapuścińska, A.**, Olejnik, A., & Nowak, I. (2016). The conjugate of jasmonic acid and tetrapeptide as a novel promising biologically active compound. *New Journal of Chemistry*, 40(11), 9007-9011 (IF = 3,269, punkty MNiSW = 30).
4. **Kapuścińska, A.**, Igielska-Kalwat, J., Gościńska, J., & Nowak, I. (2015). Zastosowanie nanocząstek metali w kosmetyce. *Przemysł Chemiczny*, 94(4), 566-569 (IF = 0,385, punkty MNiSW = 15).
5. **Kapuścińska, A.**, & Nowak, I. (2015). Zastosowanie kwasów organicznych w terapii trądziku i przebarwień skóry. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 69, 374-383 (IF = 0,69, punkty MNiSW = 15).

PUBLIKACJE Z LISTY B CZASOPISM PUNKTOWANYCH PRZEZ MNiSW

1. **Kapuścińska, A.**, & Nowak, I. (2015). Zastosowanie fitoestrogenów w kosmetykach przeciw starzeniu się skóry. *Chemik*, 69(3), 154-159.
2. **Kapuścińska, A.**, & Nowak, I. (2014). Wykorzystanie mocznika i jego pochodnych w przemyśle kosmetycznym. *Chemik*, 68(2), 91-96.

POZOSTAŁE PUBLIKACJE

1. **Kapuścińska, A.** (2014). Kosmetyczne substancje aktywne przyszłości, Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki, 2(3), 50.
2. **Kapuścińska, A.** (2014). Porównanie własności oraz zastosowania nanocząstek tlenków metali i ich odpowiedników konwencjonalnych w przemyśle kosmetycznym. *Dokonania Młodych Naukowców*, 1(2), 125.
3. **Kapuścińska, A.** (2013). Peptydy stosowane w kosmetyce. *Młodzi naukowcy dla polskiej nauki, część XI- Nauki przyrodnicze*, 1, 17-23.

ROZDZIAŁY W MONOGRAFIACH

1. **Kapuścińska, A.**, & Nowak, I (2016). Wybrane fitohormony jako substancje aktywne w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym. *Cursiva, Środowisko i przemysł (Tom IV)*, red. Grzegorz Schroeder, Piotr Grzesiak, 293-311.
2. **Kapuścińska, A.**, & Nowak, I (2016). Rośliny – przegląd wybranych zagadnień, Wykorzystanie wybranych fitohormonów w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym. *Wydawnictwo Naukowe TYGIEL*, red. Monika Maciąg, Marcin Szklarczyk, 160-174.
3. **Kapuścińska, A.**, Olejnik, A., & Nowak, I. (2016). The Application of Phytoestrogens in Cosmetic Industry. *Nova Science Publisher, Advances in Medicine and Biology (Volume 110, Chapter 6)*, edytor: Leon V. Berhardt, 131-150.
4. **Kapuścińska, A.**, Olejnik, A., & Nowak, I. (2016). The Potential Role of Phytoestrogens in Hormonal Replacement Therapy. *Nova Science Publisher, Advances in Medicine and Biology (Volume 110, Chapter 7)*, edytor: Leon V. Berhardt, 151-172.
5. **Kapuścińska, A.**, Olejnik, A., & Nowak, I. (2016). Nanocapsules as carriers of active substances (Chapter 8). *Elsevier, Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics (Volume 10)*, edytor: Alexandru Grumezescu, 175-199.

6. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** (2016). Nanocapsules as carriers of active substances (Chapter 15). Elsevier, Silver nanoparticles as a challenge for modern cosmetology and pharmacology (Volume 10), edytor: Alexandru Grumezescu, 395-417.
7. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** (2016). Jasmonates as new active substances in pharmaceutical and cosmetic industry, EYEC Monograph, 53-59.
8. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** (2015). Detection of emulsion destabilisation processes on the basis of selected physicochemical parameters. EYEC Monograph, 281-288.
9. **Kapuścińska, A.,** (2015). Fitoestrogeny oraz fitohormony jako kosmetyczne substancje aktywne. Zagadnienia aktualnie poruszane przez młodych naukowców (Tom 2), 408-410.
10. **Kapuścińska, A.,** (2015). Analiza rozkładu wielkości cząstek emulsji zawierających jasmonidy. Zagadnienia aktualnie poruszane przez młodych naukowców (Tom 2), 406-407.
11. **Kapuścińska, A.** (2014). Konserwanty stosowane w kosmetykach. Nowe trendy w naukach przyrodniczych 4, Creative Science- Monografia 2013, Wyd. Creativetime, Kraków 2013, 18-26.

SPIS WYSTĄPIEŃ NA KONFERENCJACH NAUKOWYCH

KONFERENCJE MIĘDZYNARODOWE – KOMUNIKATY

1. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** The use of laser diffraction (LD) technique in detection the instability of emulsions containing jasmonates, 5th European Young Engineers Conference, 20-22.04.2016, Warszawa.
2. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** Laser diffraction (LD) technique as a novel and useful method in detection the instability of emulsions containing jasmonates 2nd Polish-Kazakh Meeting: relationship between chemistry and biology. 28.06.2016, Poznań.
3. **Kapuścińska, A., Olejnik, A. & Nowak, I.** Analysis of the stability of cosmetics emulsion containing jasmonates using the multiple light scattering phenomenon, European Young Engineers Conference, 27-29.04.2015, Warszawa.

KONFERENCJE MIĘDZYNARODOWE – POSTERY

1. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** The use of jasmonates in pharmaceutical and cosmetic industry, 5th European Young Engineers Conference, 20-22.04.2016, Warszawa.
2. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** The use of diffusion phenomenon in the theoretical model of active substances transdermal transport, European Young Engineers Conference, 27-29.04.2015, Warszawa.
3. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** Prospects for the use of carbon nanotubes in cancer therapy, The 9th Torunian Carbon Symposium, 14-18.09.2014, Toruń.
4. **Kapuścińska, A., Igielska-Kalwat, J. & Nowak, I.** Applications of nanotubes in medicine, The 9th Torunian Carbon Symposium, 14-18.09.2014, Toruń.
5. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** Wybrane fitohormony nowymi składnikami aktywnymi kosmetyków, II Międzynarodowa Konferencja Naukowa Oxygenalia 2014, 7-8.11.2014 Poznań.
6. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** Influence of storage conditions on the stability of emulsions containing jasmonates, BPCI Warsaw, 21-24.10.2014, Warszawa.

KONFERENCJE KRAJOWE – KOMUNIKATY

1. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** Wykorzystanie zjawiska wielokrotnego rozpraszania światła (MLS) w analizie stabilności emulsji zawierających jasmonidy. Nowe wyzwania dla polskiej nauki. 16.01.2016, Warszawa.
2. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** Nowoczesne metody analizy stabilności formulacji zawierających jasmonidy”, IV Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, 12-13 maja 2016, Łódź.
3. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** Wykorzystanie β -jasmonidów w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym, VIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel, 12-13.03.2016, Lublin.
4. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** Wykorzystanie wybranych fitohormonów w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym, I Interdyscyplinarna Akademicka Konferencja Ochrony Środowiska IAKOŚ 2016, 18-20.03.2016, Gdańsk.
5. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** Wykorzystanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej w analizie stabilności jasmonidów w formulacjach kosmetycznych, Nowe wyzwania dla polskiej nauki. Spojrzenie Młodych Naukowców. 3.04.2016, Gdańsk.
6. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** Kwas jasmonowy i jego pochodne jako potencjalne kosmetyczne oraz farmaceutyczne substancje aktywne przyszłości, Ogólnopolska Konferencja Krajowa pt. Badania młodych naukowców jako krok w rozwoju Nauki-edycja wiosenna. 23.04.2016, Warszawa.
7. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** Wykorzystanie metody wielokrotnego rozpraszania światła w ocenie stabilności formulacji zawierających jasmonidy. VI Kopernikańskie Sympozjum Studentów Nauk Przyrodniczych, 15-17.04.2016, Toruń.
8. **Kapuścińska, A., & Nowak, I.** Wykorzystanie metod chromatograficznych w analizie stabilności kwasu jasmonowego i jego pochodnych w wybranych formulacjach kosmetycznych. III Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce-Badania i Rozwój. 11.04.2016, Poznań.
9. **Kapuścińska, A., Olejnik, A. & Nowak, I.** Koniugaty jasmonidów i oligopeptydów jako potencjalne substancje aktywne preparatów farmaceutycznych oraz kosmetycznych. 59. Zjazd PTChem i SITPChem. 19-23.09.2016, Poznań.

10. **Kapuścińska, A.**, & Nowak, I. Metody analizy parametrów fizykochemicznych formułacji zawierających jasmonidy – kosmetyczne i farmaceutyczne substancje aktywne przyszłości. 59. Zjazd PTChem i SITPChem. 19-23.09.2016, Poznań.
11. **Kapuścińska, A.**, & Nowak, I. Zastosowanie wybranych hormonów roślinnych w kosmetykach przeciw starzeniu się skóry, IV Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców "Nauka dla Środowiska Przyrodniczego", 23-25.04.2015, Poznań
12. **Kapuścińska, A.**, & Nowak, I. Wpływ warunków przechowywania na rozkład wielkości cząstek emulsji zawierających jasmonidy, WPŁYW MŁODYCH NAUKOWCÓW NA OSIĄGNIĘCIA POLSKIEJ NAUKI VII EDYCJA - Nowe trendy w naukach przyrodniczych, 17.01.2015, Wrocław.
13. **Kapuścińska, A.**, Olejnik, A., Igielska-Kalwat, J., Gościańska, J., Zielińska, A. & Nowak, I. Stabilność emulsji kosmetycznych zawierających wybrane substancje aktywne, 58. Zjazd PTChem i SITPChem, 21-25.09.2015, Gdańsk.
14. **Kapuścińska, A.**, & Nowak, I. Wykorzystanie zjawiska rozproszenia wstecznego w analizie stabilności kosmetyków zawierających jasmonidy, IX Poznańska Konferencja Naukowa: Chemia-nowe wyzwania dla nauki i przemysłu, 5.12.2014, Poznań.
15. **Kapuścińska, A.**, & Nowak, I. Wybrane substancje pochodzenia roślinnego jako składniki aktywne kosmetyków anti-ageing , I Poznańskie Sympozjum Młodych Naukowców, 15.11.2014, Poznań.
16. **Kapuścińska, A.**, & Nowak, I. Hormony roślinne przyszłością chemii kosmetycznej, Zielone Idee 21 wieku, 14.10.2014, Poznań.


KONFERENCJE KRAJOWE – POSTERY

1. **Kapuścińska, A.**, Gołwin, D. & Nowak, I. Badanie właściwości fizykochemicznych komercyjnego kosmetyku zawierającego jasmonidy ,57. Zjazd PTChem i SITPChem, 14-18.09.2014, Częstochowa.
2. Igielska-Kalwat, J., **Kapuścińska, A.**, & Nowak, I. Opracowanie metodyki oznaczania zawartości karotenoidów oraz stopnia ich uwalniania z formułacji kosmetycznych, 57. Zjazd PTChem i SITPChem, 14-18.09.2014, Częstochowa.
3. **Kapuścińska, A.**, Igielska-Kalwat, J. & Nowak, I. Badanie właściwości fizykochemicznych emulsji kosmetycznych, 57. Zjazd PTChem i SITPChem, 14-18.09.2014, Częstochowa.
4. **Kapuścińska, A.**, & Nowak, I. Mocznik jako substancja aktywna preparatów kosmetycznych, 57. Zjazd PTChem i SITPChem, 14-18.09.2014, Częstochowa.

SPIS ZAŁĄCZNIKÓW

1. Uchwała Komisji Bioetycznej nr 568/16,
2. Wzór pisemnej zgody probantów na udział w badaniach aplikacyjnych *in vivo*,
3. Pisemna instrukcja stosowania preparatów w czasie trwania badań aplikacyjnych *in vivo*,
4. Wzór ankiety przeprowadzonej po zakończeniu badań aplikacyjnych *in vivo*,
5. Widmo 1D ^{13}C NMR koniugatu JA-YPPF-NH₂,
6. Widmo 1D ^1H NMR koniugatu JA-YPPF-NH₂,
7. Widmo 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR koniugatu JA-YPPF-NH₂,
8. Widmo 1D ^{13}C NMR koniugatu JA-YYKS-NH₂,
9. Widmo 1D ^1H NMR koniugatu JA-YYKS-NH₂,
10. Widmo 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR koniugatu JA-YYKS-NH₂.

Załącznik 1. Uchwała Komisji Bioetycznej nr 568/16.



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 568/16

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz.480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespożywanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu niszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Hebiliską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznym z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 05 maja 2016 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu:
prof. dr hab. Izabela Nowak

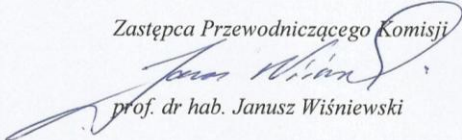
Miejsce prowadzenia badań:
**Pracownia Chemii Stosowanej,
Wydział Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**

Główny badacz: **mgr chemii, mgr kosmet. Alicja Kapuścińska**

Temat badań:
„Badanie właściwości fizykochemicznych i aplikacyjnych formułacji kosmetycznych zawierających jasmonidy wraz z oceną kinetyki ich przenikania przez bariery imitujące skórę”.

Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu zmian wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na zmianie tematu badania z „Wpływ właściwości jasmonoidów izolowanych z materiałów roślinnych oraz ich pochodnych na deskryptory aktywności i właściwości fizyko-chemiczne preparatów kosmetycznych je zawierających” na powyższy, zgodnie z Aneks nr 1 z dnia 05.05.2016r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 808/15 z dnia 03.09.2015r.

Metodyka pozostaje bez zmian.

Zastępca Przewodniczącego Komisji

prof. dr hab. Janusz Wiśniewski

Załącznik 2. Wzór pisemnej zgody probantów na udział w badaniach aplikacyjnych *in vivo*.

FORMULARZ ŚWIADOMEJ ZGODY NA UDZIAŁ W BADANIU

„Badanie właściwości fizykochemicznych i aplikacyjnych formułacji
kosmetycznych zawierających jasmonidy wraz z oceną kinetyki ich przenikania przez
bariery imitujące skórę.”
temat badania

Ja niżej podpisanaoświadczam, że zostałam poinformowana przez prowadzącą badania mgr Alicję Śliwowską o celu powyższego badania klinicznego, czasie trwania, sposobie jego przeprowadzenia, oczekiwanych korzyściach, ewentualnym ryzyku i zagrożeniach, wszelkich niedogodnościach związanych z uczestnictwem w tym badaniu oraz o moich prawach i obowiązkach .

Przeczytałam/em też i zrozumiałam treść Formularza Informacyjnego dla Probanta. Poinformowano mnie, że dodatkowe pytania dotyczące badania mogę kierować bezpośrednio do osoby prowadzącej badania i że uzyskam na nie wyczerpującą odpowiedź.

Oświadczam, że wszelki podane przeze mnie informacje są zgodne z prawdą i zapewniam, że będę informowała na bieżąco o wszelkich zmianach w stanie mojego zdrowia.

