



UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

WYDZIAŁ CHEMII

PRACOWNIA CHEMII STOSOWANEJ

JOANNA IGIELSKA-KALWAT

PRACA DOKTORSKA

***BADANIA WPŁYWU FORM KOMSETYCZNYCH NA BIODOSTĘPNOŚĆ
WYBRANYCH KAROTENOIDÓW***

PROMOTOR:

PROF. DR HAB. IZABELA NOWAK

PROMOTOR POMOCNICZY:

DR JOANNA GOŚCIAŃSKA

POZNAŃ 2016

*Składam serdeczne podziękowania wszystkim
bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.*

*Dla promotora pracy Pani Prof. dr hab. Izabeli Nowak
za opiekę naukową, wyrozumiałość, cierpliwość, życzliwość
oraz pomoc i cenne wskazówki w trakcie realizacji i pisania niemniejszej pracy.*

Dla promotora pomocniczego Dr Joanny Gościańskiej

za opiekę naukową,

oraz za poświęcony czas.

*Dziękuję także,
Dr Annie Olejnik za cenne wskazówki,
pomoc w wykonywaniu badań, wsparcie,
wiarę we mnie oraz za życzliwość.*

*Mgr Alicji Kapuścińskiej za miłą atmosferę pracy,
życzliwość, dobre słowa, wsparcie
oraz za cenne wskazówki.*

*Rodzicom,
w podziękowaniu za ich miłość, ciepło, oparcie
które wciąż mi dajecie tak mało chcąc w zamian,
wszelką pomoc oraz trud jaki włożyliście w moje wychowanie.
Bez Was nie byłoby to możliwe.*

*Mężowi,
za wsparcie, oddanie, pomoc oraz
motywację w dążeniu
do spełniania marzeń.*

*Pracę dedykuję córce Leili,
dziękuję za bezwarunkową miłość,
którą obdarzasz mnie każdego dnia.*

”Ważne jest by nigdy nie przestać pytać.

Ciekawość nie istnieje bez przyczyny.

Kto nie potrafi pytać nie potrafi żyć.”

Albert Einstein

Spis treści

I.	WSTĘP	19
II.	CZEŚĆ LITERATUROWA.....	21
2.1.	Budowa skóry.....	21
2.1.1	Naskórek.....	22
2.1.2	Skóra właściwa.....	23
2.1.3	Tkanka podskórna	23
2.2.	Funkcje skóry	24
2.3.	Starzenie się organizmu	24
2.3.1.	Starzenie się skóry.....	25
2.3.2.	Przyczyny starzenia się skóry.....	25
2.3.3.	Teorie starzenia się skóry	28
2.4.	Fotostarzenie	28
2.4.1.	Fotoprotekcja.....	29
2.5.	Reaktywne formy tlenu oraz wolne rodniki	30
2.5.1.	Skutki działania reaktywnych form tlenu oraz wolnych rodników.....	33
2.6.	Antyoksydanty.....	35
2.6.1.	Podział antyoksydantów	35
2.6.2.	Mechanizm działania antyoksydantów	36
2.6.3.	Karotenoidy jako antyoksydanty.....	36
2.7.	Karotenoidy	37
2.7.1.	Budowa karotenoidów.....	38
2.7.2.	Podział karotenoidów	39
2.7.3.	Biosynteza karotenoidów	39
2.7.4.	Właściwości karotenoidów oraz ich zastosowanie	40
2.7.5.	Zastosowanie karotenoidów w przemyśle kosmetycznym	42
2.8.	β -karoten.....	43
2.8.1.	Budowa.....	44
2.8.2.	Właściwości i zastosowanie	45
2.8.3.	Zastosowanie w przemyśle kosmetycznym	46
2.9.	Likopen.....	47
2.9.1.	Budowa.....	47

2.9.2. Właściwości i zastosowanie	47
2.9.3. Zastosowanie w przemyśle kosmetycznym	49
2.10. Astaksantyna.....	50
2.10.1. Budowa.....	50
2.10.2. Właściwości i zastosowanie	50
2.10.3. Zastosowanie w przemyśle kosmetycznym	51
2.11. Badania <i>in vivo</i> formulacji kosmetycznych (testy na probantach)	51
2.11.1. Testy płatkowe	52
2.11.2. TRUE test	53
2.11.3. Testy powtarzanej otwartej aplikacji oraz prowokacyjny test używania	54
2.12. Analiza instrumentalna	55
2.13. Analiza sensoryczna	56
2.14. Badanie biodostępności dermalnej z wykorzystaniem metody zdzierania	56
2.15. Stabilność emulsji kosmetycznych.....	59
2.15.1. Rodzaje niestabilności emulsji	60
2.15.2. Przyczyny destabilizacji emulsji kosmetycznych	62
2.15.3. Metody stabilizacji emulsji ładunkiem elektrycznym.....	64
2.15.4. Metody polegające na „wzmocnieniu” powierzchni międzyfazowej	64
2.16. Metody badania składu form kosmetycznych	65
2.16.1. Badanie składu kremów komercyjnych zawierających karotenoidy za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)	65
2.17. Badanie kinetyki uwalniania z formulacji kosmetycznych	69
III. CEL PRACY	71
IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	73
4.1. Materiały wykorzystane w badaniach	73
4.1.1. Formułacje komercyjne	73
4.1.2. Samodzielnie przygotowane emulsje kosmetyczne	74
4.1.3. Wykaz odczynników chemicznych stosowanych w pracy.....	74
V. Metodyka.....	77
5.1. Preparatyka kremów	77
5.1.1. Przygotowanie kremów typu O/W	77
5.1.2. Przygotowanie kremów typu W/O	78
5.1.3. Przygotowanie kremów typu O/W na zimno.....	78
5.2. Ocena właściwości fizykochemicznych kremów zawierających karotenoidy	79

5.2.1. Pomiar lepkości	79
5.2.2. Badanie wartości pH.....	80
5.2.3. Określenie typu emulsji metodą mikroskopową	81
5.2.4. Określenie współczynnika refrakcji otrzymanych emulsji kosmetycznych.....	82
5.3. Oznaczanie zawartości karotenoidów w preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej	83
5.3.1. Oznaczanie β -karotenu	83
5.3.2. Oznaczanie likopenu	85
5.3.3. Oznaczanie stabilności β -karotenu oraz likopenu zawartych w samodzielnie przygotowanych formulacjach kosmetycznych	85
5.3.4. Oznaczanie astaksantyny.....	86
5.4. Analiza jakościowa karotenoidów zawartych w komercyjnych kremach metodą spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-IR)	86
5.5. Zdolność wygaszania wolnego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu przez komercyjne kremy zawierające karotenoidy	86
5.6. Pomiar stabilności emulsji kosmetycznych zawierających karotenoidy metodą wielokrotnego rozpraszania światła	87
5.7. Badanie rozkładu wielkości cząstek emulsji kosmetycznych techniką dyfrakcji laserowej.....	88
5.8. Badania <i>in vivo</i> przeprowadzone na probantach z wykorzystaniem samodzielnie przygotowanych emulsji kosmetycznych zawierających β -karoten	90
5.8.1. Aplikacja TRUE testów	90
5.8.2. Badania poziomu nawilżenia naskórka	91
5.8.3. Pomiar przeznaskórkowej utraty wody	91
5.8.4. Badanie poziomu elastyczności skóry.....	91
5.8.5. Kontrola jakości stosowanych kremów.....	92
5.8.6. Ocena sensoryczna	92
5.8.7. Ocena sensoryczno-hedonistyczna.....	94
5.9. Badanie kinetyki uwalniania karotenoidów z samodzielnie przygotowanych formulacji kosmetycznych	95
5.9.1. Pomiar wartości λ_{max} dla badanych karotenoidów.....	95
5.9.2. Przygotowanie buforu - płynu akceptorowego	95
5.9.3. Przygotowanie roztworu wzorcowego	96
5.9.4. Przygotowanie próbek.....	96
5.9.5. Ustalenie warunków pomiaru.....	96

5.9.6. Budowa i przygotowanie aparatury do pomiaru szybkości procesu uwalniania	96
5.10. Badanie biodostępności dermalnej β -karotenu za pomocą metody zdzierania.....	97
5.10.1. Metoda określania ilości zerwanego <i>stratum corneum</i> - metoda ważenia różnicowego... ..	98
5.10.2. Określenie ilości pozostałego β -karotenu w <i>stratum corneum</i> za pomocą pomiaru przeznaskórkowej utraty wody (TEWL).....	99
5.10.3. Określanie ilości zerwanego <i>stratum corneum</i> za pomocą metody spektroskopii optycznej	99
VI. WYNIKI BADAŃ I ICH DYSKUSJA.....	101
6.1. Ocena właściwości fizykochemicznych formułacji kosmetycznych zawierających karotenoidy.....	101
6.1.1. Pomiar lepkości.....	101
6.1.1. Samodzielnie przygotowane emulsje kosmetyczne zawierające karotenoidy.....	101
6.1.2. Kremy komercyjne zawierające karotenoidy.....	102
6.2. Badanie wartości pH.....	103
6.2.1. Samodzielnie przygotowane emulsje kosmetyczne zawierające karotenoidy.....	103
6.2.2. Kremy komercyjne zawierające karotenoidy.....	104
6.3. Określenie typu emulsji metoda mikroskopową.....	106
6.3.1. Samodzielnie przygotowane emulsje kosmetyczne typu O/W, W/O oraz O/W na zimno zawierające karotenoidy.....	106
6.3.2. Kremy komercyjne zawierające karotenoidy.....	106
6.4. Oznaczanie zawartości karotenoidów w preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.....	107
6.4.1. Oznaczanie β - karotenu.....	107
6.4.2. Oznaczanie likopenu.....	109
6.4.3. Oznaczanie stabilności β -karotenu oraz likopenu zawartych w samodzielnie przygotowanych formułacjach kosmetycznych.....	111
6.5. Analiza jakościowa karotenoidów zawartych w komercyjnych kremach metodą spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-IR).....	116
6.6. Pomiar zdolności wygaszania wolnego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu przez karotenoidy zawarte w kremach komercyjnych oraz samodzielnie przygotowanych.....	122

6.6.1. Pomiar zdolności wygaszania wolnego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu przez karotenoidy zawarte w samodzielnie przygotowanych emulsjach kosmetycznych O/W, W/O, O/W na zimno.....	122
6.6.2. Pomiar zdolności wygaszania wolnego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu przez karotenoidy zawarte w komercyjnych kremach.....	126
6.7. Pomiar stabilności emulsji kosmetycznych zawierających karotenoidy metodą wielokrotnego rozproszenia światła.....	130
6.8. Badanie rozkładu wielkości cząstek emulsji kosmetycznych techniką dyfrakcji.....	136
6.8.1. Samodzielnie przygotowane emulsje kosmetyczne zawierające różne karotenoidy...	136
6.9. Badania <i>in vivo</i> przeprowadzone na probantach z wykorzystaniem samodzielnie przygotowanych emulsji kosmetycznych zawierających β -karoten.....	154
6.9.1. Aplikacja TRUE testów.....	157
6.9.2. Wpływ testowanego preparatu na poziom nawilżenia naskórka probantów.....	160
6.9.3. Wpływ testowanego preparatu na wartość TEWL.....	163
6.9.4. Wpływ testowanego preparatu na poziom elastyczności naskórka probantów.....	165
6.9.5. Prezentacja testów zastosowanych w ocenie statystycznej parametrów nawilżenia, transepidermalnej utraty wody oraz elastyczności.....	168
6.9.6. Kontrola jakości stosowanych kremów.....	169
6.9.7. Ocena sensoryczno-jakościowa.....	170
6.9.8. Ocena sensoryczno-hedonistyczna.....	171
6.10. Badania kinetyki uwalniania β -karotenu z samodzielnie przygotowanej formułacji kosmetycznej.....	172
6.10.1. Badanie kinetyki uwalniania β -karotenu z emulsji typu O/W przygotowanej na zimno.....	172
6.11. Badanie biodostępności β -karotenu za pomocą metody wykorzystującej taśmy adhezyjne.....	173
6.11.1. Metoda określania ilości zerwanego <i>stratum corneum</i> - metoda ważenia różnicowego.....	173
6.11.2. Określenie ilości pozostałego β -karotenu w <i>stratum corneum</i> za pomocą pomiaru przez naskórkową utratę wody (TEWL).....	175

6.11.3. Określenie ilości zerwanego <i>stratum corneum</i> za pomocą metody spektroskopii optycznej.....	188
VII. WNIOSKI.....	193
VIII. STRESZCZENIE	197
VIII. SUMMARY	199
IX. LITERATURA.....	201
X. ZAŁĄCZNIKI.....	221
Załącznik nr 1.....	221
Załącznik nr 2.....	222
Załącznik nr 3.....	223
Załącznik nr 4.....	224
Załącznik nr 5.....	226
Załącznik nr 6.....	228
Załącznik nr 7.....	230
XI. SPIS PUBLIKACJI I KOMUNIKATÓW.....	239

SPIS AKRONIMÓW

Symbol	Rozwinięcie skrótu*
A	absorbancja [-]
A	powierzchnia badana [m ²]
A _p	absorbancja próbki [-]
A _s	powierzchnia pików uzyskana dla roztworu wzorca w jednostkach powierzchni [mAU·min]
A _x	powierzchnia pików uzyskana dla roztworu próbki do badań w jednostkach powierzchni [mAU·min]
A _w	absorbancja wzorca [-]
A ₀	absorbancja roztworu rodnika DPPH [•] po 30 minutach bez dodatku antyoksydantu [-]
A ₁	absorbancja roztworu rodnika DPPH [•] po 30 minutach w obecności antyoksydantu [-]
AIDS	zespół nabytego niedoboru odporności
ALPHAFLOW 20	uwodniony polidekan
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
ATR - IR	spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni
BS	światło wstecznie rozproszone przez próbkę
C	stężenie [mol/l]
c _s	stężenie roztworu wzorcowego o znanej czystości [μg/ml]
c ₁	prędkość światła w próżni [m/s]
C ₄₀	fitoene
C _w	czystość wzorca
Car	skrót od angielskiej nazwy karotenoidów - <i>carotenoids</i>
Car ^{•+} + ROO ^{•-}	kationorodnik karotenoidowy + anion peroksyalkoksydowy
CD95/FAS	rodzina receptorów CD95
CVD	choroby układu krążenia (ang. <i>cardiovascular disease</i>).
CREAGEL EZ7	poliakrylamid, uwodniony polidekan, eter laurylowy polioksyetyleny
ΔC	różnica w stężeniu wody pomiędzy naskórkiem a środowiskiem zewnętrznym [1 g /cm ⁻³]
D _w	rozcieńczenie wzorca
D	współczynnik dyfuzji wody w skórze właściwej
DNA	kwas dezoksyrybonukleinowy
DPPH [•]	rodnik 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu
DR3	receptor śmierci 3
EDRF	czynniki rozkurczowe pochodzenia śródbłonkowego
FDA	skrót od nazwy organizacji Food and Drug Administration
ET	transfer elektronów, w wyniku którego powstaje kationorodnik karotenoidowy
ε	molowy współczynnik absorpcji [dm ³ /molcm]
GGPP, C ₂₀ PP	difosforan digeranylu
H ₂ O ₂	nadtlenek wodoru
HO ₂ [•]	rodnik wodoronadtlenkowy
HAT	przeniesienie atomu wodoru na rodnik
HPLC	skrót od angielskiej nazwy wysokosprawnej chromatografii cieczowej, (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
hsp70	białko szoku cieplnego, (hsp - ang. <i>heat shock proteins</i>), hsp70 - białko średnicząsteczkowe (66–78 kDa)
K	współczynnik podziału woda-tłuszcz

I	grubość warstwy absorbującej [cm]
log P	współczynnik podziału woda/n-oktanol jako miara lipofilowości
L	grubość skóry właściwej
LDL	frakcja lipidowa o niskiej gęstości
$\lambda_{\max}$	maksymalna długość fali [nm]
m	masa próbki [g]
m	ilość usuniętej tkanki badanego probanta [g]
m_p	masa substancji oznaczanej zawartej w próbce [mg]
m_w	masa wzorca [mg]
MMPs	metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej, (ang. <i>matrix metalloproteinases</i>)
NO[•]	rodnik tlenu azotu (II)
NO₂^{••}	kationorodnik ditlenku azotu (IV)
n	współczynnik załamania światła [-]
¹O₂	tlen singletowy
O₂^{•-}	anionorodnik ponadtlenkowy
O₃	ozon
OH[•]	rodnik hydroksylowy
OK	bezwymiarowy współczynnik elastyczności skóry
ONOO⁻	anion nadtlenkowo-azotowy
O/W na zimno	emulsja typu olej w wodzie sporządzana na zimno
O/W	emulsja typu olej w wodzie sporządzana na gorąco
p	gęstość tkanki [g/m ³]
P	masa próbki [g]
P450	cytochrom P450
p53	białko - czynnik transkrypcyjny odgrywający rolę podczas aktywacji zaprogramowanej śmierci komórki
PSY	syntaza fitoenu (ang. <i>phytoene synthase</i>)
PUT	provokacyjny test używania (ang. <i>Provocative Use Test</i>)
% Inhibicji	procent wygaszania wolnych rodników
RAF	tworzenie adduktu rodnikowego, (ang. <i>radical adduct formation</i>)
ROAT	testy powtarzanej otwartej aplikacji (ang. <i>Repeated Open Application Test</i>)
ROS	reaktywne formy tlenu, (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
ROO[•]	rodnik peroksyalkoksyłowy
[ROO.....Car][•]	addukt rodnik peroksyalkoksyłowo-karotenoidowy
ROS	reaktywne formy tlenu, (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
RO₂[•]	rodnik peroksyłowy
RS[•]	rodnik tiolowy
RSO[•]	rodnik sulfinyłowy
RSO₂[•]	rodnik sulfonyłowy
RSOO[•]	rodnik ponadtlenkowy tiolowy
RSO₂OO[•]	rodnik ponadtlenkowy sulfonyłowy
SC	warstwa rogowa naskórka, (łac. <i>stratum corneum</i>)
SLS	laurylosiarczan sodu, detergent o charakterze jonowym (ang. <i>Sodium Lauryl Sulfate</i>)
SO₂[•]	rodnik ditlenkusiarki
T	światło przechodzące przez próbkę
TEWL	przezskórkowa utrata wody, (ang. <i>Transepidermal Water Loss</i>)
TEWL₀	TEWL odniesienia z pola kontrolnego nie poddanego strippingowi
TNFR1	rodzina receptora czynnika martwicy nowotworów
TRAIL	ligand indukujący apoptozę, (ang. <i>related apoptosis-inducing ligand</i>)
TNF	czynnik martwicy nowotworu, (ang. <i>tumor necrosis factor</i>)
TRUE test	test płatkowy, (ang. <i>thin-layer rapid use epicutaneous test</i>)

UV	promieniowanie ultrafioletowe o długości fali 100-400nm
UVA	promieniowanie ultrafioletowe o długości fali 320-400 nm
UVA 1	promieniowanie ultrafioletowe o długości fali 340-400nm
UVA 2	promieniowanie ultrafioletowe o długości fali 320-340 nm
UVB	promieniowanie ultrafioletowe o długości fali 290-320 nm
UVC	promieniowanie ultrafioletowe o długości fali 100-290 nm
V	prędkość światła w badanym ośrodku [-]
V	całkowita objętość roztworu próbki do badań [cm ³]
v₁, v₂	prędkość światła w dwóch różnych ośrodkach
VDE	aktywna deepoksydaza wiolaksantyny, (ang. <i>active violaxanthin de-epoxidase</i>)
vis	światło widzialne o długości fali 400-780 nm
W/O	emulsja typu woda w oleju sporządzana na gorąco
x	głębokość ingerencji w tkankę [m]

* w nawiasach kwadratowych podano jednostki, jeśli występują.

I. WSTĘP

Skóra jest największym organem ludzkiego ciała. Złożona jest z trzech warstw: naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej. Spełnia bardzo ważne funkcje dla naszego organizmu. Starzenie się skóry jest nieuniknionym, biologicznym oraz psychicznym procesem określanym, jako zespół postępujących w czasie zmian, które są badane już od dziesięcioleci.

Wiele problemów zdrowotnych spowodowanych jest zanieczyszczeniem środowiska naturalnego oraz żywności, niewłaściwym sposobem odżywiania, stresem związanym z rosnącym tempem życia codziennego oraz wolnymi rodnikami, atakującymi nasz organizm. Czynniki te stwarzają większe lub mniejsze zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Współczesna medycyna radzi sobie z różnymi schorzeniami, najczęściej poprzez stosowanie terapii za pomocą syntetycznych leków, które bardzo często nie leczą przyczyn choroby, a jedynie jej objawy. Ich stosowanie, zwłaszcza w chorobach przewlekłych, związane jest z ryzykiem występowania różnorodnych objawów ubocznych. Bardzo racjonalna wydaje się profilaktyka, związana z właściwym sposobem odżywiania. Odpowiednio dobrana dieta obfituje w substancje i składniki pochodzenia naturalnego, które wywierają dobroczynny wpływ na funkcjonowanie organizmu człowieka. Sama przyroda dała nam szansę na poprawę kondycji naszego zdrowia i jakości życia. Większość substancji pochodzenia naturalnego korzystnie oddziałuje na organizm człowieka. Bardzo ważną rolę w przeciwdziałaniu powstawania wolnorodnikowych uszkodzeń pełnią związki hamujące tworzenie wolnych rodników lub uczestniczące w ich przekształcaniu w nieaktywne pochodne. Związki te nazywamy antyoksydantami. Do silnych, naturalnych antyoksydantów, należą karotenoidy. Karotenoidy zaliczane są zarówno do antyoksydantów prewencyjnych jak i interwencyjnych.

Związki te zbudowane są z 11 sprzężonych wiązań podwójnych, dzięki którym można je zaliczyć do grupy poliizoprenoidów. Mogą występować w postaci acyklicznej, monocyklicznej lub bicyklicznej. Do grupy karotenoidów, charakteryzujących się najsilniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi, należą: astaksantyna, likopen, luteina, oraz β -karoten. Związki te dzięki silnym właściwościom antyoksydacyjnym znalazły szerokie zastosowanie w medycynie, przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Karotenoidy charakteryzują się wysoką aktywnością, zarówno wobec reaktywnych form tlenu jak i wolnych rodników.

Branża przemysłu kosmetycznego jest jedną z najbardziej dynamicznie ewoluujących sektorów w Polsce, a światowy kryzys nie spowodował ograniczenia wydatków Polaków na produkty kosmetyczne. Wzrost poziomu życia oraz wydłużający się okres aktywności zawodowej powoduje, że coraz częściej i chętniej konsumenci korzystają z szerokiej gamy produktów kosmetycznych, co powoduje, że czują się bardziej atrakcyjni i młodzi. Według szacunków PMR Consulting w 2012 roku w Polsce wydano ponad 19 mld zł na kosmetyki. Największy udział w łącznej sprzedaży osiągnęły kosmetyki do pielęgnacji twarzy (17,6%). W okresie 2013-2015 możemy spodziewać się średniorocznego wzrostu rynku na poziomie ponad 4%, jak wynika z najnowszego raportu PMR Consulting pt. „Rynek dystrybucji artykułów kosmetycznych w Polsce 2013. Analiza rynku i prognozy rozwoju na lata 2013-

2015”. Firmy kosmetyczne zdają sobie sprawę, że kosmetyka stała się dla współczesnych kobiet „źródłem młodości” i dała nadzieję na zatrzymanie upływającego czasu. Jak pokazują wyniki, społeczeństwo potrzebuje wprowadzania na rynek konsumencki coraz to nowych produktów kosmetycznych, zawierających skuteczne substancje aktywne rozwiązujące problemy nie tylko natury zdrowotnej, ale także poprawiające samopoczucie konsumentów. Życie w zgodzie z naturą jest w Polsce coraz bardziej modne, a co się z tym wiąże, kosmetyki oparte na bazie naturalnych składników cieszą się dużą popularnością. Rokuje to w najbliższych latach wzrostem ich sprzedaży w granicach 10%. Jak przewidują analitycy Mintel Beauty Int., głównym kierunkiem rozwoju przemysłu kosmetycznego w kolejnych latach będzie trend „Down to Earth”. Szczególny nacisk zostanie położony na propagowanie idei kosmetyków naturalnych i organicznych. Można wykorzystać w tym celu naturalne barwniki - karotenoidy. Posiadają one udokumentowaną skuteczność. Podejmowane są próby ich zastosowania w produktach kosmetycznych, przeznaczonych do pielęgnacji skóry.