Otrzymałam do rąk własnych Formularz Informacyjny dla Probanta oraz Formularz Świadomej Zgody na udział w badaniu.

Niniejszym wyrażam pełną, świadomą i dobrowolną zgodę na udział w tym badaniu oraz na anonimowe przetwarzanie, udostępnianie i na publikację wyników moich badań, zgodnie z Ustawą o ochronie danych osobowych z dnia 29.08.1997 roku.

.....
imię i nazwisko Probanki (*drukowanymi literami*)

.....
podpis Probanki

.....
data

Oświadczenie osoby odbierającej Formularz Świadomej Zgody

Ja niżej podpisana/ly wyjaśniłam Probankce szczegóły proponowanego badania, zgodnie z opisem w Formularzu Informacyjnym dla Probanta. Zanim podjęte zostały jakiegokolwiek procedury omówiłam z Probanką jej udział w całym programie badawczym informując o celu i charakterze badania. Przekazałam do rąk własnych Probanki Formularz Informacyjny oraz Formularz Świadomej Zgody na udział w badaniu.

ALICJA ŚLIWOWSKA

imię i nazwisko badacza (*drukowanymi literami*)

.....
podpis badacza

.....
data

Załącznik 3. Pisemna instrukcja stosowania preparatów w czasie trwania badań aplikacyjnych *in vivo*.

OPIS BADAŃ

1. Jakie preparaty są stosowane w badaniach?

W badaniach stosowane są koniugaty kwasu jasmonowego oraz tetrapeptydów-tyrozyny, proliny oraz dwóch cząsteczek fenyloalaniny (koniugat JA-YPFF) oraz dwóch cząsteczek tyrozyny, lizyny oraz seryny (koniugat JA-YYKS). Podłożem dla substancji aktywnych jest żel, ponieważ charakteryzuje się on niską lepkością, a co za tym idzie, wysokim stopniem uwalniania się substancji aktywnych z podłoża do skóry (w porównaniu z tradycyjnymi emulsjami typu o/w lub w/o). W badaniach stosujemy również samą bazę żelową w celu wyeliminowania wpływu składników podłoża na wyniki pomiarów (ślepa próba).

2. Dlaczego wybrano takie koniugaty?

Związki te są opracowane przez nas w oparciu o biologiczne działanie zarówno kwasu jasmonowego, jak i samych peptydów. Firma L'Oreal opatentowała nową pochodną kwasu jasmonowego-kwas tetrahydrojasmonowy oraz jego sól sodową, obecne w takich preparatach jak Lancome Visionaire oraz Vichy Idealia. Związki te wykazują stymulują odnowę naskórka i redukują widoczne oznaki starzenia się skóry. Modyfikacja kwasu jasmonowego za pomocą wybranych peptydów ma na celu zwiększenie jego biodostępności oraz połączenie aktywności biologicznej kwasu oraz peptydów. Peptyd YPFF łagodzi podrażnienia skóry, natomiast peptyd YYKS działa nawilżająco, a jego sekwencja imituje fragment kolagenu.

3. Jakich rezultatów oczekujemy?

Po czterotygodniowej aplikacji oczekujemy wzrostu nawilżenia oraz elastyczności skóry w obszarze skóry, na którą aplikowano badane preparaty.

4. Jakie parametry badamy?

1) Pomiar stopnia nawilżenia naskórka – urządzenie Corneometer® CM 825- badanie poziomego nawilżenia warstwy rogowej naskórka. Interpretacja wyników:

Stopień nawilżenia naskórka	Wynik pomiaru
Skóra bardzo sucha	<30
Skóra sucha	30-45
Skóra dostatecznie nawilżona	>45

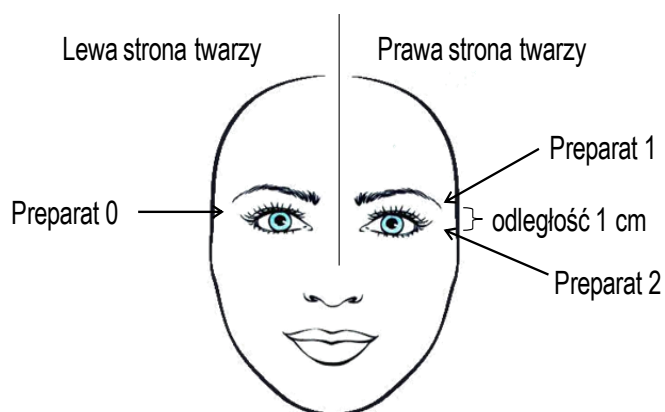
2) Pomiar transepidermalnej utraty wody (TEWL) – urządzenie TEWAMETER® TM 300. Interpretacja wyników:

Stopień nawilżenia naskórka	Wartość TEWL, g/h* m ²
Skóra bardzo zdrowa	0-10
Skóra zdrowa	10-15
Skóra normalna	15-25
Skóra w złym stanie	25-30
Skóra w stanie krytycznym	>30

3) Pomiar jędrności i elastyczności skóry-urządzenie Cutometer® MPA 580. Interpretacja wyników:

Parametr	Wynik pomiaru
R2	zdolność do redeformacji skóry (elastyczność ogólna): im bardziej wartość ta zbliża się do 1 (100%), tym bardziej elastyczna jest skóra

ZASADY APLIKACJI PREPARATÓW



Preparaty 0, 1 oraz 2 (które znajdują się w odpowiednio ponumerowanych strzykawkach) należy aplikować na „kurze łapki” w okolicy oczu (rys. powyżej):

- 1) co wieczór (w ilości 0,5 ml) przez okres 4 tygodni, wyciskając odpowiednią ilość preparatu ze strzykawki na skórę (pół jednostki/wieczór),
- 2) bez jednoczesnego stosowania innych preparatów pielęgnacyjnych w obszarze badań (nie dotyczy kosmetyków kolorowych do makijażu),
- 3) preparaty 1 oraz 2 muszą być aplikowane w odległości 1 cm, żeby zapobiec zafałszowaniu wyników.

W wypadku wystąpienia jakichkolwiek niepożądanych reakcji skórnych (wysypka, świąd, pieczenie) w obszarze badań należy niezwłocznie powiadomić osobę prowadzącą badania.

Dane kontaktowe:

Alicja Śliwowska, tel. 733-059-137, kapuscinska.alicja@gmail.com

Załącznik 4. Wzór ankiety przeprowadzonej po zakończeniu badań aplikacyjnych *in vivo*.

ANKIETA PO ZAKOŃCZENIU BADAŃ

IMIĘ I NAZWISKO PROBANTA _____

1. Czy w trakcie badań stosowała Pani Preparaty 0, 1 oraz 2?

tak nie

2. Czy w trakcie badań korzystała Pani z innych zabiegów pielęgnacyjnych, które mogłyby mieć ewentualny wpływ na wyniki badań?

tak nie

Jeżeli tak, proszę wymienić, jakie zabiegi były wykonywane: _____

3. Czy w trakcie badań korzystała Pani z innych preparatów kosmetycznych, które mogłyby mieć ewentualny wpływ na wyniki badań?

tak nie

4. Czy udział w badaniu przyniósł oczekiwane rezultaty?

tak nie

5. Proszę subiektywnie ocenić efekt nawilżający stosowanych preparatów:

Preparat 0:

<input type="checkbox"/> 0 - pogorszenie	<input type="checkbox"/> 1 – brak poprawy
<input type="checkbox"/> 2 – minimalna poprawa	<input type="checkbox"/> 3 – zdecydowana poprawa

Preparat 1:

<input type="checkbox"/> 0 - pogorszenie	<input type="checkbox"/> 1 – brak poprawy
<input type="checkbox"/> 2 – minimalna poprawa	<input type="checkbox"/> 3 – zdecydowana poprawa

Preparat 2:

<input type="checkbox"/> 0 - pogorszenie	<input type="checkbox"/> 1 – brak poprawy
<input type="checkbox"/> 2 – minimalna poprawa	<input type="checkbox"/> 3 – zdecydowana poprawa

6. Proszę subiektywnie ocenić efekt zwiększania elastyczności naskórka przez stosowane preparaty:

Preparat 0:

<input type="checkbox"/> 0 - pogorszenie	<input type="checkbox"/> 1 – brak poprawy
<input type="checkbox"/> 2 – minimalna poprawa	<input type="checkbox"/> 3 – zdecydowana poprawa

Preparat 1:

<input type="checkbox"/> 0 - pogorszenie	<input type="checkbox"/> 1 – brak poprawy
<input type="checkbox"/> 2 – minimalna poprawa	<input type="checkbox"/> 3 – zdecydowana poprawa

Preparat 2:

<input type="checkbox"/> 0 - pogorszenie	<input type="checkbox"/> 1 – brak poprawy
<input type="checkbox"/> 2 – minimalna poprawa	<input type="checkbox"/> 3 – zdecydowana poprawa
<input type="checkbox"/> 2 – minimalna poprawa	<input type="checkbox"/> 3 – zdecydowana poprawa

7. Czy podczas stosowania preparatów pojawiły się podrażnienia skóry typu:

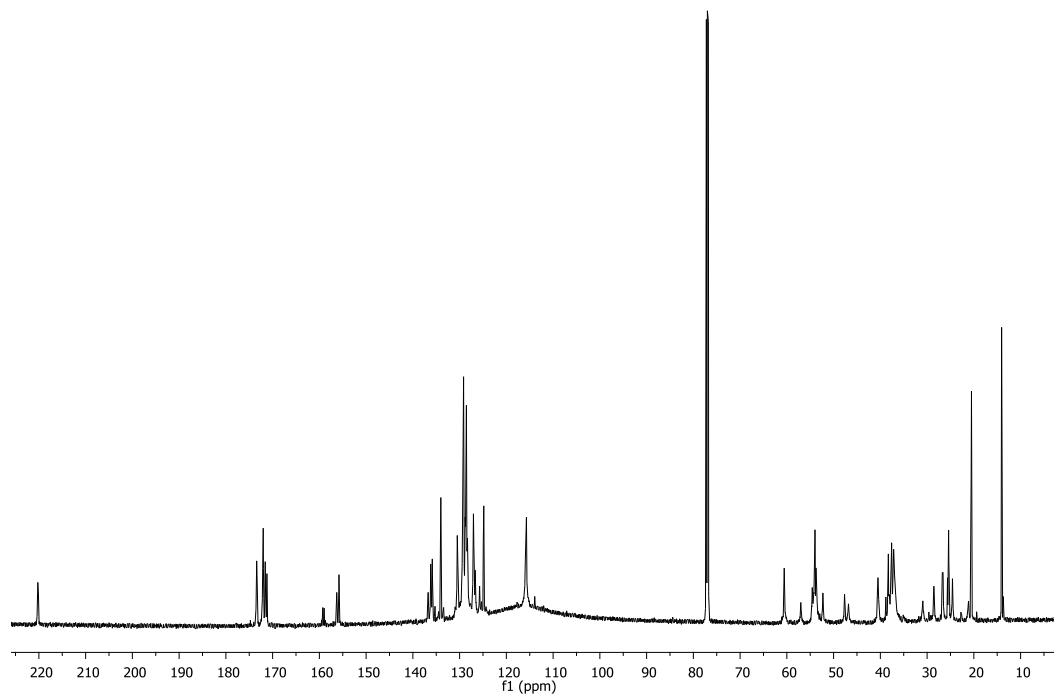
1) rumień <input type="checkbox"/> tak <input type="checkbox"/> nie	2) wysypka <input type="checkbox"/> tak <input type="checkbox"/> nie
3) świąd <input type="checkbox"/> tak <input type="checkbox"/> nie	4) obrzęk <input type="checkbox"/> tak <input type="checkbox"/> nie

8. Czy poleciłaby Pani stosowane preparaty?

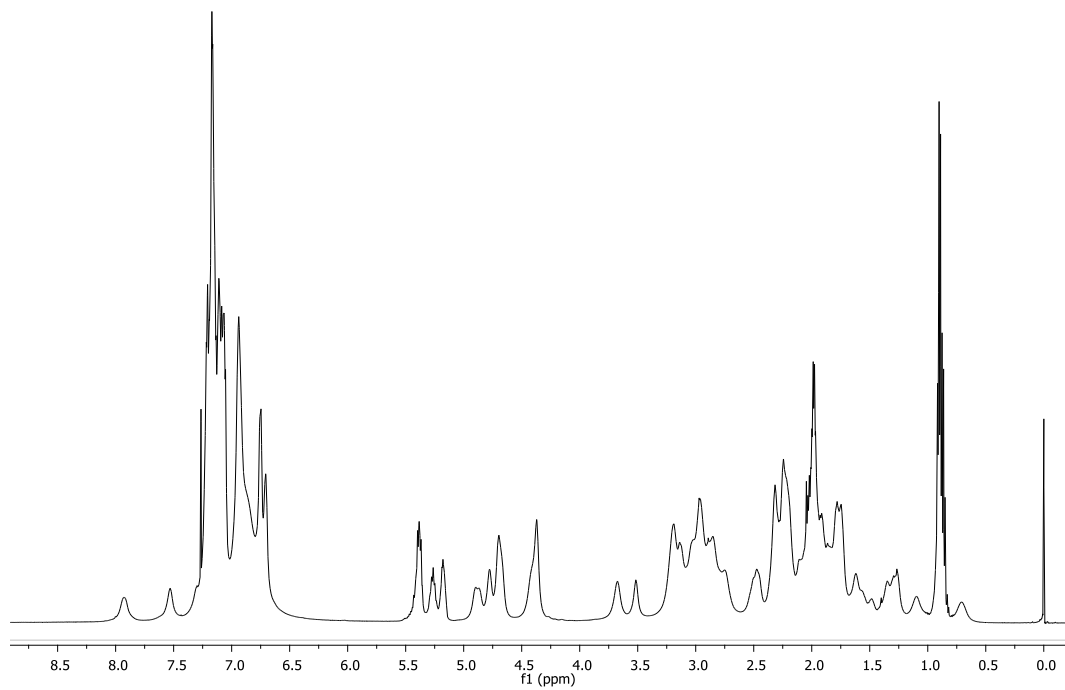
tak nie

Dziękuję za udział w ankiecie

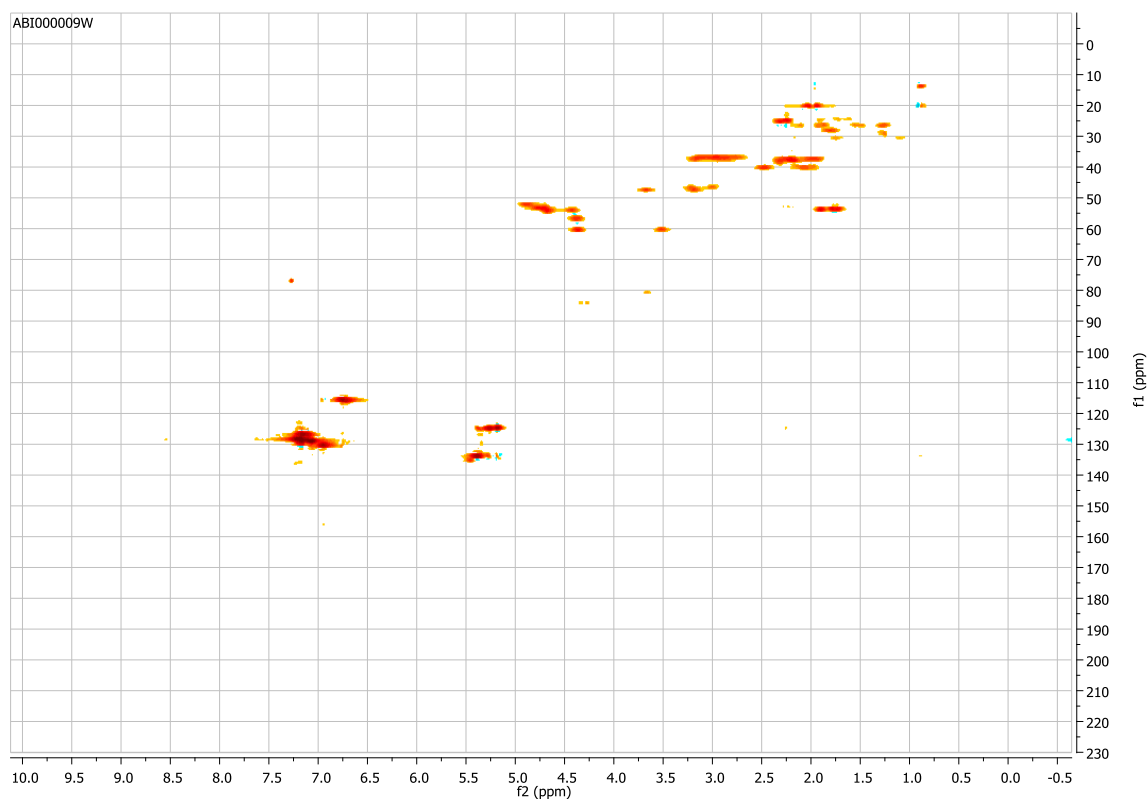
Załącznik 5. Widmo 1D ^{13}C NMR koniugatu JA-YPFF-NH₂,