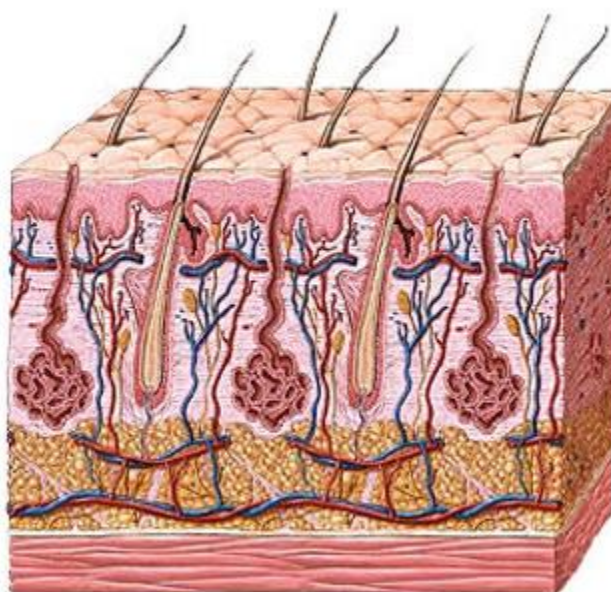
W niniejszej pracy doktorskiej potwierdzono wysoką skuteczność karotenoidów za pomocą badań *in vivo*, czyli przez użycie testów aplikacyjnych na skórze człowieka. Stwierdzono poprawę poziomu nawilżenia skóry, przeskórną utraty wody, elastyczności skóry oraz jej natłuszczenia po zastosowaniu kremu z karotenoidami. Udowodniono także ich biodostępność za pomocą metody strippingu.

Przeprowadzono badania analityczne mające na celu potwierdzenie obecności wyżej wymienionych związków w kremach komercyjnych wprowadzonych na rynek kosmetyczny.

II. CZĘŚĆ LITERATUROWA

2.1. Budowa skóry

Skóra jest największym organem ludzkiego ciała. Złożona jest z trzech warstw: naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej (rys. 1). Ponadto zawiera gruczoły potowe i łojowe, mieszki włosowe, naczynia krwionośne i chłonne, zakończenia nerwowe oraz narządy zmysłu [1-3].



Rys. 1. Budowa skóry [4].

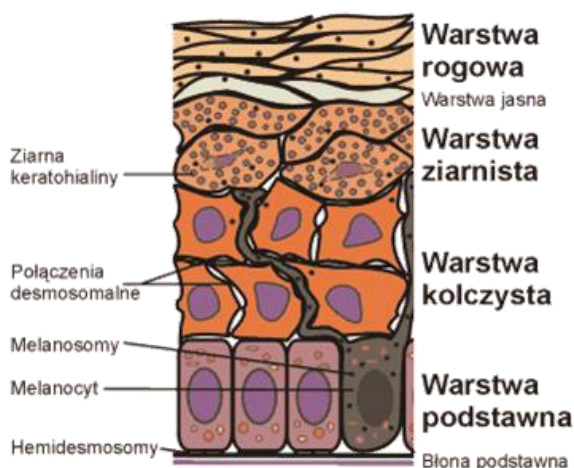
2.1.1 Naskórek

Naskórek (łac. *epidermis*) (rys. 2) jest warstwą powierzchnią skóry, zbudowaną z komórek zwanych keratynocytami składających się z nierozpuszczalnego białka (głównie keratyny) odpornego na czynniki fizyczne i chemiczne. Jego grubość średnio nie przekracza 100 μm i jest większa w przypadku podeszwy dłoni i stóp. Naskórek utworzony jest przez nabłonek wielowarstwowy płaski rogowaciejący i dzieli się na 4 warstwy. Pierwszą z nich jest warstwa podstawna (łac. *stratum basale*) mieszcząca się najniżej. Znajdują się tu komórki o jądrach z widocznym podziałem, stąd zwana jest warstwą rozrodczą. Ponadto w warstwie tej występują melanocyty (komórki barwnikowe wytwarzające i magazynujące melaninę), komórki Langerhansa (komórki dendrytyczne biorące udział w procesach odpornościowych) oraz komórki Merkla (receptory stykające się z komórkami nerwowymi). Następną, warstwą koleczystą (łac. *stratum spinosum*), zawiera kilka rzędów komórek o różnych kształtach, które przemieszczając się ku wyższym warstwom ulegają stopniowemu spłaszczeniu. Kolejną strukturą jest warstwa ziarnista (łac. *stratum granulosum*) posiadająca kilka rzędów komórek tym razem o wrzecionowatych kształtach i spłaszczonych jądrach. Strefa pośrednia - warstwa jasna, inaczej świetlana (łac. *stratum intermediale, lucidum*) - jest to wąskie pasmo leżące ponad warstwą ziarnistą, typowe dla grubych naskórków np. na podeszwie, a dające się odróżnić od pozostałej warstwy rogowiej w cienkich naskórkach jedynie na podstawie

specjalnych badań histologicznych. Ma ona duże znaczenie w zaburzeniach rogowacenia. Ostatnia i najwyższa położona warstwa rogowa (łac. *stratum corneum*, SC) zawiera już tylko spłaszczone komórki niezawierające jądra. Komórki połączone są między sobą wypustkami błony komórkowej (desmosomy) oraz specjalnymi cząsteczkami ułatwiającymi przyleganie i kontakt. W warstwie rogowej komórki ułożone są luźno i ulegają złuszczeniu. Średni czas prawidłowego przejścia komórki przez wszystkie warstwy (od warstwy najniższej do najwyższej) wynosi 28 dni [1].

Naskórek połączony jest ze skórą właściwą poprzez błonę podstawną. Błona podstawna tworzona jest zarówno przez naskórek, jak i skórę właściwą, składa się z blaszki jasnej i blaszki ciemnej. Przebieg połączenia nie jest prostoliniowy, lecz falisty. Jej podstawą są białka tj. laminina, kolagen, proteoglikany. Keratynocyty przytwierdzone są do błony podstawnej za pomocą integryn, czyli przezłonowych cząsteczek odpowiedzialnych za przyleganie komórek [2,3].

Zadaniem naskórka jest oddzielenie organizmu od otoczenia, ochrona głębszych warstw skóry przed działaniem czynników zewnętrznych oraz zapobieganie przeznaskórkowej utracie wody - TEWL (ang. *transepidermal water loss*). Zawarta w naskórku melanina, poza nadaniem koloru włosom oraz skórze, do pewnego stopnia zabezpiecza skórę przed szkodliwym działaniem promieniowania ultrafioletowego [1-4].



Rys. 2. Budowa naskórka [5].

2.1.2 Skóra właściwa

Skóra właściwa (łac. *dermis*, *corium*) jest pochodzenia mezodermalnego. Składa się z dwóch warstw tkanki łącznej właściwej: warstwy brodawkowatej oraz siateczkowatej. Jest bogato unerwiona, zawiera naczynia limfatyczne, krwionośne, gruczoły, zakończenia nerwowe oraz przydatki skóry [1].

Warstwa brodawkowata (łac. *stratum papillare*) obejmuje brodawki, które zawierają liczne drobne naczynia krwionośne. Składa się z komórek, głównie fibrocytów i fibroblastów, które produkują białka, takie jak: kolagen i elastyna oraz proteoglikany [1].

Warstwa siateczkowata (łac. *stratum reticulare*) powstaje z nieregularnie utkanej tkanki łącznej zbitej. Obejmuje głębsze warstwy aż do tkanki podskórnej. Zawiera trzy rodzaje włókien [1-6]:

- włókna kolagenowe typu I i III, które stanowią podstawę składową pościeliska łącznotkankowego, zaś w obrębie błon podstawowych naczyń oraz błony podstawowej naskórka obecny jest kolagen IV. Zadaniem włókien jest wzmacnianie struktury skóry. Kolagen jest białkiem zbudowanym z aminokwasów: glicyny, L-lizyny, L-proliny, L-hydroksylizyny oraz L-hydroksyproliny, które są ułożone w formie trójżyłowej liny. W wyniku połączenia pięciu takich układów powstaje jedna fibryla kolagenowa.
- włókna sprężyste przeplatają się z włóknami kolagenowymi. Zapewniają skórze sprężystość i rozciągliwość. Znajdują się w przewodzie w powierzchniowych warstwach skóry właściwej, gdzie oplatają włókna kolagenowe. Wraz z upływem czasu oraz promieniowania ultrafioletowego zachodzi zjawisko elastozy, w wyniku którego włókna elastynowe i kolagenowe zbijają się w bezpostaciową masę. Proces agregacji tych włókien w sposób nieodwracalny pozbawia je ich funkcji. Ponadto u ludzi starszych postępuje proces zmniejszenia syntezy kolagenu i proteoglikanów, czego konsekwencją są zmiany w tkance łącznej: powstawanie zmarszczek i bruzd, zmniejszenie elastyczności oraz zwiększenie wrażliwości skóry.
- włókna retikulinowe zbudowane są z retikuliny i w formie kratki oplatają tkanki podporowe skóry właściwej. Spośród wszystkich trzech typów włókien występujących w warstwie siateczkowatej, to właśnie włókna retikulinowe mają najdelikatniejszą strukturę. Jako pierwsze ulegają degradacji w trakcie procesu starzenia.

2.1.3 Tkanka podskórna

Tkanka podskórna (łac. *subcutis*) zbudowana jest ze zrazików tłuszczowych, które są przedzielone zbitą tkanką łączną włóknistą. W przestrzeniach międzyzrazikowych tkanki podskórnej zawarte są części wydzielnicze gruczołów potowych, naczynia krwionośne, włókna oraz upostaciowane zakończenie nerwowe. Zadaniem komórek tłuszczowych tkanki podskórnej jest magazynowanie tłuszczu, wytwarzanie go podczas procesu lipogenezy oraz przekształcanie glukozy w kwasy tłuszczowe [4].

2.2. Funkcje skóry

Skóra spełnia bardzo ważne funkcje dla całego organizmu. Najważniejszą jej rolą jest osłanianie narządów wewnętrznych przed wpływem środowiska zewnętrznego, równocześnie utrzymując równowagę między ustrojem i otoczeniem. Odgrywa również rolę [2,7]:

- ochronną w odniesieniu do czynników mechanicznych, fizycznych, chemicznych i bakteryjnych,
- w regulacji cieplnej,
- w czynności resorpcyjnej (wchłanianie poprzez skórę),
- jako narząd czucia,
- w metabolizmie białek, lipidów, węglowodanów, witamin (rozpuszczalnych w tłuszczach, jak i w wodzie),
- w procesie odpornościowym ustroju,

- regulatora prawidłowego przebiegu melanogenezy, podczas której w naskórku produkowana jest melanina pomagająca chronić organizm przed szkodliwym działaniem promieniowania UV.

2.3. Starzenie się organizmu

2.3.1. Starzenie się skóry

Starzenie się skóry jest nieuniknionym, biologicznym oraz psychicznym procesem, określanym jako zespół postępujących w czasie zmian, które są badane już od dziesięcioleci. Zmiany te polegają między innymi na [8,9]:

- zmniejszeniu biologicznej aktywności komórek organizmu,
- spowolnieniu procesów regeneracyjnych,
- obniżeniu odporności oraz odpowiedzi na stres środowiskowy,
- obniżeniu właściwości adaptacyjnych organizmu znajdującego się pod kontrolą czynników genetycznych [8,9].

Powstałe zmiany powodują, że organizm staje się bardziej podatny na uszkodzenia i choroby. W ostateczności doprowadzają do zgonu [10].

Skóra stanowi bardzo dobry model badawczy w odniesieniu do całościowego zjawiska starzenia. Jest ona bezpośrednio narażona na destrukcyjne działanie czynników zewnętrznych i ulega starzeniu szybciej niż pozostałe narządy naszego ciała. Poznanie mechanizmów starzenia się pozwala nam zrozumieć, w jaki sposób musimy zapobiegać i przeciwdziałać temu procesowi. Jest to proces wieloczynnikowy, regulowany przez czynniki genetyczne, jak i środowiskowe. Za proces ten odpowiada zespół genów warunkujący podziały komórkowe, procesy naprawy antyoksydacyjnej i DNA oraz obronny immunologiczny [9,10].

Głównym objawem starzenia skóry są zmarszczki, które mogą pojawić się na twarzy, szyi, dekolcie oraz na dłoniach. Można je podzielić na powierzchniowe i głębokie. Pierwsze z nich sięgają nie głębiej niż 0,05 mm, natomiast drugie są głębsze niż 0,05 mm. Innymi skutkami starzenia się skóry są: suchość, bladość, przebarwienia oraz utrata jędrności. W naskórku zachodzą nieodwracalne zmiany. Warstwa ziarnista i kolczysta (rys. 1) zanikają, przez co naskórek staje się cienki. Warstwa rozrodcza spłaszcza się z powodu zmniejszenia aktywności podziałowej jej komórek. Pogarsza się łączność naskórka ze skórą właściwą co powoduje zmniejszenie wydajności wymiany substancji odżywczych. W skórze właściwej zmniejsza się aktywność i synteza fibroblastów, które odpowiedzialne są za produkcję kolagenu i elastyny, skóra traci elastyczność i powstają zmarszczki. Z wiekiem produkcja kolagenu spada. Ze względu na słabą aktywność syntezy włókien, zmienia się sieciowanie nowych włókien podporowych. Włókna te robią się sztywne, twarde, nierówne oraz chaotycznie rozmieszczone. U starszych osób dochodzi nawet do zmian grubości ścian naczyń. Z biegiem czasu zmniejsza się liczba gruczołów łojowych, co powoduje spadek ochrony bariery skórnej. W warstwie rogowej występują ceramidy, które należą do grupy lipidów naturalnych istniejących w skórze. Pełnią one rolę cementu międzykomórkowego, tym samym zapobiegając utracie wody z organizmu oraz chroniąc skórę przed szkodliwymi

czynnikami. Powyżej 40 roku życia ceramidy przestają być produkowane co powoduje zwiększenie utraty wody oraz przesuszenie skóry [8,11].

2.3.2. Przyczyny starzenia się skóry

Na starzenie się skóry ma wpływ wiele czynników, które powodują zmiany w jej strukturze, wyglądzie oraz wydajności pełnionych przez nią funkcji [12,13].

Czynniki powodujące starzenie dzielimy na [8,11-16]:

- endogenne (mechanizmy wrodzone):
 - wiek (starzenie chronologiczne),
 - hormony (starzenie menopauzalne),
 - mimika (miostarzenie),
 - odkładanie się w organizmie szkodliwych toksyn,
 - szkodliwe działanie wolnych rodników,
 - osłabienie działania układu immunologicznego,
 - genetyczne.
- egzogenne (zachodzące pod wpływem środowiska zewnętrznego):
 - nadmierna ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe (fotostarzenie),
 - dym papierosowy („skóra palacza”),
 - zanieczyszczenia środowiska,
 - klimat,
 - niehigieniczny tryb życia i niewłaściwy sposób pielęgnacji skóry,
 - zła dieta,
 - stres,
 - infekcje.

2.3.3. Teorie starzenia się skóry

Wyróżniamy wiele teorii wyjaśniających źródła i przyczyny starzenia się organizmu: genową, organicznej liczby podziałów, zaburzeń białkowych, błonową (membranową) i teorię mitochondrialną [17-19].

▪ Teoria genowa

Teoria genowa zakłada, że maksymalny czas życia gatunku ludzkiego przy odpowiednim dbaniu o kondycję organizmu powinien wynosić ok. 120 lat. W badaniach przeprowadzonych przez Gilhara i wsp. [17] zamrożono na 30 lat ludzkie fibroblasty, które następnie odmrażano po określonych interwałach czasowych. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że komórki te cechują się nie tylko pamięcią wyznaczonego im programu życiowego, ale także określonym w każdej z nich terminem końca życia. Starzenie zależy od wielu zmian zachodzących we wnętrzu komórek ludzkiego organizmu. Zjawisko „pamięci komórkowej” powoduje opóźnienie produkowania przez komórki skóry nowych włókien podporowych i zmniejszenie zdolności regeneracyjnych naskórka. Zmniejszeniu ulega ekspresja genów, które są odpowiedzialne za proliferację, co

powoduje, że w starzejącej się skórze hamowane są procesy wzrostu, a zaczynają dominować procesy zanikowe [17,18-20]. Teoria genetyczna zakłada, że źródłem zakodowanych informacji jest DNA jądrzastych komórek skóry. W tym samym miejscu umiejscowione są geny odpowiadające za tempo i charakter starzenia się. Istotną rolę w procesie starzenia odgrywa endogenne uszkodzenie jądrowego DNA [21-23]. Powstaje ono na skutek tlenowego metabolizmu komórkowego, który prowadzi do utworzenia wolnych rodników, odpowiedzialnych za uszkodzanie struktur komórkowych, przede wszystkim białek i materiałów genetycznych [24].

W dzisiejszych czasach zidentyfikowano około 100 genów, które prawdopodobnie odpowiadają za procesy starzenia się skóry. Dzielimy je na [19,24-26]:

- geny odpowiedzialne za odpowiedzi na stres:
 - geny chroniące przed procesami oksydacyjnymi (SOD2),
 - geny powodujące naprawę DNA (geny kodujące enzym typu helikaza DNA),
 - geny odpowiadające za niszczenie komórek nowotworowych (np. białko *p53*),
- geny związane z regulacją substancji energetycznych (metabolizm insuliny, regulacja wzrostu),
- geny odpowiedzialne za podział komórkowy (telomerazy).

Stwierdzono, że oksydacyjne uszkodzenia DNA przyspieszają proces starzenia [19,24-26].

▪ **Teoria ograniczonej liczby podziałów komórki - teoria Hayflicka**

Jedna z teorii zajmująca się uszkodzeniem genów stwierdza, że wraz z upływem czasu zmniejsza się aktywność telomerazy - enzymu, który odpowiada za replikację chromosomów. Większość komórek człowieka traci sekwencje telomerowe po każdym podziale komórkowym. Hayflick określił limit podziałów prawidłowych komórek w hodowli *in vitro* [27-29]. Prawidłowe fibroblasty dzielą się kilkadziesiąt razy w warunkach *in vitro*, następnie obumierają. Liczba podziałów komórek uzależniona jest od ich wieku. Komórki osoby młodej dzielą się większą liczbą razy w porównaniu z komórkami osoby dorosłej. Limit Hayflicka około 50-60 podziałów komórki jest wyznacznikiem wieku i starzenia się komórki [27]. W kolejnych podziałach dochodzi do skracania telomerów i w końcu do programowej śmierci komórki. Hodowane *in vitro* komórki somatyczne pobrane od małego dziecka dzielą się większą ilość razy niż komórki osób dorosłych [30]. Długość telomerów zmniejsza się z wiekiem dawcy i z liczbą podziałów komórek [31].

Zanikanie telomerazy skutkuje utratą ważnych do życia komórek informacji, które z biegiem czasu ulegają obumarciu. Skracanie telomerów uznaje się za „wewnętrzny kalendarz”, który mierzy okres funkcjonowania oraz życia komórek. Stwierdza się, że czynnik dziedziczny jest w 30% odpowiedzialny za starzenie się organizmu [32-34]. Wybrane preparaty kosmetyczne, np. Telomeric Dr Ireny Eris, mają za zadanie wpłynąć na poziom telomerazy w skórze.

▪ Teoria zaburzeń białkowych

Bezpośredni związek z procesem starzenia się organizmu ma proces upośledzenia syntezy białka. Synteza ta maleje wraz z wiekiem o ok. 20 - 80% i powoduje upośledzenie funkcji organizmu. [35-36]. Homeostaza naskórka regulowana jest przez procesy apoptozy oraz końcowego różnicowania. Apoptoza jest aktywnym procesem śmierci komórki zwanym genetycznie zaprogramowanym samobójstwem. Dzięki temu mechanizmowi z organizmu usuwane są zużyte lub uszkodzone komórki. Przekazanie sygnału odbywa się drogą zewnątrz- lub wewnątrzpochodną. Sygnał pochodzenia zewnątrzkomórkowego jest przekazywany na receptory śmierci zlokalizowane na błonie komórkowej. Odnaleziono przynajmniej osiem białek należących do rodziny receptorów śmierci. Zaliczamy do nich następujące rodziny białek: p75NTR, rodzina receptora czynnika martwicy nowotworów (TNFR1) i receptor śmierci 3 (DR3), rodzina receptora CD95 (CD95/FAS) oraz rodzina receptora dla liganda powiązanego z czynnikiem martwicy nowotworów, wywołującego apoptozę (TNF - *related apoptosis - inducing ligand receptor*; TRAIL. Droga wewnątrzpochodna - sygnał o programowanej śmierci komórki pochodzi od białkowych czynników wewnątrzkomórkowych niezwiązanych z receptorami błony komórkowej, natomiast związanych z mitochondriami. Promieniowanie, wolne rodniki, toksyny czy wirusy mogą uszkodzić komórkowe DNA, aktywować apoptozę na drodze wewnątrzpochodnej. W wyniku uszkodzenia DNA obok uruchomienia mechanizmów naprawczych dochodzi również do ekspresji cytoplazmatycznych białek proapoptotycznych, które wbudowują się w wewnętrzną błonę mitochondrialną [37,38].

▪ Teoria błonowa (membranowa)

Profesor Imre Zs - Nagy [39] z Uniwersytetu w Debreczynie na Węgrzech zaproponował kolejną teorię, która zakłada, że wraz z pogłębieniem się procesu starzenia się organizmu zmienia się skład błon komórkowych. Zwiększa się zawartość lipidów kosztem wody. Powoduje to utrudnienie transportu substancji przez błonę. Zmiany, które towarzyszą procesowi starzenia się odpowiedzialne są za wzrost lepkości oraz sztywności błon komórkowych [40,41].

▪ Teoria mitochondrialna

Zgodnie z teorią mitochondrialną śmierć komórek wiąże się z zaburzeniami występującymi w obrębie mitochondriów. Wraz z upływem czasu maleje ich liczba oraz aktywność, co prowadzi do zmniejszenia produkcji adenozynotrifosforanu (ATP). W związku z tym, że zwiększa się liczba uszkodzeń, które nie podlegają systemowi naprawy, następuje spadek liczby ATP, jak i zmniejszenie zdolności regeneracyjnych komórek [42-43]. Duże znaczenie dla tempa tego procesu ma odżywianie organizmu, dlatego ważna jest zbilansowana, odpowiednia niskokaloryczna dieta, która zawiera mniej niż połowę wskazanej dawki energii. Nadmierna ilość pożywienia nasila procesy lipoperoksydacji i glikozylacji powodujące powstawanie wolnych rodników, które uszkadzają zarówno błony komórkowe, jak również materiał genetyczny komórki [24].

2.4. Fotostarzenie

Fotostarzenie - starzenie się skóry pod wpływem światła, można traktować jako proces stopniowego bliznowacenia, który jest nasilany przez inne czynniki środowiskowe, takie jak [44,45]:

- palenie tytoniu,
- zanieczyszczenie powietrza,
- brak snu,
- niewłaściwa dieta,
- czynniki hormonalne,
- choroby.