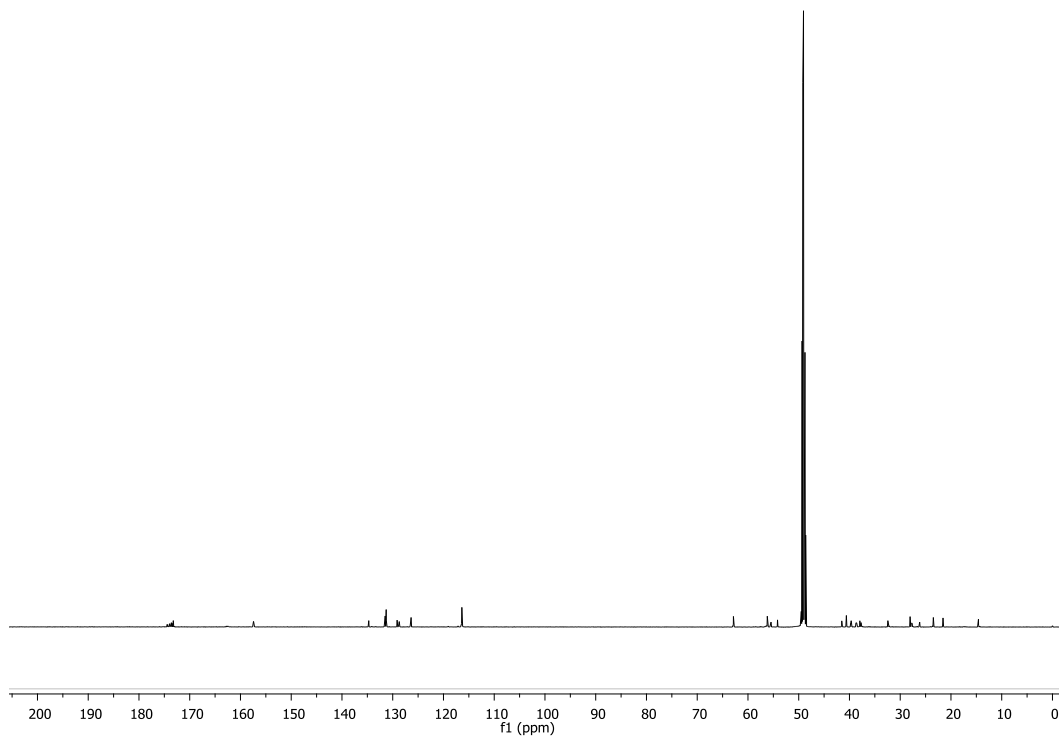
Załącznik 6. Widmo 1D ^1H NMR koniugatu JA-YPFF-NH₂.



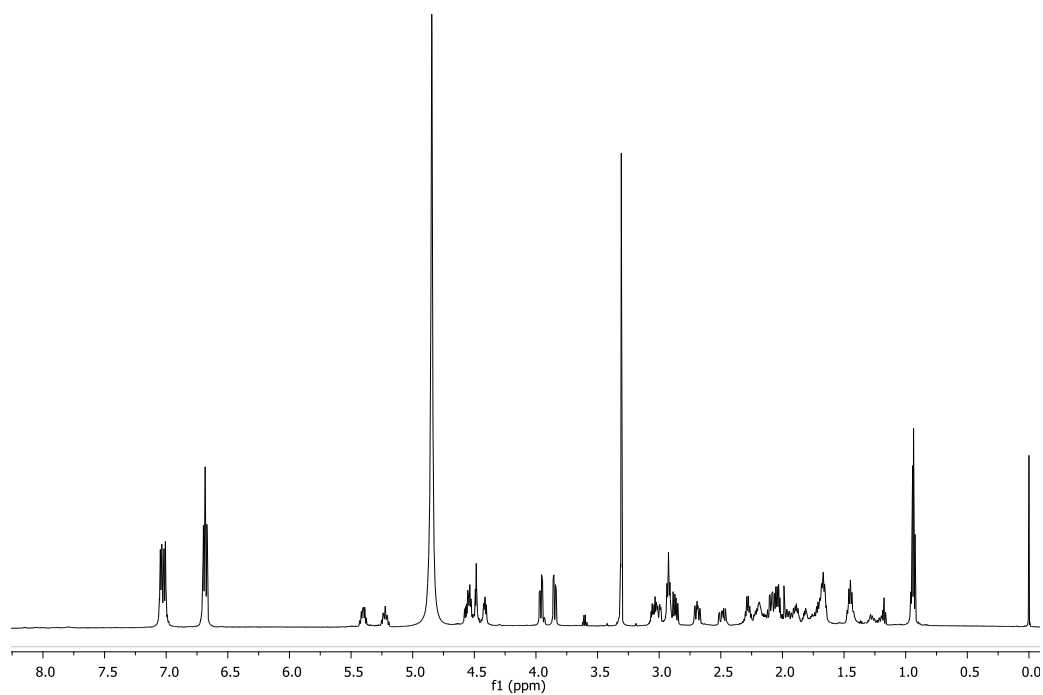
Załącznik 7. Widmo 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR koniugatu JA-YPPF-NH₂,



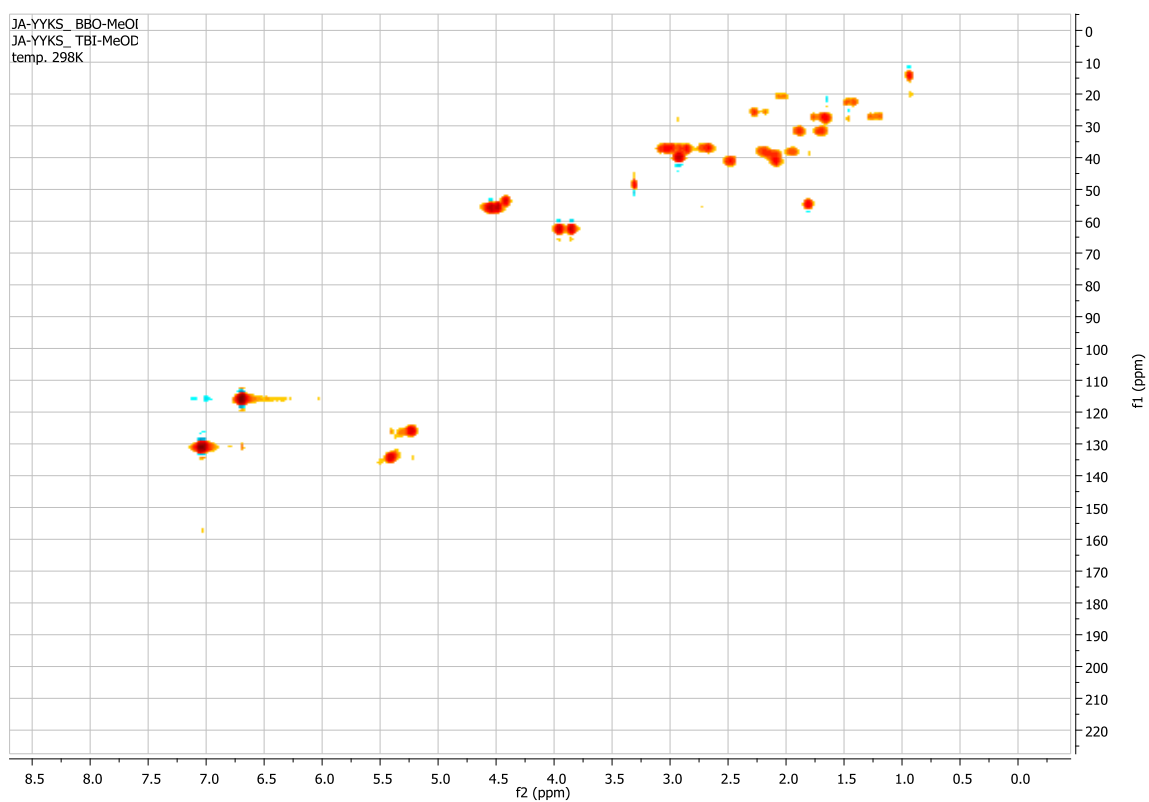
Załącznik 8. Widmo 1D ^{13}C NMR koniugatu JA-YYKS-NH₂.



Załącznik 9. Widmo 1D ^1H NMR koniugatu JA-YYKS-NH₂.



Załącznik 10. Widmo 2D ^1H - ^{13}C HSQC NMR koniugatu JA-YYKS-NH₂.



LITERATURA

- [1]. Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., & Maibach, H. I. (2013). Characteristics of the aging skin. *Advances in wound care*, 2(1), 5-10.
- [2]. Longo, C., Casari, A., Beretti, F., Cesinaro, A. M., & Pellacani, G. (2013). Skin aging: in vivo microscopic assessment of epidermal and dermal changes by means of confocal microscopy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 68(3), 73-82.
- [3]. Califf, R. M., McCall, J., & Mark, D. B. (2017). Cosmetics, Regulations, and the Public Health: Understanding the Safety of Medical and Other Products. *JAMA Internal Medicine*.
- [4]. Kwa, M., Welty, L. J., & Xu, S. (2017). Adverse events reported to the US Food and Drug Administration for cosmetics and personal care products. *JAMA Internal Medicine*, 177(8), 1202-1204.
- [5]. Pfuhrer, S., Fautz, R., Ouedraogo, G., Latil, A., Kenny, J., Moore, C., & Barroso, J. (2014). The Cosmetics Europe strategy for animal-free genotoxicity testing: project status up-date. *Toxicology in Vitro*, 28(1), 18-23.
- [6]. Doktorova, T. Y., Ates, G., Vinken, M., Vanhaecke, T., & Rogiers, V. (2014). Way forward in case of a false positive in vitro genotoxicity result for a cosmetic substance?. *Toxicology in Vitro*, 28(1), 54-59.
- [7]. Kligman, D. (2000). Cosmeceuticals. *Dermatologic clinics*, 18(4), 609-615.
- [8]. Oracz, K., & Karpiński, S. (2016). Phytohormones signaling pathways and ROS involvement in seed germination. *Frontiers in plant science*, 7.
- [9]. Boulle, C., Dalko, M., Leveque, J., Simonetti, L. Compositions comprising jasmonic acid derivatives and use of these derivatives. US8603502 B2. Data publikacji: 10.12.2013.
- [10]. Kermorvan, C., Szeszak, M. Cosmetic composition comprising a jasmonic acid compound. US20120322876 A1. Data publikacji: 20.12.2012.
- [11]. Fagot, D. Use of jasmonic acid derivative as a soothing agent. WO2011010075 A1. Data publikacji: 27.01.2011.
- [12]. Ressler, S., Bartkova, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharffetter-Kochanek, K., Jansen-Dürr, P., Wlaschek, M. (2006). p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell*, 5(5), 379-389.
- [13]. Prokopowicz, M., & Różycki, K. M. (2017). Innovation in cosmetics. *World Scientific News*, 72, 448-456.
- [14]. Godwin, A., Hartenstein, M., Müller, A. H., & Brocchini, S. (2001). Narrow molecular weight distribution precursors for polymer–drug conjugates. *Angewandte Chemie*, 113(3), 614-617.
- [15]. Proksch, E., Brandner, J. M., Jensen, J. M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology*, 17(12), 1063-1072.
- [16]. Asamura, N., Yokoyama, N., Shinoda, H. (1999). A method of selective stimulation to epidermal skin receptors for realistic touch feedback. In *Virtual Reality. Proceedings, IEEE*, 274-281.
- [17]. Charkoudian, N. (2003). Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. In *Mayo Clinic Proceedings Elsevier*, 78(5), 603-612.
- [18]. Strona internetowa z darmową grafiką, www.pacmanfull.com (dostęp 13.02.2016).
- [19]. McGrath, J. A., Uitto, J. (2010). Anatomy and organization of human skin. *Rook's Textbook of Dermatology*, 8, 1-53.
- [20]. Halprin, K. M. (1972). Epidermal "Turnover Time"—A Re-Examination. *British Journal of Dermatology*, 86(1), 14-19.
- [21]. Jones, B. F. (1998). A reappraisal of the use of infrared thermal image analysis in medicine. *IEEE Transactions on medical imaging*, 17(6), 1019-1027.
- [22]. Jablonski, N. G., Chaplin, G. (2000). The evolution of human skin coloration. *Journal of human evolution*, 39(1), 57-106.
- [23]. Brody, I. (1959). An ultrastructural study on the role of the keratohyalin granules in the keratinization process. *Journal of ultrastructure research*, 3(1), 84-104.
- [24]. Grubauer, G., Elias, P. M., Feingold, K. R. (1989). Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. *Journal of Lipid Research*, 30(3), 323-333.
- [25]. Welzel, J., Lankenau, E., Birngruber, R., Engelhardt, R. (1997). Optical coherence tomography of the human skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 37(6), 958-963.
- [26]. Choi, M. J., Maibach, H. I. (2005). Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *American journal of clinical dermatology*, 6(4), 215-223.
- [27]. Lawton, S. (2007). Skin barrier function and the use of emollients in dermatological nursing. *British journal of nursing*, 16(12), 24-39.
- [28]. Strona internetowa z darmową grafiką, www.imageresize.club (dostęp 19.02.2017).
- [29]. Goldring, S. R., Stephenson, M. L., Downie, E., Krane, S. M., Korn, J. H. (1990). Heterogeneity in hormone responses and patterns of collagen synthesis in cloned dermal fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation*, 85(3), 798.
- [30]. Epstein, E. H., Munderloh, N. H. (1978). Human skin collagen. Presence of type I and type III at all levels of the dermis. *Journal of Biological Chemistry*, 253(5), 1336-1337.