Korzystne, jak i niekorzystne efekty działania słońca na organizm człowieka wiążą się z emitowaniem promieniowania elektromagnetycznego. W jego skład wchodzi promieniowanie podczerwone o długości fali > 800 nm, światło widzialne w zakresie 400-800 nm i promieniowanie ultrafioletowe (UV), które składa się z 3 zakresów fal, tj. UVC, UVB i UVA. Promieniowanie UVC o długości fali 100-290 nm w warunkach standardowych nie dociera do powierzchni Ziemi, jest prawie w całości pochłaniane przez warstwę ozonową atmosfery. Uszkadza rogówkę, posiada działanie bakteriobójcze i rumieniotwórcze. Promieniowanie UVB o długości fali 290-320 nm powoduje oparzenia skóry, natomiast promieniowanie UVA w zakresie 320-400 nm jest odpowiedzialne za przebarwienia natychmiastowe i reakcje opóźnione. Wyróżniamy dwa zakresy UVA: UVA1 (340-400 nm) i UVA2 (320-340 nm). Mają one działanie barwnikowe i rumieniotwórcze. Około 90-95% promieniowania słonecznego docierającego do powierzchni Ziemi to promieniowanie UVA [45-47]. Promieniowanie UVA w 50% przenika do warstwy siateczkowej i brodawkowatej skóry właściwej, natomiast UVB jest zatrzymywane w 90% przez warstwę rogową naskórka [45,46]. W tabeli 1 przedstawiono głębokości wnikania poszczególnych promieniowań UV do różnych warstw skóry [48]. Skutki biologiczne oddziaływania promieniowania UV na skórę uzależnione są od jego natężenia i długości fali. Charakteryzują się reakcjami wczesnymi w postaci rumienia, oparzenia słonecznego oraz reakcjami odległymi, które związane są z uszkodzeniem skóry na poziomie molekularnym i biologicznym, w skład których wchodzi zaburzenia pigmentacji, rozwój zmian przedrakowych i nowotworów [48]. Promieniowanie UVA wzmacnia w obrębie naskórka działania promieni UVB, co powoduje uszkodzenie tkanki łącznej [45,46]. W skórze właściwej dochodzi do upośledzenia mikrokrążenia i zaburzeń angiogenezy oraz pofragmentowania włókien sprężystych.

Tab. 1. Głębokość przenikania promieniowania UV przez skórę [48].

		Rodzaje promieniowania	
		UVA 320-400 nm	UVB 290-320 nm
głębokość przenikania	naskórek		
	skóra właściwa		
	tkanka podskórna		

Docierające do powierzchni skóry promieniowanie świetlne wywiera zarówno pozytywne jak i negatywne skutki. Jego zaletą jest udział w syntezie witaminy D₃, pobudzanie melanocytów do produkcji melaniny, zwiększenie produkcji endorfin, powodujących lepsze samopoczucie oraz pomoc w leczeniu niektórych chorób dermatologicznych, np. bielactwa [48].

Zmiany histopatologiczne i kliniczne pojawiające się pod wpływem promieniowania UV przedstawiono w tabeli 2 [48].

Tab. 2. Cechy histologiczne i kliniczne procesu fotostarzenia skóry [48].

Cechy histologiczne	Cechy kliniczne
pogrubiała warstwa rogową wskutek degradacji desmosomów, tworzenie się mikroszczelin i konglomeratów komórek częściowo oderwanych	naskórek pogrubiały, suchy, łuszczący się, szorstki
uszkodzenia DNA, keratynocytów, apoptoza, dysplazja	rogowacenie słoneczne, nowotwory podstawnokomórkowe i kolczystokomórkowe, czerniak
uszkodzenie melanocytów - zwiększenie ich liczby, hiperplazja, dysplazja, proliferacja	przebarwienia, piegi, plamy soczewicowate, słoneczne, gwieździste blizny rzekome, plamy odbarwione
naskórkowe inkluzyjne cysty	prosaki posłoneczne
przerost gruczołów łojowych	żółtawe guzki, szorstkie zgrubienia skóry, rozszerzone ujścia z wydobywającą się wydzieliną łojową
mieszkowa hiperkeratoza	zaskórniki słoneczne
pogrubienie włókien elastycznych i nieład, zjawisko elastozy, zwyrodnienie włókien kolagenowych, zmniejszenie ilości kolagenu typu I, nacieki limfohistiocytarne z neutrofilów, makrofagów oraz mastocytów, zwiększenie liczby glikozaminoglikanów macierzystych skóry właściwej	pogrubienie skóry, głębokie zmarszczki i bruzdy, obwisłość skóry, zapalenie skóry po nasłonecznieniu
teleangiektatyczne naczynia, pogrubienie ścian naczyń krwionośnych w skórze	teleangiektazje

2.4.1. Fotoprotekcja

Odpowiednia ochrona skóry przed szkodliwym wpływem promieniowania słonecznego powinna trwać przez całe życie. Powinno się korzystać z kąpiei słonecznych z umiarem oraz

używać odpowiednich filtrów słonecznych z dostosowaną do typu skóry ochroną UVA i UVB. Umożliwia to zmniejszenie ryzyka rozwoju rogowacenia naskórka oraz zachorowań na nowotwory skóry. Wyróżniamy fotoprotekcję naturalną i sztuczną, tzw. zewnętrzną.

Do fotoprotekcji sztucznej zalicza się filtry, które możemy podzielić na dwie grupy [48]:

- filtry fizyczne (mineralne, barwnikowe) - odbijają i rozpraszają promieniowanie UV np. tlenek tytanu (IV), tlenek cynku, żelaza (III) oraz talk,
- filtry chemiczne (organiczne) - absorbują i rozpraszają promieniowanie UV, zwłaszcza UVB, np. kwas p-aminobenzoowy, salicylowy, p-metylocynamonowy oraz kamfora.

Nowoczesne formuły kosmetyczne zawierają w swoim składzie zarówno filtry fizyczne, jak i chemiczne. Stopień ochronnego działania preparatu określany jest przy użyciu międzynarodowego wskaźnika SPF (ang. *sun protective factor*), który warunkuje stopień ochrony przed działaniem promieni rumieniotwórczych. Naturalnym mechanizmem obrony organizmu człowieka przed szkodliwym promieniowaniem UV jest wytwarzanie barwnika zwanego melaniną. Jest ona produkowana w melanocytach, tworzy skupiska zwane melanosomami. Melanocyty umieszczone są w warstwie podstawnej naskórka. Melanina jest związkiem absorbującym promieniowanie UVB, UVA oraz w paśmie światła widzialnego. Zgromadzona jest w komórce docelowej między jądrem a powierzchnią zwróconą do światła. Dzięki temu chroni DNA przed uszkodzeniami świetlnymi. Wyróżniamy inne mechanizmy chroniące skórę przed promieniowaniem UV: komórki warstwy rogowej naskórka odbijające część światła i absorbujące światło słoneczne w całym spektrum, oraz kwas transurokainowy znajdujący się w naskórku i pocie [49].

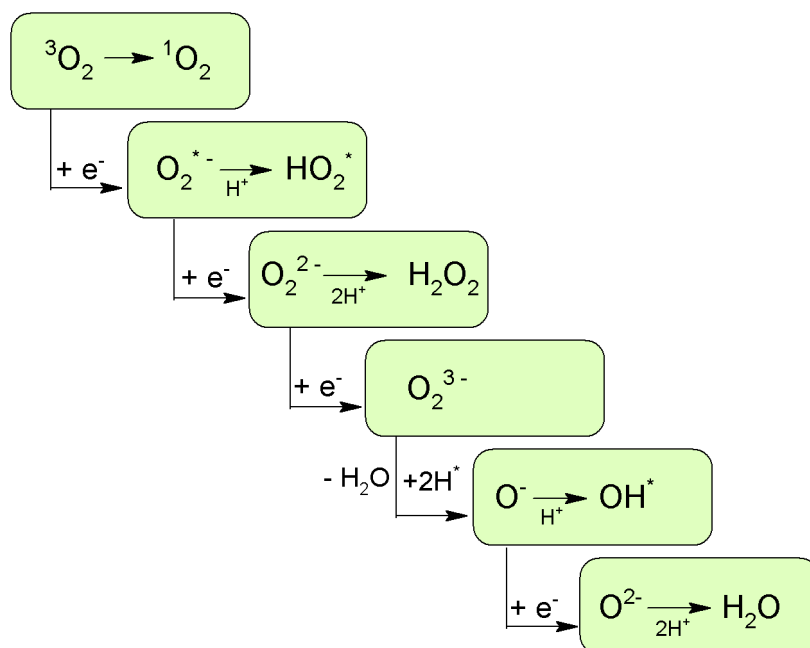
Najważniejszą metodą przeciwdziałania skutkom promieniowania słonecznego jest stosowanie kremów przeciwsłonecznych. Używanie kremów zapobiega pojawieniu się zmian w obrębie skóry właściwej oraz zmniejsza występowanie nowotworów podstawnokomórkowych i kolczystokomórkowych, rogowacenia słonecznego [47-55].

2.5. Reaktywne formy tlenu oraz wolne rodniki

W wyniku fotoutleniania, stresu fizjologicznego, jak również działania systemu odporności, organizm ludzki może wygenerować szkodliwe formy tlenu. Zaliczyć do nich można bardziej reaktywne niż tlen cząsteczkowy: nadtlenki organiczne i nieorganiczne, tlen singletowy oraz wolne rodniki, które są związkami posiadającymi niesparowane elektrony [56-62]. Tlen singletowy jest stanem wzbudzonym tlenu cząsteczkowego. Powstaje podczas zwykłych procesów biologicznych, które zachodzą w organizmach. Jego cechą charakterystyczną jest długi czas życia oraz wysoka reaktywność. Aby z powrotem przeszedł on do stanu podstawowego, nadmiar swojej energii musi przekazać innej cząsteczce, na przykład przeciwutleniacza (antyoksydantu). Proces taki nazywany jest wygaszaniem [63,64].

Rodniki nadtlenkowe zostają wygenerowane w wyniku przejścia elektronu z tlenu trypletowego (rys. 3). Mogą z nich powstać kolejne niebezpieczne cząsteczki, takie jak: anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$ oraz produkty jego przemiany: rodnik hydroksylowy $OH^{\bullet}$,

nadtlenek diwodoru H_2O_2 . Atakują one białka, kwasy nukleinowe oraz kwasy tłuszczowe prowadząc do ich uszkodzeń [62-65].



Rys. 3. Powstawanie różnych reaktywnych form tlenu (ROS) na drodze redukcji stanu trypletowego [66].

Do czynników zewnętrznych wywołujących stres oksydacyjny (powstawanie ROS - reaktywnych form tlenu, ang. *reactive oxygen species*) należą [67]:

- promieniowanie jonizujące,
- promieniowanie UV,
- ultradźwięki,
- oddziaływanie ksenobiotyków (substancji obcych).

W tkankach roślinnych zaobserwować można tzw. „fale tlenowe” w wyniku stresów środowiskowych (czynników uprawowych), takich jak [68]:

- stres wodny (susza lub zalanie),
- stres zasolenia,
- stres niskiej temperatury (warunki chłodne lub mróz),
- światło,
- oddziaływanie metali ciężkich,
- mechaniczne uszkodzenia,
- stosowanie pestycydów,
- inwazja patogenów.

a także czynniki pozbiornicze (po zebraniu materiału roślinnego) [69]:

- warunki zbioru,
- przechowywanie,
- wstępna obróbka.

Reaktywne formy tlenu reagują ze składnikami organizmów żywych, co sprzyja groźnym konsekwencjom. Szczególnie niebezpieczne są reakcje aktywnych form tlenu z białkami, błonami lipidowo-białkowymi i kwasami nukleinowymi. Tkanki roślinne posiadają dobrze działający system obrony przed aktywnymi formami tlenu, które polegają na działaniu enzymów neutralizujących ROS (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza) oraz na interakcji z antyoksydantami. Enzym dysmutaza ponadtlenkowa, która znajduje się w cytoplazmie, mitochondriach i chloroplastach przekształca w reakcji dysproporcjonowania, anionorodnik ponadtlenkowy w cząsteczkę nadtlenu wodoru [70].