- [31]. Welzel, J. (2001). Optical coherence tomography in dermatology: a review. *Skin Research and Technology*, 7(1), 1-9.
- [32]. Scheuplein, R. J. (1967). Mechanism of Percutaneous Absorption: II. Transient Diffusion and the Relative Importance of Various Routes of Skin Penetration** From the Research Laboratories of the Department of Dermatology of the Harvard Medical School at the Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02114. *Journal of Investigative Dermatology*, 48(1), 79-88.
- [33]. Wester, R. C., & Maibach, H. I. (1983). Cutaneous pharmacokinetics: 10 steps to percutaneous absorption. *Drug Metabolism Reviews*, 14(2), 169-205.
- [34]. Malinowska, M., Sikora, E., & Ogonowski, J. (2013). Transport przez naskórkowy aktywnych składników kosmetycznych. *Wiadomości chemiczne*, 67, 3-4, 67, 321-344.
- [35]. Jaworska, M., Sikora, E., Ogonowski, J. (2011). Czynniki wpływające na penetrację składników aktywnych przez skórę. *Wiadomości Chemiczne*, 65 (3-4), 301-320.
- [36]. Bos, J. D., & Meinardi, M. M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental dermatology*, 9(3), 165-169.
- [37]. Duell, E. A., Kang, S., & Voorhess, J. J. (1997). Unoccluded retinol penetrates human skin in vivo more effectively than unoccluded retinyl palmitate or retinoic acid. *Journal of investigative dermatology*, 109(3), 301-305.
- [38]. Kerscher, M., Bayrhammer, J., & Reuther, T. (2008). Rejuvenating influence of a stabilized hyaluronic acid-based gel of nonanimal origin on facial skin aging. *Dermatologic Surgery*, 34(5), 720-726.
- [39]. Chen, Y., Shen, Y., Guo, X., Zhang, C., Yang, W., Ma, M., ... & Wen, L. P. (2006). Transdermal protein delivery by a coadministered peptide identified via phage display. *Nature biotechnology*, 24(4), 455-460.
- [40]. Jafvert, C. T., & Kulkarni, P. P. (2008). Buckminsterfullerene's (C60) octanol- water partition coefficient (K_{ow}) and aqueous solubility. *Environmental science & technology*, 42(16), 5945-5950.
- [41]. Meylan, W. M., Howard, P. H., Boethling, R. S., Aronson, D., Printup, H., & Gouchie, S. (1999). Improved method for estimating bioconcentration/bioaccumulation factor from octanol/water partition coefficient. *Environmental toxicology and chemistry*, 18(4), 664-672.
- [42]. Tayar, N. E., Tsai, R. S., Testa, B., Carrupt, P. A., Hansch, C., & Leo, A. (1991). Percutaneous penetration of drugs: A quantitative structure-permeability relationship study. *Journal of pharmaceutical sciences*, 80(8), 744-749.
- [43]. Phillips, C. A., & Michniak, B. B. (1995). Transdermal delivery of drugs with differing lipophilicities using azone analogs as dermal penetration enhancers. *Journal of pharmaceutical sciences*, 84(12), 1427-1433.
- [44]. Moriguchi, I., Hirono, S., Nakagome, I., & Hirano, H. (1994). Comparison of reliability of log P values for drugs calculated by several methods. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 42(4), 976-978.
- [45]. Moser, K., Kriwet, K., Naik, A., Kalia, Y. N., & Guy, R. H. (2001). Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European journal of pharmaceuticals and Biopharmaceutics*, 52(2), 103-112.
- [46]. Tas, C., Özkan, Y., Savaser, A., & Baykara, T. (2003). In vitro release studies of chlorpheniramine maleate from gels prepared by different cellulose derivatives. *Il Farmaco*, 58(8), 605-611.
- [47]. Maru, S.M., Gathu, L.W., Mathenge, A.W., Okaru, A.O., Kamau, F.N., Chepkwony, H.K. (2012). In Vitro Drug Release Studies to Compare the Release of Metronidazole Topical Formulations Through Cellulose Membrane. *East And Central African Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(3):57-62.
- [48]. El Gendy, A. M., Jun, H. W., & Kassem, A. A. (2002). In vitro release studies of flurbiprofen from different topical formulations. *Drug development and industrial pharmacy*, 28(7), 823-831.
- [49]. Sinha, V. R., & Kaur, M. P. (2000). Permeation enhancers for transdermal drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy*, 26(11), 1131-1140.
- [50]. Williams, A. C., & Barry, B. W. (2012). Penetration enhancers. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 128-137.
- [51]. Pathan, I. B., & Setty, C. M. (2009). Chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery systems. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8(2).
- [52]. Karakatsani, M., Dedhiya, M., & Plakogiannis, F. M. (2010). The effect of permeation enhancers on the viscosity and the release profile of transdermal hydroxypropyl methylcellulose gel formulations containing diltiazem HCl. *Drug development and industrial pharmacy*, 36(10), 1195-1206.
- [53]. Larese, F. F., D'Agostin, F., Crosera, M., Adami, G., Renzi, N., Bovenzi, M., & Maina, G. (2009). Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*, 255(1), 33-37.
- [54]. Abraham, M. H., Chadha, H. S., & Mitchell, R. C. (1995). The factors that influence skin penetration of solutes. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 47(1), 8-16.
- [55]. Choi, E. H., Lee, S. H., Ahn, S. K., & Hwang, S. M. (1999). The pretreatment effect of chemical skin penetration enhancers in transdermal drug delivery using iontophoresis. *Skin Pharmacology and Physiology*, 12(6), 326-335.
- [56]. Ryatt, K. S., Mobayen, M., Stevenson, J. M., Maibach, H. I., & Guy, R. H. (1988). Methodology to measure the transient effect of occlusion on skin penetration and stratum corneum hydration in vivo. *British Journal of Dermatology*, 119(3), 307-312.
- [57]. Barry, B. W. (2002). Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Advanced drug delivery reviews*, 54, S31-S40.

- [58]. Benson, H. A. (2005). Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Current drug delivery*, 2(1), 23-33.
- [59]. Knorr, F., Lademann, J., Patzelt, A., Sterry, W., Blume-Peytavi, U., & Vogt, A. (2009). Follicular transport route—research progress and future perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(2), 173-180.
- [60]. Strona internetowa www.emaze.com (dostęp 13.05.2017).
- [61]. Zegarska, B., Woźniak, M. (2006). Przyczyny wewnątrzpochodnego starzenia się skóry. *Gerontologia Polska*, 4(14), 153-159.
- [62]. Puizina-Ivic, N. (2008). Skin aging. *Acta Dermatovenerologica Alpina Panonica Et Adriatica*, 17(2), 47-54.
- [63]. Krötz, F., Sohn, H. Y., Pohl, U. (2004). Reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(11), 1988-1996.
- [64]. Green, D. R., Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309-1312.
- [65]. Simon, H. U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5(5), 415-418.
- [66]. Liu, J., Wang, X., Shigenaga, M. K., Yeo, H. C., Mori, A., Ames, B. N. (1996). Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *The FASEB Journal*, 10(13), 1532-1538.
- [67]. Herrling, T., Jung, K., Fuchs, J. (2006). Measurements of UV-generated free radicals/reactive oxygen species (ROS) in skin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 63(4), 840-845.
- [68]. Anglada, J. M., Martins-Costa, M., Francisco, J. S., Ruiz-López, M. F. (2015). Interconnection of reactive oxygen species chemistry across the interfaces of atmospheric, environmental, and biological processes. *Accounts of Chemical Research*, 48(3), 575-583.
- [69]. Kusumawati, I., Indrayanto, G. (2013). Natural antioxidants in cosmetics. *Studies in Natural Products Chemistry*, 40, 485-505.
- [70]. Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., Voorhees, J. J. (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of Dermatology*, 138(11), 1462-1470.
- [71]. Berneburg, M., Plettenberg, H., Krutmann, J. (2000). Photoaging of human skin. *Photodermatology, photoimmunology photomedicine*, 16(6), 239-244.
- [72]. Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Brenneisen, P., Schauen, M., Blandschun, R., Wenk, J. (1997). UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biological Chemistry*, 378(11), 1247-1258.
- [73]. Gonzaga, E. R. (2009). Role of UV light in photodamage, skin aging, and skin cancer. *American Journal of Clinical Dermatology*, 10(1), 19-24.
- [74]. Rok, J., Otręba, M., Buszman, E., Wrześniok, D. (2012). Melanina—z melanocytu do keratynocytu, czyli jak przebiega transport melaniny w skórze. *Annales Academiae Medicae Silesiensis*, 66(1), 61-66.
- [75]. Himmi, T., Brahiti, F., Perrin, J., Orsini, J. C. (1993). Sensitivity of lateral hypothalamic neurons to nicotine: origin and possible correlation with nutritional effects of nicotine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44(1), 217-220.
- [76]. Morita, A., Torii, K., Maeda, A., Yamaguchi, Y. (2009). Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 14(1), 53-55.
- [77]. Gniadecka, M., Jemec, G. B. E. (1998). Quantitative evaluation of chronological ageing and photoageing in vivo: studies on skin echogenicity and thickness. *British Journal of Dermatology*, 139, 815-821.
- [78]. Makrantonaki, E., Zouboulis, C. C. (2007). Molecular mechanisms of skin aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1119(1), 40-50.
- [79]. Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614-636.
- [80]. Hayflick, L. (1985). Theories of biological aging. *Experimental Gerontology*, 20(3), 145-159.
- [81]. Gilchrist, B. A. (2003). Skin aging 2003: recent advances and current concepts. *Cutis*, 72(3), 5-10.
- [82]. Widmer, R., Ziaja, I., Grune, T. (2006). Protein oxidation and degradation during aging: role in skin aging and neurodegeneration. *Free Radical Research*, 40(12), 1259-1268.
- [83]. Crouch, S. P. M., Kozłowski, R., Slater, K. J., Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 160(1), 81-88.
- [84]. Miquel, J. (1992). An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutation Research/DNAging*, 275(3-6), 209-216.
- [85]. Berneburg, M., Gremmel, T., Kürten, V., Schroeder, P., Hertel, I., Von Mikecz, A., ... Ruzicka, T. (2005). Creatine supplementation normalizes mutagenesis of mitochondrial DNA as well as functional consequences. *Journal of General Internal Medicine*, 20(5), 213-220.
- [86]. Hulbert, A. J. (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *Journal of Theoretical Biology*, 234(2), 277-288.
- [87]. Zouboulis, C. C., Makrantonaki, E. (2011). Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clinics in Dermatology*, 29(1), 3-14.
- [88]. Obermeyer, C. M. (2000). Menopause across cultures: a review of the evidence. *Menopause*, 7(3), 184-192.

- [89]. Kapuścińska, A., Nowak, I. (2015). Zastosowanie fitoestrogenów w kosmetykach przeciw starzeniu się skóry. *Chemik*, 69(3), 154-159.
- [90]. Kurban, R. S., & Bhawan, J. (1990). Histologic changes in skin associated with aging. *The Journal of dermatologic surgery and oncology*, 16(10), 908-914.
- [91]. Carruthers, A., Carruthers, J., Hardas, B., Kaur, M., Goertelmeyer, R., Jones, D., Maas, C. (2008). A validated grading scale for crow's feet. *Dermatologic Surgery*, 34(2), 173-178.
- [92]. Bhawan, J., Andersen, W., Lee, J., Labadie, R., Solares, G. (1995). Photoaging versus intrinsic aging: a morphologic assessment of facial skin. *Journal of Cutaneous Pathology*, 22(2), 154-159.
- [93]. Hashizume, H. (2004). Skin aging and dry skin. *The Journal of Dermatology*, 31(8), 603-609.
- [94]. Bosset, S., Barré, P., Chalon, A., Kurfurst, R., Bonté, F., André, P., ... & Nicolas, J. F. (2001). Skin ageing: clinical and histopathologic study of permanent and reducible wrinkles. *European journal of dermatology: EJD*, 12(3), 247-252.
- [95]. Warren, R., Gartstein, V., Kligman, A. M., Montagna, W., Allendorf, R. A., & Ridder, G. M. (1991). Age, sunlight, and facial skin: a histologic and quantitative study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 25(5), 751-760.
- [96]. Oficjalna strona internetowa firmy Beiersdorf, www.beiersdorf.com, (dostęp 19.02.2017).
- [97]. Lovell, C. R., Smolenski, K. A., Duance, V. C., Light, N. D., Young, S., Dyson, M. (1987). Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. *British Journal of Dermatology*, 117(4), 419-428.
- [98]. Marrakchi, S., Maibach, H. I. (2007). Biophysical parameters of skin: map of human face, regional, and age-related differences. *Contact Dermatitis*, 57(1), 28-34.
- [99]. Israelachvili, J. (1994). The science and applications of emulsions—an overview. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 91, 1-8.
- [100]. Marzec, A. (2009). *Chemia Kosmetyków*, wyd. III, Dom Organizatora, Toruń, 102-105.
- [101]. Arct, J., Pytkowska, K. (2000). Emulsje kosmetyczne. *Wiadomości PTK*, 3(2/3), 12-16.
- [102]. Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A. Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft matter*, 12(11), 2826-2841.
- [103]. Eastoe, J. (2010). Microemulsions in: Cosgrove T., (Ed.), "Colloid science: principles, methods and applications", second ed., John Wiley Sons Ltd, Chichester, 91- 117.
- [104]. Morrison, I. (2008) Emulsion Technology Dispersions in liquids: suspensions, emulsions, and foams. ACS National Meeting, April 9 – 10, 2008, New Orleans.
- [105]. Saito, H., Shinoda, K. (1970). The stability of W/O type emulsions as a function of temperature and of the hydrophilic chain length of the emulsifier. *Journal of Colloid and Interface Science*, 32(4), 647-651.
- [106]. Swift, D. L., Friedlander, S. (1964). The coagulation of hydrosols by Brownian motion and laminar shear flow. *Journal of colloid science*, 19(7), 621-647.
- [107]. Levine, S., Bowen, B. D., Partridge, S. J. (1989). Stabilization of emulsions by fine particles II. capillary and van der Waals forces between particles. *Colloids and surfaces*, 38(2), 345-364.
- [108]. Voorhees, P. W. (1985). The theory of Ostwald ripening. *Journal of Statistical Physics*, 38(1), 231-252.
- [109]. Marqusee, J. A., & Ross, J. (1984). Theory of Ostwald ripening: Competitive growth and its dependence on volume fraction. *The Journal of chemical physics*, 80(1), 536-543.
- [110]. Robins, M. M. (2000). Emulsions—creaming phenomena. *Current opinion in colloid interface science*, 5(5), 265-272.
- [111]. Brujić, J., Song, C., Wang, P., Briscoe, C., Marty, G., Makse, H. A. (2007). Measuring the coordination number and entropy of a 3d jammed emulsion packing by confocal microscopy. *Physical review letters*, 98(24), 248001.
- [112]. Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., Mao, L. (2008). Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*, 41(1), 61-68.
- [113]. Hailing, P. J., & Walstra, P. (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 15(2), 155-203.
- [114]. Dickinson, E. (1997). Properties of emulsions stabilized with milk proteins: overview of some recent developments. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2607-2619.
- [115]. Emulsje kosmetyczne - Metody badań - Postanowienia ogólne i zakres normy BN-77/6140-01.
- [116]. Poyato, C., Thomsen, B. R., Hermund, D. B., Ansorena, D., Astiasarán, I., Jónsdóttir, R., Jacobsen, C. (2016). Antioxidant effect of water and acetone extracts of *Fucus vesiculosus* on oxidative stability of skin care emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(3), 27-42.
- [117]. Abismail, B., Canselier, J. P., Wilhelm, A. M., Delmas, H., & Gourdon, C. (1999). Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 6(1), 75-83.
- [118]. Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. (2007). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 19(7), 079001.
- [119]. McClements, D. J. (2002). Colloidal basis of emulsion color. *Current opinion in colloid & interface science*, 7(5), 451-455.

- [120]. Strona nternetowa zawierająca Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego, www.eur-lex.europa.eu (dostęp 12.05.2017).
- [121]. Strona internetowa zawierająca Dziennik Ustaw, www.dziennikustaw.gov.pl (dostęp 12.05.2017).
- [122]. Lira, K. H., Smith, D. H. (1990). Electrical conductivities of concentrated emulsions and their fit by conductivity models. *Journal of Dispersion Science Andtechnology*, 11(5), 529-545.
- [123]Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H., & Finkel, P. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International journal of cosmetic science*, 28(5), 359-370.
- [124]. Kjeldstad, B., Johnsson, A., Sandberg, S. (1984). Influence of pH on porphyrin production in *Propionibacterium acnes*. *Archives of dermatological research*, 276(6), 396-400.
- [125]. Kapuścińska, A., Nowak, I. (2015). Zastosowanie kwasów organicznych w terapii trądziku i przebarwień skóry. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (online), 69, 374-383.
- [126]. Gallegos, C., Franco, J. M. (1999). Rheology of food, cosmetics and pharmaceuticals. *Current opinion in colloid interface science*, 4(4), 288-293.
- [127]. Deeble, A. (2004). Study of hyaluronan degradation by means of rotational viscometry: Contribution of the material of viscometer. *Chem. Pap*, 58(5), 348-352.
- [128]. Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2). International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, www.ich.org, (dostęp 08.08.2017).
- [129]. ISO 13097:2013(en) Guidelines for the characterization of dispersion stability, www.iso.org, (dostęp 08.08.2017).
- [130]. Surh, J., Vladislavjević, G. T., Mun, S., & McClements, D. J. (2007). Preparation and characterization of water/oil and water/oil/water emulsions containing biopolymer-gelled water droplets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(1), 175-184.
- [131]. Tadros, T.F. (Ed). (2013) *Emulsion Formation, Stability, and Rheology*. In "Emulsion Formation and Stability", first ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, Weinheim, Germany, 1-75
- [132]. Guaratini, T., Gianeti, M. D., & Campos, P. M. (2006). Stability of cosmetic formulations containing esters of Vitamins E and A: chemical and physical aspects. *International journal of pharmaceutics*, 327(1), 12-16.
- [133]. Iuga, C., Bojita, M., & Leucuta, S. E. (2009). Development of a validated RP-HPLC method for separation and determination of process-related impurities of omeprazole in bulk drugs. *Farmacia*, 57(5), 534-541.
- [134]. Bilia, A. R., Bergonzi, M. C., Mazzi, G., & Vincieri, F. F. (2006). Development and stability of semisolid preparations based on a supercritical CO₂ Arnica extract. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(2), 449-454.
- [135]. Olejnik, A., Schroeder, G., & Nowak, I. (2015). The tetrapeptide N-acetyl-Pro-Pro-Tyr-Leu in skin care formulations—Physicochemical and release studies. *International journal of pharmaceutics*, 492(1), 161-168. Instrukcja Obsługi Aparatu Turbiscan Lab Expert, www.formulation.com, (dostęp 15.01.2017).
- [137]. Bru, P., Brunel, L., Buron, H., Cayré, I., Ducarre, X., Fraux, A., & Snabre, P. (2004). Particle size and rapid stability analyses of concentrated dispersions: use of multiple light scattering technique.
- [138]. Coupland, J. N., McClements, D. J. (2001). Droplet size determination in food emulsions: comparison of ultrasonic and light scattering methods. *Journal of Food Engineering*, 50(2), 117-120.
- [139]. Eshel, G., Levy, G. J., Mingelgrin, U., & Singer, M. J. (2004). Critical evaluation of the use of laser diffraction for particle-size distribution analysis. *Soil Science Society of America Journal*, 68(3), 736-743.
- [140]. ISO 13320:2009(en). Particle size analysis -- Laser diffraction methods, www.iso.org, (dostęp 08.08.2017).
- [141]. Huang, X., Kakuda, Y., Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, 15(4), 533-542.
- [142]. Binks, B. P., Lumsdon, S. O. (2001). Pickering emulsions stabilized by monodisperse latex particles: effects of particle size. *Langmuir*, 17(15), 4540-4547.
- [143]. Rapid refractive index determination for pharmaceutical actives 2004 Malvern Instruments application note MRK529, Malvern Instruments, Wielka Brytania.
- [144] Szczepaniak, W.(2008). *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*. Wydawnictwo naukowe PWN, Wyd. 5. Warszawa, 373-375.
- [145]. Balcerowiak, W., Wasilewski, J., Latocha, C. (1980). Thermoanalytical investigation of mixtures containing oxalic acid, sodium hydrogen oxalate and sodium oxalate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 18(1), 57-63.
- [146]. Keng, P. S., Basri, M., Zakaria, M. R. S., Rahman, M. A., Ariff, A. B., Rahman, R. A., Salleh, A. B. (2009). Newly synthesized palm esters for cosmetics industry. *Industrial crops and products*, 29(1), 37-44.
- [147]. Dz.U.2013.0.475 t.j. - Ustawa z dnia 30 marca 2001 r. o kosmetykach.
- [148]. Lintner, K., Mas-Chamberlin, C., Mondon, P., Peschard, O., Lamy, L. (2009). Cosmeceuticals and active ingredients. *Clinics in dermatology*, 27(5), 461-468.
- [149]. Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., Gemeiner, P. (2007). Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology letters*, 29(1), 17-25.

- [150]. Weindl, G., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., Korting, H. C. (2004). Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: molecular biological, pharmaceutical and clinical aspects. *Skin Pharmacology and Physiology*, 17(5), 207-213.
- [151]. Chrit, L., Bastien, P., Sockalingum, G. D., Batisse, D., Leroy, F., Manfait, M., Hadjur, C. (2006). An in vivo randomized study of human skin moisturization by a new confocal Raman fiber-optic microprobe: assessment of a glycerol-based hydration cream. *Skin pharmacology and physiology*, 19(4), 207-215.
- [152]. Lodén, M., Wessman, W. (2001). The influence of a cream containing 20% glycerin and its vehicle on skin barrier properties. *International journal of cosmetic science*, 23(2), 115-119.
- [153]. Stettler, H., Kurka, P., Lunau, N., Manger, C., Böhlting, A., Bielfeldt, S., Lenz, H. (2016). A new topical panthenol-containing emollient: Results from two randomized controlled studies assessing its skin moisturization and barrier restoration potential, and the effect on skin microflora. *Journal of Dermatological Treatment*, 1-8.
- [154]. Schoelermann, A. M., Jung, K. A., Buck, B., Gröniger, E., Conzelmann, S. (2016). Comparison of skin calming effects of cosmetic products containing 4-t-butylcyclohexanol or acetyl dipeptide-1 cetyl ester on capsaicin-induced facial stinging in volunteers with sensitive skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 30(1), 18-20.
- [155]. Kole, P. L., Jadhav, H. R., Thakurdesai, P., Nagappa, A. N. (2005). Cosmetic potential of herbal extracts.
- [156]. Chavan, M. J., Wakte, P. S., Shinde, D. B. (2012). Analgesic and anti-inflammatory activities of the sesquiterpene fraction from *Annona reticulata* L. bark. *Natural product research*, 26(16), 1515-1518.
- [157]. Li, J., Chaytor, J. L., Findlay, B., McMullen, L. M., Smith, D. C., Vederas, J. C. (2015). Identification of didecylidimethylammonium salts and salicylic acid as antimicrobial compounds in commercial fermented radish kimchi. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(11), 3053-3058.
- [158]. Sahoo, J., Paidesetty, S. K. (2015). Antimicrobial, analgesic, antioxidant and in silico study of synthesized salicylic acid congeners and their structural interpretation. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(4), 268-280.
- [159]. Xie, Y., He, Y., Irwin, P. L., Jin, T., Shi, X. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and environmental microbiology*, 77(7), 2325-2331.
- [160]. Yamamoto, O., Komatsu, M., Sawai, J., Nakagawa, Z. E. (2004). Effect of lattice constant of zinc oxide on antibacterial characteristics. *Journal of materials science: materials in medicine*, 15(8), 847-851.
- [161]. Erbil, H., Sezer, E., Taştan, B., Arca, E., Kurumlu, Z. (2007). Efficacy and safety of serial glycolic acid peels and a topical regimen in the treatment of recalcitrant melasma. *The Journal of dermatology*, 34(1), 25-30.
- [162]. Horikoshi, T., Matsumoto, M., Usuki, A., Igarashi, S., Hikima, R., Uchiwa, H., ... Funasaka, Y. (2005). Effects of glycolic acid on desquamation-regulating proteinases in human stratum corneum. *Experimental dermatology*, 14(1), 34-40.
- [163]. Thielitz, A., Lux, A., Wiede, A., Kropf, S., Papakonstantinou, E., Gollnick, H. (2015). A randomized investigator-blind parallel-group study to assess efficacy and safety of azelaic acid 15% gel vs. adapalene 0.1% gel in the treatment and maintenance treatment of female adult acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 29(4), 789-796.
- [164]. Breathnach, A. S. (1996). Melanin hyperpigmentation of skin: melasma, topical treatment with azelaic acid, and other therapies. *Cutis*, 57(1), 36-45.
- [165]. Smit, N., Vicanova, J., Pavel, S. (2009). The hunt for natural skin whitening agents. *International journal of molecular sciences*, 10(12), 5326-5349.
- [166]. Parvez, S., Kang, M., Chung, H. S., Cho, C., Hong, M. C., Shin, M. K., Bae, H. (2006). Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy Research*, 20(11), 921-934.
- [167]. Huang, S. C., Lin, C. C., Huang, M. C., Wen, K. C. (2004). Simultaneous determination of magnesium ascorbyl phosphate, ascorbyl glucoside, kojic acid, arbutin and hydroquinone in skin whitening cosmetics by HPLC. *Journal of Food and Drug Analysis*, 12(1).
- [168]. Masse, M. O., Duvallet, V., Borremans, M., Goeyens, L. (2001). Identification and quantitative analysis of kojic acid and arbutine in skin-whitening cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, 23(4), 219-232.
- [169]. Boulouc, A., Vergnanini, A. L., Issa, M. C. (2015). A double-blind randomized study comparing the association of Retinol and LR2412 with tretinoin 0.025% in photoaged skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 14(1), 40-46.
- [170]. Tran, C., Michelet, J. F., Simonetti, L., Fiat, F., Garrigues, A., Potter, A., Lacharrière, O. (2014). In vitro and in vivo studies with tetra-hydro-jasmonic acid (LR2412) reveal its potential to correct signs of skin ageing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 28(4), 415-423.
- [171]. Kapuścińska, A., Olejnik, A., Nowak, I. (2016). The conjugate of jasmonic acid and tetrapeptide as a novel promising biologically active compound. *New Journal of Chemistry*, 40(11), 9007-9011.
- [172]. Khalid, F., Gorouhi, F., Maibach, H. I. (2015). Anti-Aging Topical Peptides and Proteins. In *Cosmeceuticals and Active Cosmetics*, Third Edition. CRC Press. Taylor & Francis Group. London, 127-162.
- [173]. Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International dairy journal*, 16(9), 945-960.

- [174]. Thiele, J. J., Hsieh, S. N., Ekanayake-Mudiyanselage, S. (2005). Vitamin E: critical review of its current use in cosmetic and clinical dermatology. *Dermatologic surgery*, 31(1), 805-813.
- [175]. Lin, J. Y., Selim, M. A., Shea, C. R., Grichnik, J. M., Omar, M. M., Monteiro-Riviere, N. A., Pinnell, S. R. (2003). UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48(6), 866-874.
- [176]. Ermakov, I. V., Gellermann, W. (2015). Optical detection methods for carotenoids in human skin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 572, 101-111.
- [177]. Barbulova, A., Colucci, G., Apone, F. (2015). New trends in cosmetics: By-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients. *Cosmetics*, 2(2), 82-92.
- [178]. Schmitt, J., Flemming, H. C. (1998). FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration Biodegradation*, 41(1), 1-11.
- [179]. Bunding Lee, K. A., & Johnson, S. C. (1993). Comparison of mid-IR with NIR in polymer analysis. *Applied Spectroscopy reviews*, 28(3), 231-284.
- [180]. Schönbichler, S. A., Bittner, L. K. H., Weiss, A. K. H., Griesser, U. J., Pallua, J. D., & Huck, C. W. (2013). Comparison of NIR chemical imaging with conventional NIR, Raman and ATR-IR spectroscopy for quantification of furosemide crystal polymorphs in ternary powder mixtures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(3), 616-625.
- [181]. El-Hagrasy, A. S., Morris, H. R., D'amico, F., Lodder, R. A., & Drennen, J. K. (2001). Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity. *Journal of pharmaceutical sciences*, 90(9), 1298-1307.
- [182]. Griffiths, P.R., De Haseth, J.A., Winefordner, J. D. (Series Editor) (2007). *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. J. Wiley Sons, Inc.: Hoboken, 19-96. ISBN: 978-0-471-19404-0. Pełne imiona
- [183]. Lomeli, S. H., Yin, S., Loo, R. R. O., Loo, J. A. (2009). Increasing charge while preserving noncovalent protein complexes for ESI-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(4), 593-596.
- [184]. Miranker, A., Robinson, C. V., Radford, S. E., Aplin, R. T., Dobson, C. M. (1993). Detection of transient protein folding populations by mass spectrometry. *Science*, 262(5135), 896-901.
- [185]. Ho, C. S., Lam, C. W., Chan, M. H., Cheung, R. C., Law, L. K., Lit, L. C., Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clinical Biochemist Reviews*, 24(1), 3-12. Brak autorów
- [186]. Jeener, J. M. B. H., Meier, B. H., Bachmann, P., Ernst, R. R. (1979). Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *The Journal of chemical physics*, 71(11), 4546-4553.
- [187]. Foroozandeh, M., Adams, R. W., Meharry, N. J., Jeannerat, D., Nilsson, M., Morris, G. A. (2014). *Ultra-high-Resolution NMR Spectroscopy*. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(27), 6990-6992.
- [188]. Vertuani, S., Ziosi, P., Solaroli, N., Buzzoni, V., Carli, M., Lucchi, E., ... Manfredini, S. (2003). Determination of antioxidant efficacy of cosmetic formulations by non-invasive measurements. *Skin Research and Technology*, 9(3), 245-253.
- [189]. Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- [190]. Cybul, M., Nowak, R. (2008). Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych. *Herba Polonica*, 54(1), 68-78.
- [191]. Kedare, S. B., Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412-422.
- [192]. Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609-615.
- [193]. Morales, M. E., Gallardo, V., Clarés, B., García, M. B., Ruiz, M. A. (2009). Study and description of hydrogels and organogels as vehicles for cosmetic active ingredients. *Journal of cosmetic science*, 60(6), 627.
- [194]. Giron, D., Goldbronn, C. (1995). Place of DSC purity analysis in pharmaceutical development. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 44(1), 217-251.
- [195]. ISO 11357-3:2011(en). *Plastics -- Differential scanning calorimetry (DSC) -- Part 3: Determination of temperature and enthalpy of melting and crystallization*, www.iso.org, (dostęp 08.08.2017).
- [196]. Giron, D. (1986). Applications of thermal analysis in the pharmaceutical industry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 4(6), 755-770.
- [197]. Sotofattori, E., Anzaldi, M., Balbi, A., Tonello, G. (1998). Simultaneous HPLC determination of multiple components in a commercial cosmetic cream. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 18(1), 213-217.
- [198]. Wren, S. A., Tchelitcheff, P. (2006). Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. *Journal of Chromatography A*, 1119(1), 140-146.
- [199]. Gianeti, M. D., Gaspar, L. R., Bueno de Camargo Júnior, F., Berardo Gonçalves Maia Campos, P. M. (2012). Benefits of combinations of vitamin A, C and E derivatives in the stability of cosmetic formulations. *Molecules*, 17(2), 2219-2230.