Wolne rodniki są to struktury, posiadające niesparowany elektron. Tak jak tlen singletowy charakteryzują się wysoką reaktywnością elektronów oraz zdolnością do reakcji z innymi rodnikami [71-78]. Wolne rodniki dzielą się na [79-81]:

- ❖ reaktywne formy tlenu (ROS):
 - anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$),
 - rodnik wodoronadtlenkowy ($HO_2^{\bullet}$),
 - rodnik hydroksylowy ($OH^{\bullet}$),
 - rodnik peroksyłowy ($RO_2^{\bullet}$),
- ❖ reaktywne formy azotu (RNS - ang. *reactive nitrogen species*):
 - anion nadtlenuazotanu (III) ($ONOO^-$),
 - rodnik tlenu azotu (II) ($NO^{\bullet}$),
- ❖ reaktywne formy siarki:
 - rodnik tiolowy ($RS^{\bullet}$),
 - rodniki oksysiarkowe, ($RSO^{\bullet}$ (sulfinyłowy), $RSO_2^{\bullet}$ (sulfonyłowy), $RSOO^{\bullet}$ (ponadtlenkowy tiolowy), $RSO_2OO^{\bullet}$ (ponadtlenkowy sulfonyłowy)),
 - rodnik ditlenku siarki ($SO_2^{\bullet}$) [79-81].

Dodatkowo do reaktywnych form tlenu zaliczamy [81]:

- nadtlenek wodoru (H_2O_2),
- tlen singletowy (1O_2),
- ozon (O_3).

Aby zapełnić swoje niedobory, wolne rodniki odbierają brakujące elektrony od innych cząsteczek, np. kwasów tłuszczowych, białek oraz protein, dzięki czemu stają się stabilne. Zostają utworzone nowe rodniki, które atakują następne cząsteczki. W ten sposób dochodzi do reakcji, które skutkują uszkodzeniem głównych składników komórkowych, prowadząc do np. rozpadu białek, lipidów oraz struktur DNA [81,82]. W tabeli 3 przedstawiono właściwości i reaktywność aktywnych form tlenu: $O_2^{\bullet-}$, $HO_2^{\bullet}$ [77].

Tab. 3. Własności i reaktywność wybranych aktywnych form tlenu [77].

	$O_2^{\bullet -}$	$HO_2^{\bullet}$
reaktywność	dość duża	stabilny
reaktywność z anionami	trudna	łatwa
przechodzenie przez błony	trudno	łatwo
inicjacja peroksydacji lipidów	nie zachodzi	łatwa

Źródłem wolnych rodników są również czynniki wynikające ze stylu życia. Do najważniejszych czynników egzogennych zalicza się [82,83]:

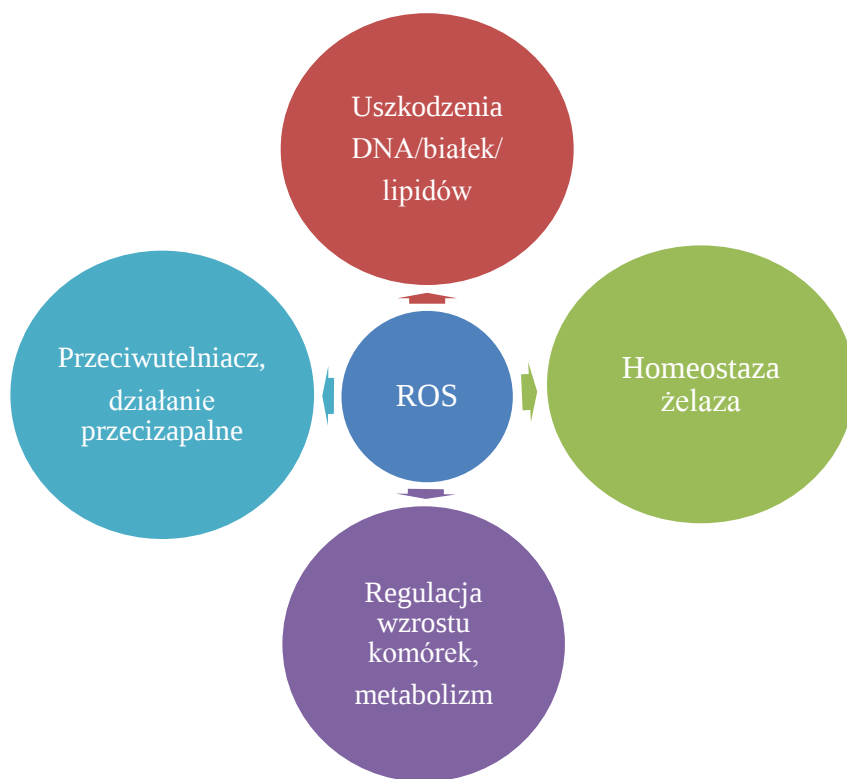
- palenie papierosów,
- picie alkoholu,
- przyjmowanie różnych leków,
- infekcje,
- czynniki żywieniowe (niedobór antyoksydantów),
- spożywanie zanieczyszczonej żywności,
- promieniowanie radiacyjne,
- światło ultrafioletowe,
- substancje zanieczyszczające środowisko (np. O_3 , NO_3 , SO_2),
- ciężka praca fizyczna.

2.5.1. Skutki działania reaktywnych form tlenu oraz wolnych rodników

W medycynie bardzo duże zainteresowanie wzbudzają zarówno reaktywne formy tlenu jak również rodniki wielonasyconych kwasów tłuszczowych. Najbardziej istotnymi grupami cząsteczek, które zostają uszkodzone przez ROS są białka, DNA oraz lipidy. W przypadku białek, ROS utleniają m. in. reszty aminokwasowe lub grupy prostetyczne (np. centra Fe-S, grupy hemowe). Uszkodzenia DNA wpływają na uszkodzenia zasad azotowych, reszt cukrowych oraz pękanie nici [78]. Za negatywne zmiany lipidów odpowiedzialny jest proces peroksydacji lipidów. Możemy wyróżnić trzy mechanizmy peroksydacji lipidów: wolnorodnikowy, enzymatyczny oraz niezależny od wyżej wymienionych [79]. W mechanizmie pierwszym i trzecim biorą udział ROS: $OH^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$, $RO_2^{\bullet}$, zaś w reakcji niezależnej od enzymów i rodników polegającej na utlenianiu lipidów przez 1O_2 i O_3 , powstają ROOH oraz cykliczne nadktlenki [79].

Działanie ROS w komórce nie musi cechować się tylko negatywnymi efektami [80]. Występowanie w stężeniu fizjologicznym, może odgrywać ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórek (rys. 4) [83]. ROS bierze udział w wielu reakcjach metabolicznych: inaktywacji wirusów i bakterii, regulowaniu wzrostu komórek, sygnalizacji między- i wewnątrzkomórkowej, tworzeniu hormonów tkankowych w postaci prostacyklin, tromboksanów i leukotrienów z wielonasyconych kwasów tłuszczowych, aktywacji cytochromu P450 oraz wielu genów [73]. Reaktywne formy tlenu wpływają również na czynnik rozkurczowy pochodzenia śródbłonkowego (EDRF - ang. *endothelium - derived relaxing factor*). Charakteryzują się działaniem rozszerzającym lub obkurczającym na ściany naczyń krwionośnych. Powodują również zwiększenie przepuszczalności ścian naczyń

włosowatych, stymulują transport glukozy do komórek, regulują syntezę prostanoidów w procesie oksigenacji i lipooksygenacji [83]. W organizmach ludzkich istotne jest utrzymywanie odpowiedniej homeostazy pro oksydacyjno - antyoksydacyjnej [83].



Rys. 4. Ścieżki sygnalizacji komórkowej regulowane przez ROS [81].

Lista schorzeń spowodowanych działaniem wolnych rodników została przedstawiona w tabeli 4.

Tab. 4. Schorzenia i uszkodzenia związane z niekorzystnym działaniem aktywnych form tlenu [80,81].

Schorzenia i uszkodzenia związane z niekorzystnym działaniem aktywnych form tlenu
miażdżyca (niedokrwienie, zawał, udar mózgu, zaburzenia rytmu serca), nadciśnienie, arterioskleroza
procesy karcynogenne
cukrzyca z uszkodzeniami występującymi w jej następstwie, zaburzenia w przemianie tłuszczów
schorzenia neurodegeneracyjne (choroba Alzheimera, Parkinsona, stwardnienie rozsiane, niewydolność mózgu z osłabieniem pamięci i zdolności do koncentracji, ogólny stan wyczerpania)
reumatoidalne zapalenie stawów, artroza
choroby układu pokarmowego (chroniczny stan zapalny trzustki, toksyczne i zapalne schorzenia wątroby, nieżyt żołądka, wrzody żołądka i dwunastnicy, choroba Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego
infekcje (wirusowe, grzybice, AIDS, malaria,) i stany zapalne
alergie
schorzenia autoimmunologiczne
schorzenia płuc i układu oddechowego (chroniczne zapalenie oskrzeli i włókniste schorzenia, schorzenia tkanki płucnej, astma)
przyspieszanie procesów starzenia się (toczeń rumieniowy, zaćma, demencja starcza), zewnętrzne objawy starzenia się skóry (sucha skóra, zwiotczała, spadek jędrności i elastyczności)
uszkodzenia mięśni wskutek intensywnego wysiłku fizycznego
zaćma, zwyrodnienie plamki żółtej
choroby skórne (łuszczyca, egzemy, uszkodzenia włókien kolagenowych i elastylowych)
uszkodzenia białka i DNA (zmiany w strukturze kodu genetycznego- mutacja komórek)

2.6. Antyoksydanty

Organizm człowieka dysponuje naturalnymi mechanizmami obronnymi, które mają za zadanie neutralizację szkodliwego działania reaktywnych form tlenu. Jedną z najważniejszych ról w zmniejszaniu uszkodzeń oksydacyjnych w ludzkim organizmie spełniają antyutleniacze (przeciwutleniacze). Antyutleniacze są to związki, które przy bardzo niskim stężeniu w porównaniu do utlenianego substratu opóźniają lub zapobiegają jego utlenieniu [82, 83].

2.6.1. Podział antyoksydantów

Antyoksydanty możemy podzielić na dwie grupy związków. Do pierwszej grupy możemy zaliczyć przeciwutleniacze, które przerywają reakcje łańcuchowe przez przekazanie rodnikom atomów wodoru lub elektronów, co prowadzi do powstania związków o większej stabilności. Do takich związków zaliczamy: fenole (galusany), hydrochinony, trihydroksybutylofenony i tokoferole. Do drugiej grupy zakwalifikowane zostały substancje,

które przejawiają charakter synergistyczny. Wychwytyją tlen oraz chelatują jony biorące udział w tworzeniu się rodników. Ich aktywność polega na przekazywaniu wodoru do fenoksyrodników, dzięki czemu przywracana jest im pierwotna aktywność przeciwutleniająca. Do tej grupy możemy zaliczyć substancje wychwytyjące tlen: kwas askorbinowy, palmitynian askorbylu, związki chelatujące metale, aminokwasy, flawonoidy, witaminę A, karotenoidy i wiele innych [82].

2.6.2. Mechanizm działania antyoksydantów

Antyoksydanty mogą działać jako [82,84-86]:

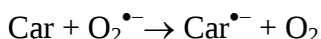
- substancje zapobiegawcze - dzięki inhibicji reakcji utleniania wolnych rodników oraz tworzenia wolnych rodników kwasów tłuszczowych,
- związki zrywające łańcuchy - zapobiegają kaskadzie reakcji samoutleniania,
- wygaszacze tlenu singletowego,
- substancje synergistyczne (z innymi antyutleniaczami),
- reduktory - zamieniając wodoronadtlenki w stabilne cząsteczki,
- związki chelatujące metale - przekształcające prooksydanty metali (związki promujące lub powodujące utlenienie), np. pochodne żelaza i miedzi, w stabilne produkty,
- inhibitory enzymów będących prooksydantami, np. lipooksygenazy.