- [200]. Maia, A. M., Baby, A. R., Yasaka, W. J., Suenaga, E., Kaneko, T. M., Velasco, M. V. R. (2007). Validation of HPLC stability-indicating method for Vitamin C in semisolid pharmaceutical/cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants. *Talanta*, 71(2), 639-643.
- [201]. Wei, Z. (2007). Analysis research advance of lycopene. *Journal of Xinxiang Medical College*, 3, 041.
- [202]. Roldán-Gutiérrez, J. M., de Castro, M. D. L. (2007). Lycopene: The need for better methods for characterization and determination. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(2), 163-170.
- [203]. Perugini, P., Genta, I., Pavanetto, F., Conti, B., Scalia, S., Baruffini, A. (2000). Study on glycolic acid delivery by liposomes and microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 196(1), 51-61.
- [204]. Scalia, S., Callegari, R., Villani, S. (1998). Determination of glycolic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 795(2), 219-225.
- [205]. Choi, K. T., Kim, J. H., Cho, H. T., Lim, S. S., Kwak, S. S., Kim, Y. J. (2016). Dermatologic evaluation of cosmetic formulations containing *Chrysanthemum indicum* extract. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 15(2), 162-8.
- [206]. Pippa, N., Mountrichas, G., Tseti, I., Demetzos, C. (2016). Cerasomes as Innovative Excipients in Cosmetic Product "Pregnaderm Extreme Hydration Body Cream": A Physicochemical Study. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 8(1), 26-30.
- [207]. Patlewicz, N. Jeliazkova, R. J. Safford, A. P. Worth and B. Aleksiev, *SAR QSAR Environ. Res.*, 2008, 19(5-6), 495.
- [208]. Safford, R. J. (2008). The Dermal Sensitisation Threshold—a TTC approach for allergic contact dermatitis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51(2), 195-200.
- [209]. Leelapornpisid, P., Leesawat, P., NATAKARNKITKUL, S., RATTANAPANADDA, P. (2010). Application of chitosan for preparation of arbutin nanoparticles as skin whitening. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 20(3), 101-105.
- [210]. Baudonnet, L., Grossiord, J. L., Rodriguez, F. (2004). Physicochemical characterization and in vitro release of salicylic acid from o/w emulsions prepared with Montanov 68®: effect of formulation parameters. *Drug development and industrial pharmacy*, 30(9), 975-984.
- [211]. Gabbanini, S., Matera, R., Beltrami, C., Minghetti, A., Valgimigli, L. (2010). Analysis of in vitro release through reconstructed human epidermis and synthetic membranes of multi-vitamins from cosmetic formulations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 52(4), 461-467.
- [212]. Zhao, L., Xiong, H., Peng, H., Wang, Q., Han, D., Bai, C., ... Deng, B. (2011). PEG-coated lyophilized proliposomes: preparation, characterizations and in vitro release evaluation of vitamin E. *European Food Research and Technology*, 232(4), 647-654.
- [213]. Tan, C., Xue, J., Lou, X., Abbas, S., Guan, Y., Feng, B., Xia, S. (2014). Liposomes as delivery systems for carotenoids: comparative studies of loading ability, storage stability and in vitro release. *Food function*, 5(6), 1232-1240. Brak autorów
- [214]. Liu, J., Hu, W., Chen, H., Ni, Q., Xu, H., Yang, X. (2007). Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *International journal of pharmaceutics*, 328(2), 191-195.
- [215]. Farwick, M., Grether-Beck, S., Marini, A., Maczkiewitz, U., Lange, J., Köhler, T., ... Jaenicke, T. (2011). Bioactive tetrapeptide GEKG boosts extracellular matrix formation: in vitro and in vivo molecular and clinical proof. *Experimental dermatology*, 20(7), 602-604.
- [216]. Ng, S. F., Rouse, J. J., Sanderson, F. D., Meidan, V., & Eccleston, G. M. (2010). Validation of a static Franz diffusion cell system for in vitro permeation studies. *Aaps PharmSciTech*, 11(3), 1432-1441.
- [217]. Farmakopea Europejska (2003), 5.0, 2.9.3, Dissolution test for solid dosage forms.
- [218]. Liebenberg, W., Engelbrecht, E., Wessels, A., Devarakonda, B., Yang, W., & De Villiers, M. M. (2004). A comparative study of the release of active ingredients from semisolid cosmeceuticals measured with Franz, enhancer or flow-through cell diffusion apparatus. *Journal of Food and Drug Analysis*, 12(1).
- [219]. Strona internetowa producenta aparatury chemicznej, www.permeagear.com (dostęp 16.08.2017)
- [220]. Janicki, S., Sznitowska, M., & Zieliński, W. (2001). Dostępność farmaceutyczna i dostępność biologiczna leków. *Ośrodek Informacji Naukowej" Polfa"*.
- [221]. Zatz, J. L., & Segers, J. D. (1998). Techniques for measuring in vitro release from semisolids. *Dissolution technologies*, 5(1), 3-17.
- [222]. Olejnik, A., Goscińska, J., & Nowak, I. (2012). Active compounds release from semisolid dosage forms. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101(11), 4032-4045.
- [223]. Siewert, M., Dressman, J., Brown, C. K., Shah, V. P., Aiache, J. M., Aoyagi, N., ... & Crison, J. (2003). FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *AAPS PharmSciTech*, 4(1), 43-52.
- [224]. Kong, F., & Singh, R. P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of food science*, 73(5).
- [225]. Edgar, K. J., Buchanan, C. M., Debenham, J. S., Rundquist, P. A., Seiler, B. D., Shelton, M. C., & Tindall, D. (2001). Advances in cellulose ester performance and application. *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1605-1688.

- [226]. Azarmi, S., Roa, W., & Löbenberg, R. (2007). Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *International Journal of pharmaceutics*, 328(1), 12-21.
- [227]. Hanson, R., & Heaney, J. (2013). A primer on automating the vertical diffusion cell (VDC). *Dissolution Technologies*, 20(2), 40-44.
- [228]. Hauck, W. W., Shah, V. P., Shaw, S. W., & Ueda, C. T. (2007). Reliability and reproducibility of vertical diffusion cells for determining release rates from semisolid dosage forms. *Pharmaceutical research*, 24(11), 2018-2024.
- [229]. Tsai, C. J., Hsu, L. R., Fang, J. Y., LIN, H. H. (1999). Chitosan hydrogel as a base for transdermal delivery of berberine and its evaluation in rat skin. *Biological pharmaceutical bulletin*, 22(4), 397-401.
- [230]. Christensen, J. M., Chuong, M. C., Le, H., Pham, L., Bendas, E. (2011). Hydrocortisone diffusion through synthetic membrane, mouse skin, and epiderm™ cultured skin. *Archives of drug information*, 4(1), 10-21.
- [231]. Strona internetowa producenta Sigma Aldrich, www.sigmaaldrich.pl (dostęp 09.05.2017).
- [232]. Strona internetowa z broszurą oferty sprzedaży, <http://www.lcdgm.com/Celgard/CELGARD-4550.pdf>
- [233]. Maher, J. F. (1989). *Replacement of Renal Function by Dialysis*. Springer Science & Business Media, New York.
- [241]. Sarapuk, J., & Kubica, K. (1998). Cut-off phenomenon. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 3(3).
- [235]. Ceynowa, J. (2003). *Membrany selektywne i procesy membranowe. Wykłady Monograficzne i Specjalistyczne–Membrany Teoria i Praktyka, zeszyt I, Wydział Chemii, Uniwersytet M. Kopernika, Toruń*.
- [236]. Hörl, W.H., Koch, K., Lindsay, R. M., Ronco, C., Winchester J.F. (2004). *Replacement of Renal Function by Dialysis*. Springer, New York.
- [237]. Nawrotek, K., Modrzejewska, Z., & Zarzycki, R. (2013). Uwalnianie środków aktywnych z hydrożeli-model dyfuzyjny i dyfuzyjno-desorpcyjny. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, (6), 548-549.
- [238]. Wijmans, J. G., & Baker, R. W. (1995). The solution-diffusion model: a review. *Journal of membrane science*, 107(1-2), 1-21.
- [239]. Kamaruddin, H. D., & Koros, W. J. (1997). Some observations about the application of Fick's first law for membrane separation of multicomponent mixtures. *Journal of membrane science*, 135(2), 147-159.
- [240]. Leoni, L., Boiarski, A., & Desai, T. A. (2002). Characterization of nanoporous membranes for immunoisolation: diffusion properties and tissue effects. *Biomedical microdevices*, 4(2), 131-139.
- [241]. Renkin, E. M. (1954). Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes. *The Journal of general physiology*, 38(2), 225-243.
- [242]. Schmid, M. H., Korting, H. C. (1995). The concept of the acid mantle of the skin: its relevance for the choice of skin cleansers. *Dermatology*, 191(4), 276-280.
- [243]. Chattaraj, S. C., & Kanfer, I. (1995). Release of acyclovir from semi-solid dosage forms: a semi-automated procedure using a simple plexiglass flow-through cell. *International journal of pharmaceutics*, 125(2), 215-222.
- [244]. Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Polonica Pharmaceutica*, 67(3), 217-23.
- [245]. Costa, P., & Lobo, J. M. S. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences*, 13(2), 123-133.
- [246]. Bashir, S. J., Chew, A. L., Anigbogu, A., Dreher, F., Maibach, H. I. (2001). Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Research and Technology*, 7(1), 40-48.
- [247]. Koopman, D. G., Kežić, S., Verberk, M. M. (2004). Skin reaction and recovery: a repeated sodium lauryl sulphate patch test vs. a 24-h patch test and tape stripping. *British Journal of Dermatology*, 150(3), 493-499.
- [248]. Lademann, J., Jacobi, U., Surber, C., Weigmann, H. J., & Fluhr, J. W. (2009). The tape stripping procedure–evaluation of some critical parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 317-323.
- [249]. Nohynek, G. J., Antignac, E., Re, T., Toutain, H. (2010). Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients. *Toxicology and applied pharmacology*, 243(2), 239-259.
- [250]. Warshaw, E. M., Buchholz, H. J., Belsito, D. V., Maibach, H. I., Fowler, J. F., Rietschel, R. L. & Storrs, F. J. (2009). Allergic patch test reactions associated with cosmetics: retrospective analysis of cross-sectional data from the North American Contact Dermatitis Group, 2001-2004. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 60(1), 23-38.
- [251]. Nedorost, S., & Wagman, A. (2005). Positive Patch-Test Reactions to Gold: Patients' Perception of Relevance and the Role of Titanium Dioxide in Cosmetics. *Dermatitis*, 16(2), 67-70.
- [252]. Romaguera, C., Camarasa, J. M. G., Alomar, A., Grimalt, F. (1983). Patch tests with allergens related to cosmetics. *Contact Dermatitis*, 9(2), 167-168.
- [253]. Khazaka, G., Courage, W. (1997). Device and method for measuring a three-dimensional surface structure US5684573 A. Data publikacji: 04.11.1997.
- [261]. Instrukcja Obsługi Aparatu MPA Courage + Khazaka electronic GmbH, <http://www.courage-khazaka.de>, (dostęp 5.02.2017).
- [255]. Aschoff, R., Schwanebeck, U., Bräutigam, M., & Meurer, M. (2009). Skin physiological parameters confirm the therapeutic efficacy of pimecrolimus cream 1% in patients with mild-to-moderate atopic dermatitis. *Experimental dermatology*, 18(1), 24-29.
- [256]. Strona internetowa dystrybutora aparatury, www.integral.to (dostęp 10.05.2017).

- [257]. Erb, M., Meldau, S., Howe, G. A. (2012). Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Science*, 17(5), 250-259.
- [258]. Szweykowska, A. (1999). *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im Adama Mickiewicza, Poznań, 23-59.
- [259]. Klee, H. J., Romano, C. P., Binns, A. (1994). The roles of phytohormones in development as studied in transgenic plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(4), 311-324.
- [260]. Osborne, D., McManus, M. (2005). *Hormones, signals and target cells in plant development*. Cambridge University Press. New York, 158.
- [261]. Kuraishi, S., Muir, R. M. (1964). The relationship of gibberellin and auxin in plant growth. *Plant and Cell Physiology*, 5(1), 61-69.
- [262]. Tran, L. S. P., Pal, S. (2014). *Phytohormones: a window to metabolism, signaling and biotechnological applications*. Springer, New York, 1-35.
- [263]. Blakeslee, J. J., Murphy, A. S. (2016). Microscopic and Biochemical Visualization of Auxins in Plant Tissues. *Environmental Responses in Plants: Methods and Protocols*, 37-53.
- [264]. Sugawara, S., Mashiguchi, K., Tanaka, K., Hishiyama, S., Sakai, T., Hanada, K., Takeda-Kamiya, N. (2015). Distinct characteristics of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid, two common auxins in plants. *Plant and Cell Physiology*, 56(8), 1641-1654.
- [265]. Vaková, R., Petrasek, J., Zazimalova, E., Kamínek, M., Motyka, V., Ludwig-Müller, J. (2014). Auxins and cytokinins in plant development... And interactions with other phytohormones 2014. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(3), 709.
- [266]. Goussard, P. G. (2016). Effects of cytokinins on elongation, proliferation and total mass of shoots derived from shoot apices of grapevine cultured in vitro. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 20(3), 228.
- [267]. Osugi, A., Sakakibara, H. (2015). QA: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? *BMC biology*, 13(1), 102.
- [268]. Radhika, V., Ueda, N., Tsuboi, Y., Kojima, M., Kikuchi, J., Kudo, T., Sakakibara, H. (2015). Methylated cytokinins from the phytopathogen *Rhodococcus fascians* mimic plant hormone activity. *Plant physiology*, 169(2), 1118-1126.
- [269]. Giron, D., Frago, E., Glevarec, G., Pieterse, C. M., Dicke, M. (2013). Cytokinins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: connecting plant growth and defence. *Functional Ecology*, 27(3), 599-609.
- [270]. Iqbal, N., Nazar, R., Khan, M. I. R., Masood, A., Khan, N. A. (2011). Role of gibberellins in regulation of source-sink relations under optimal and limiting environmental conditions. *Current Science(Bangalore)*, 100(7), 998-1007.
- [271]. Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M. (2008). Molecular biology of gibberellins signaling in higher plants. *International Review of Cell And Molecular Biology*, 268, 191-221.
- [272]. McMillan, J. (2001). Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20(4), 387-442.
- [273]. Bajguz, A., Hayat, S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1), 1-8.
- [274]. Caño-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vafeados, D., Mora-García, S., Cheng, J. C., Nam, K.H, Chory, J. (2004). BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development*, 131(21), 5341-5351.
- [275]. Clouse, S. D., Sasse, J. M. (1998). Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annual review of plant biology*, 49(1), 427-451.
- [276]. Sakurai, A., Fujioka, S. (1997). Studies on biosynthesis of brassinosteroids. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(5), 757-762.
- [277]. Chang, C. (2016). QA: How do plants respond to ethylene and what is its importance?. *BMC biology*, 14(1), 7.
- [278]. Bleecker, A. B., Kende, H. (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual review of cell and developmental biology*, 16(1), 1-18.
- [279]. Ecker, J. R. (1995). The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*, 268(5211), 667.
- [280]. Finkelstein, R. (2013). Abscisic acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book*, 11, 166.
- [281]. Finkelstein, R. R., Gampala, S. S., Rock, C. D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell*, 14(1), 15-45.
- [282]. Hetherington, A. M., Quatrano, R. S. (1991). Mechanisms of action of abscisic acid at the cellular level. *New Phytologist*, 119(1), 9-12.
- [283]. Al-Babili, S., Bouwmeester, H. J. (2015). Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 161-186.
- [284]. Waldie, T., McCulloch, H., Leyser, O. (2014). Strigolactones and the control of plant development: lessons from shoot branching. *The Plant Journal*, 79(4), 607-622.
- [285]. Ruyter-Spira, C., Al-Babili, S., Van Der Krol, S., Bouwmeester, H. (2013). The biology of strigolactones. *Trends in plant science*, 18(2), 72-83.

- [286]. Khan, M. I. R., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N. A., Khan, N. A. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 462.
- [287]. Caarls, L., Pieterse, C. M., Van Wees, S. (2015). How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Frontiers in Plant Science*, 6, 170.
- [288]. Janda, T., Gondor, O. K., Yordanova, R., Szalai, G., Pál, M. (2014). Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(10), 2537-2546.
- [289]. Yan, S., Dong, X. (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 64-68.
- [290]. Masson, P. H., Takahashi, T., Angelini, R. (2017). Editorial: Molecular Mechanisms Underlying Polyamine Functions in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 14-22.
- [291]. Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, R., Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 11(1), 100-105.
- [292]. Edreva, A. (1996). Polyamines in plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 22(1-2), 73-101.
- [293]. Santino, A., Taurino, M., De Domenico, S., Bonsegna, S., Poltronieri, P., Pastor, V., Flors, V. (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a) biotic stresses. *Plant cell reports*, 32(7), 1085-1098.
- [294]. Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100(4), 681-697.
- [295]. Howe, G. A. (2004). Jasmonates as signals in the wound response. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23(3), 223-237.
- [296]. Pozo, M. J., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M. (2004). Jasmonates-signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23(3), 211-222.
- [297]. Bialecka, B., Kepczynski, J. (2003). Jasmonidy w ustępowaniu spoczynku i kiełkowaniu nasion. *Postępy Biologii Komórki*, 3(30), 447-459.
- [298]. Wasternack, C., Hause, B. (2002). Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research And Molecular Biology*, 72, 165-221.
- [299]. Creelman, R. A., Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 48(1), 355-381.
- [300]. Creelman, R. A., Mullet, J. E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4114-4119.
- [301]. Sembdner, G. A. P. B., Parthier, B. (1993). The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annual review of plant biology*, 44(1), 569-589.
- [302]. Parthier, B. (1991). Jasmonates, new regulators of plant growth and development: many facts and few hypotheses on their actions. *Plant Biology*, 104(6), 446-454.
- [303]. Demole, E., Lederer, E., Mercier, D. (1962). Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta*, 45(2), 675-685.
- [304]. Bialecka B., Kępczyński J. 1998. Rola kwasu jasmonowego i jego estru metylowego we wzroście i rozwoju roślin. *Wiadomości Botaniczne*. 42 (3/4), 61-78.
- [305]. Kramell, R., Miersch, O., Hause, B., Ortel, B., Parthier, B., Wasternack, C. (1997). Amino acid conjugates of jasmonic acid induce jasmonate-responsive gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *FEBS Lett.* 414(2), 197-202.
- [306]. Maksymiec, W., Wianowska, D., Dawidowicz, A. L., Radkiewicz, S., Mardarowicz, M., Krupa, Z. (2005). The level of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* plants under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology*, 162(12), 1338-1346.
- [307]. Ślesak H., Ślesak I. 2011. Odpowiedź roślin na zranienie. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*. 60, 3-4:445-457
- [308]. Vick, B. A., Zimmerman, D. C. (1986). Characterization of 12-Oxo-Phytodienoic Acid Reductase in Corn The Jasmonic Acid Pathway. *Plant physiology*, 80(1), 202-205.
- [309]. Pietryczuk, A., Czerpak, R. (2006). Występowanie, biosynteza i aktywność biologiczna kwasu traumatynowego u roślin. *Postępy Biologii Komórki*, 33, 591-601.
- [310]. Vick, B. A., Zimmerman, D. C. (1983). The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 111(2), 470-477.
- [311]. Mueller, M. J., Brodschelm, W., Spannagl, E., Zenk, M. H. (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(16), 7490-7494.
- [312]. Schillmiller, A. L., Koo, A. J., Howe, G. A. (2007). Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. *Plant Physiology*, 143(2), 812-824.
- [313]. Mueller, M. J. (1997). Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 653-663.

- [314]. Tamogami, S., Rakwal, R., Kodama, O. (1997). Phytoalexin production elicited by exogenously applied jasmonic acid in rice leaves (*Oryza sativa* L.) is under the control of cytokinins and ascorbic acid. *FEBS letters*, 412(1), 61-64.
- [315]. Kessler, A., Baldwin, I. T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291(5511), 2141-2144.
- [316]. Staswick, P.E., Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), 2117-2127.
- [317]. Tamogami, S., Rakwal, R., Agrawal, G. K. (2008). Interplant communication: airborne methyl jasmonate is essentially converted into JA and JA-Ile activating jasmonate signaling pathway and VOCs emission. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(4), 723-727.
- [318]. Świątek, A., Van Dongen, W., Esmans, E. L., Van Onckelen, H. (2004). Metabolic fate of jasmonates in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiology*, 135(1), 161-172.
- [319]. Dalko, M. Use of a (dihydro)jasmonic acid derivative for dry skin treatment. EP1442737 B1. Data publikacji: 29.03.2006.
- [320]. Wilhelm, K. P., Cua, A. B., Maibach, H. I. (1991). Skin aging: effect on transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and casual sebum content. *Archives of Dermatology*, 127(12), 1806-1809.
- [321]. Opis preparatu, dostępny na opakowaniu produktu.
- [322]. Michelet, J. F., Olive, C., Rieux, E., Fagot, D., Simonetti, L., Galey, J. B., ... Pereira, R. (2012). The anti-ageing potential of a new jasmonic acid derivative (LR2412): in vitro evaluation using reconstructed epidermis episkin™. *Experimental dermatology*, 21(5), 398-400.
- [323]. Alexiades, M. (2016). Jasmonates and Tetrahydrojasmonic Acid: A Novel Class of Anti-Aging Molecules. *Journal of Drugs in Dermatology*, 15 (2), 206-207.
- [324]. Alexiades, M. (2016). Clinical Assessment of a Novel Jasmonate Cosmeceutical, LR2412-Cx, for the Treatment of Skin Aging. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 15(2), 209-215.
- [325]. Vainstein, A., Lewinsohn, E., Pichersky, E., Weiss, D. (2001). Floral fragrance. New inroads into an old commodity. *Plant physiology*, 127(4), 1383-1389.
- [326]. Meyer-Warnod, B. (1984). Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. *Perfumer flavorist*, 9(2) 93-104.
- [327]. Acree, T. E., Nishida, R., & Fukami, H. (1985). Odor thresholds of the stereoisomers of methyl jasmonate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(3), 425-427.
- [328]. Scognamiglio, J., Jones, L., Letizia, C. S., Api, A. M. (2012). Fragrance material review on methyl dihydrojasmonate. *Food and chemical toxicology*, 50, 562-571.
- [329]. Flescher, E. (2007). Jasmonates in cancer therapy. *Cancer letters*, 245(1), 1-10.
- [330]. Cohen, S., Flescher, E. (2009). Methyl jasmonate: a plant stress hormone as an anti-cancer drug. *Phytochemistry* 70(13), 1600-1609.
- [331]. Rotem, R., Heyfets, A., Fingrut, O., Blickstein, D., Shaklai, M., Flescher, E. (2005). Jasmonates: novel anticancer agents acting directly and selectively on human cancer cell mitochondria. *Cancer research*, 65(5), 1984-1993.
- [332]. Yeruva, L., Elegbede, J. A., Carper, S. W. (2008). Methyl jasmonate decreases membrane fluidity and induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor 1 in breast cancer cells. *Anti-cancer drugs*, 19(8), 766.
- [333]. Fehr Pereira Lopes, J.E. Compositions of jasmonate compounds and methods of use. US20130089615. Data publikacji: 11.11.2014. skrót imion
- [334]. Gold, D., Pankova-Kholmyansky, I., Fingrut, O., Flescher, E. (2003). The antiparasitic actions of plant jasmonates. *Journal of Parasitology*, 89(6), 1242-1244.
- [335]. Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y., Hay, S. I. (2005). The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434(7030), 214-217.
- [336]. Stelma, F. F., Talla, I., Sow, S., Kongs, A., Niang, M., Polman, K., Gryseels, B. (1995). Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene*, 53(2), 167-170.
- [337]. Vilela, R., Menna-Barreto, R. F. S., Benchimol, M. (2010). Methyl jasmonate induces cell death and loss of hydrogenosomal membrane potential in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology international*, 59(3), 387-393.
- [338]. Umukoro, S., Akinyinka, A. O., Aladeokin, A. C. (2011). Antidepressant activity of methyl jasmonate, a plant stress hormone in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 98(1), 8-11.
- [339]. Ghasemi Pirbalouti, A., Sajjadi, S. E., & Parang, K. (2014). A review (research and patents) on jasmonic acid and its derivatives. *Archiv der Pharmazie*, 347(4), 229-239.
- [340]. Schleder, E., Mischke, U., Roll, R., Kayser, D. (1992). A national validation study of the acute-toxic-class method—an alternative to the LD50 test. *Archives of toxicology*, 66(7), 455-470.
- [341]. Api, A. M., Belsito, D., Bhatia, S., Botelho, D., Browne, D., Bruze, M., ... & Date, M. (2017). RIFM FRAGRANCE INGREDIENT SAFETY ASSESSMENT, Methyl jasmonate, CAS Registry Number 1211-29-6. *Food and Chemical Toxicology*.
- [342]. Lupo, M.P., Cole, A., L. (2007). Peptides and proteins. *Dermatologic Therapy*, 20, 343-349.