2.6.3. Karotenoidy jako antyoksydanty

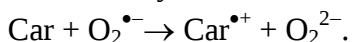
Karotenoidy zaliczane są do antyoksydantów prewencyjnych oraz interwencyjnych [87,88]. Karotenoidy wpływają na procesy utleniania przez rodniki na drodze dwóch mechanizmów [89,90]:

- redukcji, jak w przypadku większości ROS (rodników: hydroksylowych, alkoksylowych, nadtlenków lipidów i fenoksylowych), które są wymiatane przez β -karoten,
- utleniania, tak jak w przypadku anionu nadtlenkowego, są skutecznie wygaszane przez astaksantynę.

Karotenoidy rozpatrywane są jako potencjalne elektronoakceptory [90]:



lub elektronodonory w warunkach stresu oksydacyjnego [90]:



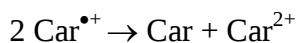
Jako antyoksydanty, karotenoidy mogą działać na trzy różne sposoby [91-93]:

- transfer elektronów (ang. *electron transfer*, ET), powstaje kationorodnik karotenoidowy (np. reakcja z $\text{NO}_2^{\bullet+}$):

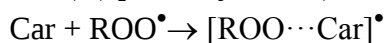
$$\text{Car} + \text{ROO}^{\bullet} \rightarrow \text{Car}^{\bullet+} + \text{OO}^-$$

Kationorodnik karotenoidowy jest niereaktywny w odpowiednich warunkach biologicznych, nie oddziałuje z tlenem cząsteczkowym, ulega reakcji dysmutacji, w

wyniku której powstaje kation karotenoidowy na drugim stopniu utlenienia oraz odtwarza się cząsteczka karotenoidu [90]:



- addycja, w wyniku której powstaje addukt rodnikowy (ang. *radical adduct formation*, RAF) (np. reakcja z $\text{RS}^{\bullet}$):



Następuje addycja wolnego rodnika do nienasyconego łańcucha karotenoidu, tworzy się struktura stabilna rezonansowo, charakteryzująca się brakiem reaktywności wobec tlenu.

- przeniesienie atomu wodoru na rodnik (ang. *hydrogen atom transfer*, HAT), np. reakcja z $^{\bullet}\text{OH}$):



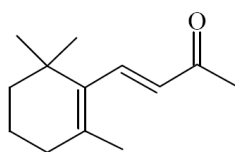
Zdolność karotenoidów do zmiatania ROS wynika z redukcji anionorodnika nadadtlenkowego oraz wytworzenia anionorodnika karotenoidów tlenu cząsteczkowego. Aktywność karotenoidów polega w dużej mierze na zapobieganiu utleniania frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *low density lipoprotein*, LDL), w tym cholesterolu i obniżeniu poziomu cholesterolu. Zahamowanie procesu utleniania frakcji LDL znacznie ogranicza choroby układu krwionośnego (ang. *cardiovascular disease*, CVD). W badaniach epidemiologicznych stwierdzono związek między spożyciem świeżych owoców, a zmniejszeniem się ryzyka choroby wieńcowej. Do najbardziej aktywnych przeciwutleniaczy, które zapobiegają utlenianiu frakcji LDL należą: likopen, luteina, β -karoten, kryptoksantyna i zeaksantyna [97]. Karotenoidy charakteryzują się działaniem antymutagennym i przeciwnowotworowym, szczególnie dotyczy to raka płuc. Karotenoidy wpływają na opóźnienie starzenia się naszego organizmu [98-101].

2.7. Karotenoidy

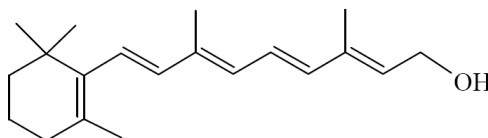
Karotenoidy są jednym z najbardziej rozpowszechnionych barwników występujących w przyrodzie. Nadają barwę od żółtej do czerwonej zarówno roślinom, jak i zwierzętom [102-105]. Pod względem struktury chemicznej są węglowodorami. Syntetyzowane są przez rośliny, glony, grzyby oraz niektóre mikroorganizmy. Dotychczas zidentyfikowano ponad 700 karotenoidów występujących w roślinach, z czego 60 z nich występuje w codziennej diecie, 20 można wykryć również we krwi [102,106,107]. Dziesięć procent wykazuje aktywność jako prowitamina A [108-112].

Karotenoidy gromadzą się głównie, obok chlorofilu, w chloroplastach zielonych części roślin oraz w chromoplastach kwiatów, owoców, nasion i niekiedy korzeni. Odpowiedzialne są za jesienne zabarwienie liści drzew, kiedy to zanika chlorofil i następuje zmiana barwy z zielonej, żółtej, pomarańczowej i czerwonej do brunatnej [109-111]. Karotenoidy chronią łodygi oraz liście przed szkodliwym działaniem promieniowania UV, które przyczynia się do produkcji wolnych rodników [112]. Występują w największych ilościach w marchwi, papryce, pomidorach, brokułach, szpinaku, arbuzie, brzoskwiniach, algach, bananach, dzikiej

róży, dyni. Są również barwnikiem występującym w upierzeniu flamingów, mięśniach łosia i innych ryb, homarach, czy też w krewetkach. Zwierzęta nie potrafią same syntetyzować karotenoidów. Są one dostarczane do organizmów wraz z pokarmem. Skutkiem nagromadzenia się barwników karotenoidowych u zwierząt jest występowanie charakterystycznych barw, przede wszystkim u organizmów morskich, ptaków oraz owadów [99]. W organizmach żywych karotenoidy zgromadzone są głównie w wątrobie, gdzie w wyniku procesów enzymatycznych następuje ich symetryczny rozpad do struktur składających się z 20 atomów węgla. Z tak powstałych jednostek aktywne biologicznie są tylko te, które zawierają minimum jeden niepodstawiony pierścień β -jononu (rys. 5). Takie struktury przypominają budowę trans-retinol (rys. 6), czyli aktywną formę witaminy A, gromadzą się w tkance podskórnej i są z niej pobierane w przypadkach niedoboru retinolu w organizmach [113-115].



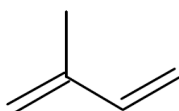
Rys. 5. Szkieletowy, prosty wzór strukturalny β -jononu.



Rys. 6. Szkieletowy, prosty wzór strukturalny all- trans-retinolu.

2.7.1. Budowa karotenoidów

Ze względu na budowę chemiczną, karotenoidy zaliczane są do poliizoprenoidów zawierających 8 jednostek izoprenowych (rys. 7) składających się z 40 atomów węgla. Karotenoidy mogą występować w formie łańcuchowej, zawierać jeden pierścień β -jononu na końcu cząsteczki lub mogą przybrać postać bicykliczną [115-117].



Rys. 7. Szkieletowy, prosty wzór strukturalny izoprenu.

Główną cechą budowy wszystkich karotenoidów jest liniowy układ sprzężonych wiązań podwójnych, który stanowi środkowy fragment cząsteczki. Osiem jednostek

izoprenowych połączonych jest ze sobą tak, że na środku związku następuje odwrócenie tego układu [102].

W karotenoidach, π -elektrony są zdelokalizowane wzdłuż całego łańcucha polienowego. Cecha ta nadaje tym związkom unikalne właściwości chemiczne, takie jak pochłanianie światła, co odgrywa ważną rolę w procesach fotosyntezy u roślin jak i innych organizmów oraz odpowiada za ich kolor. Barwa karotenoidów zależy od liczby sprzężonych wiązań podwójnych. Wraz ze wzrostem ich absorpcji związki przybierają barwę od żółtej, przez pomarańczową do czerwonej [102]. Związki te są nierozpuszczalne w wodzie, natomiast bardzo dobrze rozpuszczają się w tłuszczach, z którymi często tworzą estry [111].

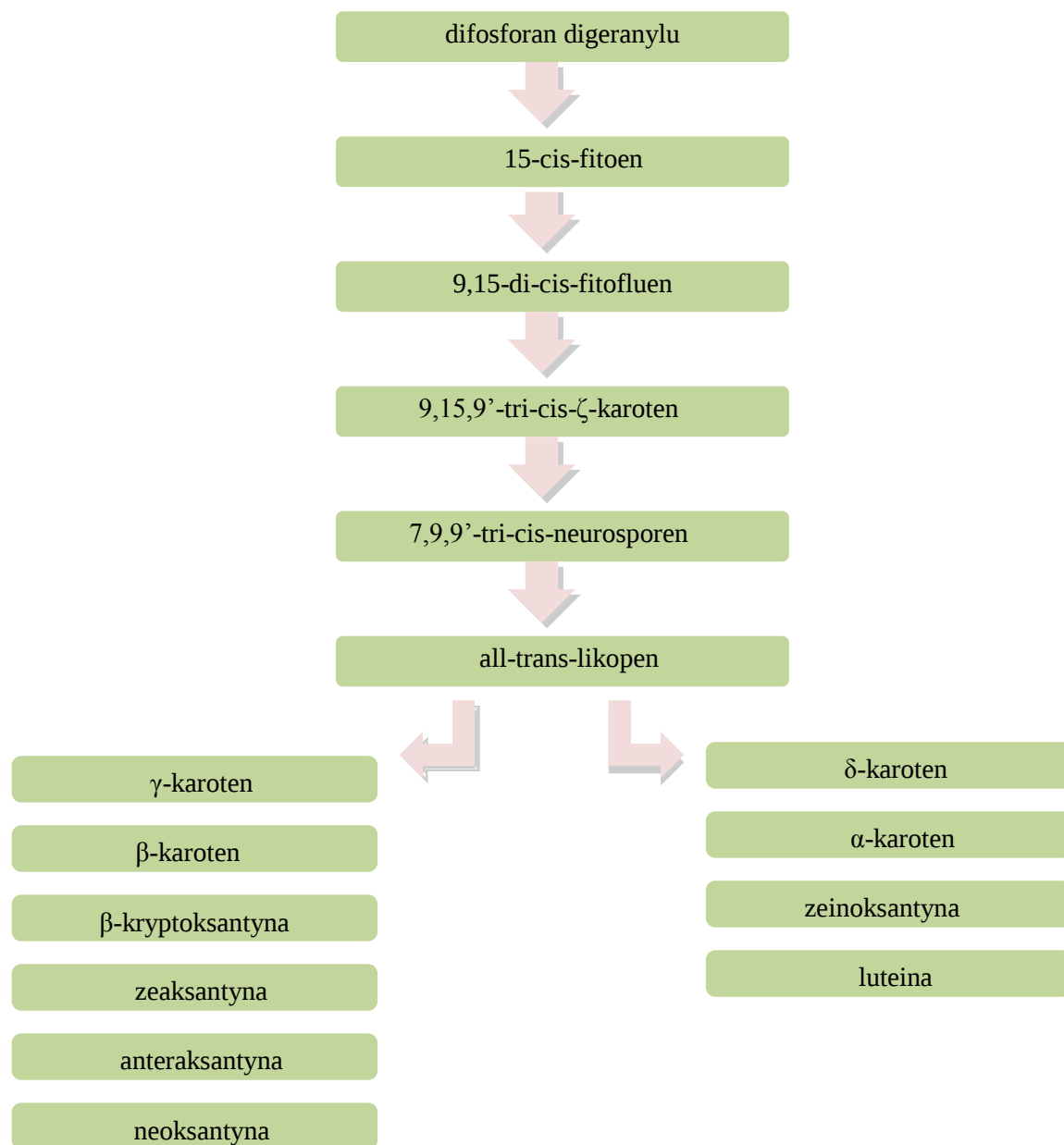
2.7.2. Podział karotenoidów

Ze względu na różnice w łańcuchu poliizoprenoidowym, karotenoidy możemy podzielić na dwie grupy. Pierwsza to związki zawierające jedynie atomy węgla i wodoru o wzorze sumarycznym $C_{40}H_{56}$, najczęściej to izomery all-trans, które są termodynamicznie bardziej stabilne [112,113]. Grupę tę nazywamy karotenami. Istnieje możliwość zmiany izomerii na cis-trans w podwyższonej temperaturze lub w obecności intensywnego promieniowania. Izomery cis występują w warzywach i owocach, są to też produkty przemiany metabolicznej pożywienia [114]. Ze względu na taką budowę karotenoidy są substancjami mało polarnymi, absorbują promieniowanie o wyższej długości fali [115]. Do pierwszej grupy karotenoidów zalicza się związki, które charakteryzują się krótszym łańcuchem węglowym. Druga grupa związków nazywana ksantofilami, zawiera minimum jeden atom tlenu, znajdujący się np. w grupie hydroksylowej (w tym hydroksymetylowej, karbonylowej i karboksylowej). Ksantofile są szeroko występującą w naturze grupą związków, wykazującą podobieństwo zarówno chemiczne, biochemiczne, jak również fizykochemiczne [112,113]. Ksantofile są bardziej polarne, ponieważ grupy tlenowe przyłączone są do struktur pierścieniowych. Absorbują promieniowanie o niższych długościach fali niż większość karotenoidów [115].