- [343]. Giralda, P., Vita, G., Nicolosi, C., Milone, S., Messina, C. (1992). Botulinum toxin therapy: distant effects on neuromuscular transmission and autonomic nervous system. *Journal of Neurology, Neurosurgery Psychiatry*, 55(9), 844-845.
- [344]. Krupanidhi, S., Sreekumar, A., Sanjeevi, C. B. (2008). Copper biological health. *Indian Journal of Medical Research*, 128(4), 448.
- [345]. McCord, J. M. (1974). Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, 185(4150), 529-531.
- [346]. Gałecka, E., Jacewicz, R., Mrowicka, M., Florkowski, A., Gałecki, P. (2008). Enzymy antyoksydacyjne – budowa, właściwości, funkcje. *Polski Merkuriusz Lekarski XXV*, 147, 266- 268.
- [347]. Pickart, L., Thaler, M. M. (1973). Tripeptide in human serum which prolongs survival of normal liver cells and stimulates growth in neoplastic liver. *Nature: New biology*, 243(124), 85-87.
- [348]. Mosesson, M. W., Amrani, D. L. (1980). The structure and biologic activities of plasma fibronectin. *Blood*, 56(2), 145-158.
- [349]. Adamczyk, K., Antończak, P., Jurszak, M. (2012). Niskocząsteczkowe peptydy sygnałowe. *Dermatologia Kliniczna*, 14(2), 93-96.
- [350]. Parisi, O.I., Malivindi, O.R., Amone, F., Ruffo, M., Malanchin, R., Carlomagno, F., Pinagiolino, C., Nobile, V., Pezzi, V., Scrivano, L., F. (2017). Safety and Efficacy of Dextran-Rosmarinic Acid Conjugates as Innovative Polymeric Antioxidants in Skin Whitening: What Is the Evidence? *Cosmetics* 2017, 4(3), 28.
- [351]. Lam, A. T. N., Ganbold, E. O., Cho, K. H., Kang, D., & Joo, S. W. (2014). Raman spectroscopy of gold nanoparticle conjugates of cosmetic ingredient kinetin. *Vibrational Spectroscopy*, 73, 15-18.
- [352]. Castellort, R., Jimenez, I., Sastre, J. Conjugate of hyaluronic acid for cosmetic treatment and preparation method. US8901080 B2. Data publikacji: 02.12.2014.
- [353]. Olejnik, A., **Kapuścińska, A.**, Schroeder, G., & Nowak, I. (2017). Physico-chemical characterization of formulations containing endomorphin-2 derivatives. *Amino Acids*, 1-13.
- [354]. Ben-Shabat, S., Baruch, N., & Sintov, A. C. (2007). Conjugates of unsaturated fatty acids with propylene glycol as potentially less-irritant skin penetration enhancers. *Drug development and industrial pharmacy*, 33(11), 1169-1175.
- [355]. Stephanopoulos, N., Francis, M. B. (2011). Choosing an effective protein bioconjugation strategy. *Nature chemical biology*, 7(12), 876-884.
- [356]. Jerjian, T. V., Glode, A. E., Thompson, L. A., & O'bryant, C. L. (2016). Antibody-Drug Conjugates: A Clinical Pharmacy Perspective on an Emerging Cancer Therapy. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 36(1), 99-116.
- [357]. Paramjot, Khan, N. M., Kapahi, H., Kumar, S., Bhardwaj, T. R., Arora, S., & Mishra, N. (2015). Role of polymer–drug conjugates in organ-specific delivery systems. *Journal of drug targeting*, 23(5), 387-416.
- [358]. Varshosaz, J. (2012). Dextran conjugates in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(5), 509-523.
- [359]. He, Y., Wang, M., Fan, E., Ouyang, H., Yue, H., Su, X., Liao, G., Wang, L., Lu, S., Fu, Z. (2017). Highly Specific Bacteriophage-Affinity Strategy for Rapid Separation and Sensitive Detection of Viable *Pseudomonas aeruginosa*. *Analytical Chemistry*, 89(3), 1916-1921.
- [360]. Roviello, G. N., Di Gaetano, S., Capasso, D., Franco, S., Crescenzo, C., Bucci, E. M., & Pedone, C. (2011). RNA-binding and viral reverse transcriptase inhibitory activity of a novel cationic diamino acid-based peptide. *Journal of medicinal chemistry*, 54(7), 2095-2101.
- [361]. Sparkman, O. D. (2000). Mass spectrometry desk reference. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(12), 1144.
- [362]. Strona internetowa dystrybutora aparatury laboratoryjnej, <https://www.bruker.com>, (dostęp: 16.02.2017).
- [363]. Strona internetowa dystrybutora aparatury laboratoryjnej, <http://unitedscientific.co.za>, (dostęp: 16.02.2017).
- [364]. Instrukcja obsługi Rheotestu 2. Charakterystyka pomiarowa wiskozymetru rotacyjnego
- [365]. Strona internetowa dystrybutora aparatury laboratoryjnej, www.mt.com (dostęp: 16.02.2017).
- [366]. Strona internetowa dystrybutora aparatury laboratoryjnej, www.tainstruments.com (dostęp: 16.02.2017).
- [367]. Uhrovčík, J. (2014). Strategy for determination of LOD and LOQ values—Some basic aspects. *Talanta*, 119, 178-180.
- [368]. Sahoo, S., Chakraborti, C. K., & Behera, P. K. (2012). Development and evaluation of gastroretentive controlled release polymeric suspensions containing ciprofloxacin and carbopol polymers. *J Chem Pharm Res*, 4(4), 2268-84.
- [369]. Jia, J., Cai, L., Zhang, K., & Chen, D. (2007, August). A new approach to fake finger detection based on skin elasticity analysis. In *International Conference on Biometrics* (pp. 309-318). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [370]. Hachem, J. P., De Paepe, K., Vanpée, E., Kaufman, L., Rogiers, V., & Roseeuw, D. (2001). Combination therapy improves the recovery of the skin barrier function: an experimental model using a contact allergy patch test combined with TEWL measurements. *Dermatology*, 202(4), 314-319.
- [371]. Hachem, J. P., De Paepe, K., Vanpee, E., Bogaerts, M., Kaufman, L., Rogiers, V., & Roseeuw, D. (2002). Efficacy of topical corticosteroids in nickel-induced contact allergy. *Clinical and experimental dermatology*, 27(1), 47-50.

- [372]. Fujimura, T., Haketa, K., Hotta, M., & Kitahara, T. (2007). Loss of skin elasticity precedes to rapid increase of wrinkle levels. *Journal of dermatological science*, 47(3), 233-239.
- [373]. Huffines, B., & Logsdon, M. C. (1997). The neonatal skin risk assessment scale for predicting skin breakdown in neonates. *Issues in comprehensive pediatric nursing*, 20(2), 103-114.
- [374]. Lund, C. H., Nonato, L. B., Kuller, J. M., Franck, L. S., Cullander, C., & Durand, D. K. (1997). Disruption of barrier function in neonatal skin associated with adhesive removal. *The Journal of pediatrics*, 131(3), 367-372.
- [375]. McMurry, J. (2007). *Chemia organiczna*, Tom 2, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, p. 400-415.
- [376]. Strona internetowa z tablicami korelacyjnymi IR, www.chem.libretexts.org (dostęp: 20.07.2017).
- [377]. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2), 211-219.
- [378]. Park, P. J., Jung, W. K., Nam, K. S., Shahidi, F., Kim, S. K. (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(6), 651-656.
- [379]. Wade A.M., Tucker H.N. (1998). Antioxidant characteristics of L-histidine. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 9, 308-315.
- [380]. Malekpoor, F., Salimi, A., Pirbalouti, A. G. (2016). Effect of jasmonic acid on total phenolic content and antioxidant activity of extract from the green and purple landraces of sweet basil. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 73(5), 1229-1234.
- [381]. Wang, K., Jin, P., Cao, S., Shang, H., Yang, Z., Zheng, Y. (2009). Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in Chinese bayberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5809-5815.
- [382]. Palme, H., & O'Neill, H. S. C. (2003). Cosmochemical estimates of mantle composition. *Treatise on geochemistry*, 2, 568.
- [383]. Broszura informacyjna Tylose® for Emulsion Polymerisation, SE Tylose GmbH & Co. KG, 2017, 1-4.
- [384]. Granstrom, J., Oonishi, S., Tada, M., Takeda, H. (2015). Particle size distribution shift as a predictor of slurry stability. In *Planarization/CMP Technology (ICPT), 2015 International Conference on* (pp. 1-4). IEEE.
- [385]. Joscelyne, S. M., Trägårdh, G. (1999). Food emulsions using membrane emulsification: conditions for producing small droplets. *Journal of Food Engineering*, 39(1), 59-64.
- [386]. Tadros, T. (2004). Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advances in colloid and interface science*, 108, 227-258.
- [387]. Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E., Ashokkumar, M. (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(6), 721-727.
- [388]. McClements, D. J. (1996). Principles of ultrasonic droplet size determination in emulsions. *Langmuir*, 12(14), 3454-3461.
- [389]. Tyliczszak, B., & Pielichowski, K. (2013). Novel hydrogels containing nanosilver for biomedical applications-synthesis and characterization. *Journal of Polymer Research*, 20(7), 191.
- [390]. Celia, C., Trapasso, E., Cosco, D., Paolino, D., & Fresta, M. (2009). Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(1), 155-160.
- [391]. Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K., & Snabre, P. (1999). TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50(2), 445-456.
- [392]. Pal, R. (1996). Effect of droplet size on the rheology of emulsions. *AIChE Journal*, 42(11), 3181-3190.
- [393]. Holt, Ø., Sæther, Ø., Sjöblom, J., Dukhin, S. S., & Mishchuk, N. A. (1998). Investigation of reversible Brownian flocculation and intradoublet coalescence in o/w emulsions by means of video enhanced microscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 141(2), 269-278.
- [394]. Strona internetowa producenta aparatu Turbiscan LabExpert, www.formulation.com, Instrukcja obsługi aparatu oraz interpretacji wyników Turbiscan LAb – User guide ©Formulation (dostęp 24.08.2017).
- [395]. Wiśniewska, M. (2010). Influences of polyacrylic acid adsorption and temperature on the alumina suspension stability. *Powder Technology*, 198(2), 258-266.
- [396]. Frenkel, M., Garti, N. (1980). Evaluation of emulsion stability by thermogravimetric analysis (tg). *Thermochimica Acta*, 42(3), 265-272.
- [397]. Kim, S. J., Lee, C. K., Kim, S. I. (2004). Characterization of the water state of hyaluronic acid and poly (vinyl alcohol) interpenetrating polymer networks. *Journal of applied polymer science*, 92(3), 1467-1472.
- [398]. Dweck, J., & Sampaio, C. M. S. (2004). Analysis of the thermal decomposition of commercial vegetable oils in air by simultaneous TG/DTA. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 75(2), 385-391.
- [399]. Wooster, T. J., Johanson, K. M., Fraser, K. J., MacFarlane, D. R., & Scott, J. L. (2006). Thermal degradation of cyano containing ionic liquids. *Green Chemistry*, 8(8), 691-696.
- [400]. Banerjee, A., Dolado, J. J., Hendry, D. F., Smith, G. W. (1986). Exploring equilibrium relationships in econometrics through static models: some Monte Carlo evidence. *Oxford Bulletin of Economics and statistics*, 48(3), 253-277.

- [401]. Linacre, J. M. (1999). Investigating rating scale category utility. *Journal of Outcome Measurement*, 3, 103-122.
- [402]. Piesik, D. (2015). "Priming", readiness of plants to defend themselves against pests and pathogens. *Progress in Plant Protection*, 55(2).
- [403]. Strona internetowa producenta jasmonidów, www.tcichemicals.com (dostęp: 25.08.2017).
- [404]. Strona internetowa z oprogramowaniem Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score, Molinspiration do estymacji właściwości cząsteczki, <http://www.molinspiration.com> (dostęp: 10.07.2017).
- [405]. Masaro, L., Zhu, X. X. (1999). Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Progress in polymer science*, 24(5), 731-775.
- [406]. Li, C., Liu, C., Liu, J., Fang, L. (2011). Correlation between rheological properties, in vitro release, and percutaneous permeation of tetrahydropalmatine. *Aaps Pharmscitech*, 12(3), 1002.
- [407]. Sawant, P. D., Luu, D., Ye, R., Buchta, R. (2010). Drug release from hydroethanolic gels. Effect of drug's lipophilicity (logP), polymer-drug interactions and solvent lipophilicity. *International journal of pharmaceuticals*, 396(1), 45-52.
- [408]. Mannhold, R., Poda, G. I., Ostermann, C., Tetko, I. V. (2009). Calculation of molecular lipophilicity: State-of-the-art and comparison of log P methods on more than 96,000 compounds. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98(3), 861-893.
- [409]. Taylor, R. (1990). Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. *Journal of diagnostic medical sonography*, 6(1), 35-39.
- [410]. Mycek, B., Szymura-Oleksiak, J., Strach, B., Zima, A., Ślósarczyk, A. (2012). Badanie kinetyki uwalniania leków z bioceramicznych preparatów implantacyjnych. *Materiały Ceramiczne/Ceramic Materials*, 64(3), 387-392.
- [411]. Malzfeldt, E., Lehmann, P., Goerz, G., Lippold, B. C. (1989). Influence of drug solubility in the vehicle on clinical efficacy of ointments. *Archives of dermatological research*, 281(3), 193-197.
- [412]. Babar, A., Bhandari, R. D., Plakogiannis, F. M. (1991). In-vitro release studies of chlorpheniramine maleate from topical bases using cellulose membrane and hairless mouse skin. *Drug development and industrial pharmacy*, 17(16), 2145-2156.
- [413]. Welin-Berger, K., Neelissen, J. A., Bergenståhl, B. (2001). The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. *European journal of pharmaceutical sciences*, 13(3), 309-318.
- [414]. Utembe, W., Potgieter, K., Stefaniak, A. B., & Gulumian, M. (2015). Dissolution and biodurability: Important parameters needed for risk assessment of nanomaterials. *Particle and fibre toxicology*, 12(1), 11.
- [415]. Strona internetowa z oprogramowaniem Toxtree do estymacji toksyczności cząsteczki, www.toxtree.sourceforge.net (dostęp: 11.02.2017).
- [416]. Broszura informacyjna Skinasensyl, The Neurocosmeceutical Soother, LaboratoiresSérobiologiques, Division De Cognis France - 3, Rue De Seichamps - Cs71040 Pulnoy (France).
- [417]. Rezaelan, A.H. (2009). AlphaCGRP and betaCGRP transcript amount in mouse tissues of various developmental stages and their tissue expression sites. *Brain and Development*, 31(9), 682-693.
- [418]. Gilles, P. (2009). Skinasensyl® - A new peptidic active ingredient to reduce discomfort and painful sensations in sensitive skin. *IFSCC Magazine*, 12(1), 25-30.
- [419]. Fligiel, S. E., Varani, J., Datta, S. C., Kang, S., Fisher, G. J., & Voorhees, J. J. (2003). Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(5), 842-848.
- [420]. Kapuścińska, A., Olejnik, A., Nowak, I., Kamysz, W. Koniugat kwasu jasmonowego oraz tetrapeptydu YPFF. Numer zgłoszenia patentowego P.415331. Data przyjęcia zgłoszenia patentowego: 2015-12-22
- [421]. Łubkowska, B., Grobelna, B., Maćkiewicz, Z. (2013). Synthesis of α -collagen fragments and research of their influence on the degree of hydration of a model of epidermis. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 30(1), 6.
- [422]. Cheng, W., Yan-hua, R., Fang-gang, N., & Guo-an, Z. (2011). The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. *African Journal of Biotechnology*, 10(13), 2524-2529.
- [423]. Lamberg, A., Helaakoski, T., Myllyharju, J., Peltonen, S., Notbohm, H., Pihlajaniemi, T., Kivirikko, K. I. (1996). Characterization of Human Type III Collagen Expressed in a Baculovirus. *Journal of Biological Chemistry*, 271(20), 11988-11995.
- [424]. Olejnik, A., Nowak, I., Schroeder, G. (2009). The potential usage of MALDI Q-TOF technique for determination of peptides in cosmetics formulation. Application of molecular receptors, (5) 73 - 87.
- [425]. Draelos, Z. D. (2007). The latest cosmeceutical approaches for anti-aging. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 6(1), 2-6.
- [426]. Royston, P. (1992). Approximating the Shapiro-Wilk W-Test for non-normality. *Statistics and Computing*, 2(3), 117-119.
- [427]. Lodén, M., Lindberg, M. (1990). The influence of a single application of different moisturizers on the skin capacitance. *Acta dermato-venereologica*, 71(1), 79-82.

- [428]. Loden, M., Andersson, A. C., Andersson, C., Frödin, T., Öman, H., Lindberg, M. (2001). Instrumental and dermatologist evaluation of the effect of glycerine and urea on dry skin in atopic dermatitis. *Skin research and technology*, 7(4), 209-213.
- [429]. Overgaard, O. L., Jemec, G. B. (1993). The influence of water, glycerin, paraffin oil and ethanol on skin mechanics. *Acta dermato-venereologica*, 73(6), 404-406.
- [430]. Werner, Y. L. V. A., Lindberg, M. A. G. N. U. S. (1985). Transepidermal water loss in dry and clinically normal skin in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*, 65(2), 102-105.
- [431]. Chamlin, S. L., Kao, J., Frieden, I. J., Sheu, M. Y., Fowler, A. J., Fluhr, J. W., Elias, P. M. (2002). Ceramide-dominant barrier repair lipids alleviate childhood atopic dermatitis: changes in barrier function provide a sensitive indicator of disease activity. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 47(2), 198-208.
- [432]. Watson, A. L., Fray, T. R., Bailey, J., Baker, C. B., Beyer, S. A., Markwell, P. J. (2006). Dietary constituents are able to play a beneficial role in canine epidermal barrier function. *Experimental Dermatology*, 15(1), 74-81.
- [433]. Loden, M., Andersson, A. C., Lindberg, M. (1999). Improvement in skin barrier function in patients with atopic dermatitis after treatment with a moisturizing cream (Canoderm [R]). *British Journal of Dermatology*, 140(2), 264-267.