2.7.3. Biosynteza karotenoidów

Aż 95% karotenoidów, powstaje w wyniku procesu kondensacji dwóch cząsteczek difosforanu digeranilu (GGPP, $C_{20}PP$), konsekwencją czego jest symetryczny szkielet fitoenu C_{40} (rys. 8) [115]. Proces ten zachodzi w obecności syntazy fitoenu (PSY). Powstały fitoen ulega 4-stopniowej przemianie w wyniku reakcji katalizowanej oksydazami, następstwem czego jest powstanie cząsteczki likopenu. W wyniku reakcji cyklizacji powstaje α -karoten i β -karoten. W kolejnych etapach β -karoten w reakcji hydroksylacji przekształcany jest w zeaksantynę, natomiast α -karoten - w luteinę. Enzym epoksydaza zeaksantyny przekształca zeaksantynę w anteraksantynę i wiolaksantynę. U roślin wyższych wiolaksantyna przekształcana jest podczas reakcji syntazy neoksantynowej w neoksantynę. Przy udziale dużej ilości światła wiolaksantyna może ulec powrotnej przemianie w anteraksantynę za pomocą aktywnej deepoksydazy wiolaksantynowej (VDE). Przemiana wiolaksantyny i zeaksantyny nazywana jest cyklem ksantofilowym. Przy niedoborze światła lub w ciemności przemiana zeaksantyny do wiolaksantyny jest faworyzowana, konsekwencją czego jest wysoka zawartość wiolaksantyny. Gdy roślina przebywa w silnie nasłonecznionym miejscu,

wiolaksantyna przekształcana jest w zeaksantynę. Stosunek zeaksantyny i wiolaksantyny jest oceną stresu, wywołanego np. zmianą temperatury otoczenia, czy dostępności wody [116]. Druga grupa karotenoidów powstaje na drodze syntezy 2 cząsteczek difosforanu farnezyli (FPP, C15PP). W wyniku tego procesu tworzy się łańcuch zawierający 30 atomów węgla. Powszechność tej grupy cząsteczek ogranicza się do bakterii z rodziny *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Methylobacterium* oraz *Heliobacterium* [117].



Rys. 8. Biosynteza karotenoidów [117-119].

2.7.4. Właściwości karotenoidów oraz ich zastosowanie

Karotenoidy są związkami wielokrotnie nienasyconymi, charakteryzują się wysoką niestabilnością w obecności światła, temperatury oraz innych czynników utleniających. W takich właśnie warunkach karotenoidy ulegają licznym reakcjom izomeryzacji, w wyniku których powstają związki będące mieszaniną struktur cis i trans, charakteryzujących się

słabszą barwą i niższą aktywnością biologiczną. Karotenoidy są nie tylko barwnikami nadającymi kolor roślinom oraz niektórym zwierzętom, ale pełnią również wiele innych ważnych ról [118].

Karotenoidy występujące obok chlorofilu w chloroplastach spełniają ważne funkcje. Są fotoreceptorami, które bardzo dobrze absorbują promieniowanie UV-Vis i w wyniku przejścia w fazie jasnej fotosyntezy. Działają jako fotoprotektory, gdyż w wyniku przejść tryplet-tryplet, pochłaniają energię ze wzbudzonych stanów chlorofilu, a następnie ją rozpraszają, dzięki czemu chronią chloroplasty i chlorofile przed powstawaniem szkodliwego tlenu singletowego [119].

U ludzi i zwierząt karotenoidy spożywane w odpowiednich ilościach zostają zaabsorbowane przez komórki błony śluzowej, aby w formie niezmienionej, pojawić się w tkankach obwodowych organizmu, co sprawia, że biorą udział w obiegu materii [120]. Karotenoidy, które zawierają niepodstawione pierścienie β -jononu są u ludzi i zwierząt prekursorami witaminy A, której niedobór prowadzi do nieprawidłowej keratynizacji skóry, uszkodzenia nabłonków dróg oddechowych i pokarmowych oraz powoduje łuszczycę, łamliwość paznokci i wiele innych chorób. Retinol jest ważną substancją, która pomaga w procesach widzenia, a jego niedobór prowadzi do „kurzej ślepoty”, zaćmy, suchości oka oraz zwyrodnienia plamki żółtej [121]. Karotenoidy jako aktywne formy witaminy A zostają zaabsorbowane, a następnie metabolizowane do retinolu przez komórki błony śluzowej jelit [113]. Na wydajność absorpcji wpływa obecność tłuszczu, gdyż karotenoidy są związkami lipofilowymi, a ponadto są one wchłaniane przez organizm tylko w obecności sprzężonych soli kwasu żółciowego [122]. Na podstawie badań stwierdzono, że prawidłowa absorpcja karotenoidów wymaga obecności miceli o odpowiedniej wielkości oraz charakterze rozproszenia, gdyż tylko w takim wypadku nastąpi wchłonięcie ich przez komórki jelitowe [122]. U człowieka i innych organizmów karotenoidy wpływają pozytywnie na regulację odpowiedzi immunologicznej oraz przekazywanie sygnałów pomiędzy komórkami prowadzących do zmian fizjologicznych, morfologicznych i rozwojowych. Dzięki tym dobroczynnym właściwościom, karotenoidy chronią przed wieloma chorobami dzisiejszych czasów: rakiem, chorobami serca oraz uszkodzeniami wielu struktur komórkowych, takich jak białka, lipidy czy kwasy nukleinowe [121,122].

Karotenoidy znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym jako barwniki i aromaty, w przemyśle farmaceutycznym jako suplementy diety, przemyśle kosmetycznym jako składniki wielu preparatów myjących, ochronnych czy nadających koloryt skórze, jako składniki pokarmu dla zwierząt oraz w medycynie [122].

W organizmach ludzkich karotenoidy gromadzone są głównie w komórkach tkanek tłuszczowych oraz w wątrobie, można je znaleźć również w płucach, nerkach, szyjce macicy czy prostaty. Występują także w warstwie rogowej naskórka. Potwierdzają to badania dokonane przy użyciu spektroskopii Ramana. Zaobserwowano, że w skórze ludzi zawartość karotenoidów jest zróżnicowana. Darwin i wsp. [123] stwierdzili, że stężenie tych związków jest silnie powiązane ze stylem życia prowadzonym przez probantów. Regularne spożywanie owoców i warzyw oraz aplikacja kosmetyków zawierających prowitaminę A zwiększa zawartość tych związków w skórze. Natomiast silny stres, bezsenność, palenie papierosów oraz picie alkoholu powoduje obniżenie ich stężenia w skórze badanych. Odnotowano również zmienną zawartość karotenoidów w różnych częściach ciała pokrytych warstwą

rogową naskórka, co jest także związane z odmiennym trybem życia badanych (ekspozycja na słońce oraz zanieczyszczenie powietrza). Spektroskopia Ramana wykazała, że części ciała charakteryzujące się wysokim zagęszczeniem gruczołów potowych oraz łojowych (np. czoło oraz dłonie) mają najwyższe stężenie karotenoidów w skórze, ponieważ rozpuszczalne w lipidach karotenoidy dostarczane są przez gruczoły do powierzchni skóry [123].

Zastosowanie preparatów zawierających karotenoidy prowadzi do zwiększenia odporności na promieniowanie UV, ponieważ związki te niszczą powstające pod jego wpływem wolne rodniki. Na podstawie badań wykorzystujących technikę spektroskopii Ramana stwierdzono degradację β -karotenu zawartego w skórze po 30 minutach naświetlania promieniowaniem UV. Natomiast likopen degradował po 30-90 minutach w zależności od probanta [124].

Na podstawie badań Darvina oraz wsp. [125] stwierdzono, że aplikacja kremów oraz przyjmowanie suplementów diety zawierających karotenoidy powoduje wzrost ich stężenia w skórze probantów. Po aplikacji kosmetyków odnotowano około 35% wzrost barwników w skórze czoła oraz 30% wzrost w skórze policzków. Większa zawartość karotenoidów w skórze czoła jest związana z umiejscowieniem większej ilości potu oraz gruczołów łojowych, które transportują badane przeciwutleniacze. Natomiast stężenie karotenoidów po zastosowaniu suplementacji spowodowało wzrost ich stężenia do około 80% w skórze czoła, 70% w skórze policzków [125]. Jak zaobserwowano, stosowanie kosmetyków zawierających karotenoidy sprawiło, że skóra badanych zawierała niższe stężenie tych związków w porównaniu z przyjmowaniem suplementacji. Wynika to z faktu, że karotenoidy stosowane miejscowo są przechowywane w warstwie rogowej naskórki krótki czas. Ich ilość zostaje zmniejszona w wyniku złuszczenia skóry (czynności higieniczne, regeneracja naskórki oraz uszkodzenia mechaniczne oraz stałe narażenie na czynniki zewnętrzne). Ogólnoustrojowa suplementacja dociera do tkanki tłuszczowej ciała, z której powoli przedostaje się na powierzchnię skóry z potem oraz łojem jak również przez układ krążenia. Najlepszym działaniem mającym na celu uzupełnienie brakujących antyoksydantów jest połączenie obu metod. Połączenie stosowania suplementacji oraz kosmetyków spowodowało wzrost stężenia karotenoidów badanych w skórze czoła do około 70% oraz w skórze policzków do 100% [125].

2.7.5. Zastosowanie karotenoidów w przemyśle kosmetycznym

Przemysł kosmetyczny, poszukuje nowych substancji aktywnych charakteryzujących się cennymi właściwościami. Do takich substancji należą karotenoidy. Poniżej opisano działanie karotenoidów na skórę.

Przeciwstarzeniowe i odmładzające [126-127]:

- stymulują fibroblasty do syntezy kolagenu i elastyny, co powoduje wygładzenie zmarszczek, w tym zmarszczek głębokich, tzw. kurzych łapek wokół oczu, zmarszczek mimicznych oraz wzrost gęstości, jędrności i elastyczności skóry,
- naprawiają i odbudowują zniszczone pod wpływem promieniowania UV włókna kolagenowe i elastynowe. Są odpowiedzialne za pogrubienie i renowację skóry, wpływają na zwiększenie produkcji kolagenu i elastyny. Wykazują silną aktywność

hamującą w stosunku do kolagenozy i elastazy - enzymów związanych z degradacją kolagenu i elastyny. Chronią skórę przed utratą jędrności i przedwczesnymi zmarszczkami,

- pobudzają do normalizacji oraz stymulacji proces odnowy zrogowaciałego i uszkodzonego pod wpływem działania słońca naskórka. Skóra staje się gładka i miękka. Karotenoidy wzmacniają funkcje ochronne naskórka oraz zmniejszają przeznaskórkową utratę wody (TEWL). Dobrze nawodniony naskórek staje się gładki, jędrny, sprężysty oraz elastyczny. Skóra wygląda lepiej, zdrowiej i młodziej,
- chronią skórę przed szkodliwym działaniem wolnych rodników, które powodują jej przedwczesne starzenie się (degradacja kolagenu, elastyny i fibryliny-1),
- pobudzają naturalne mechanizmy, które chronią skórę przed negatywnym działaniem słońca oraz zwiększają odporność i przyspieszają procesy gojenia skóry,
- normalizują pracę gruczołów łojowych - poprawiają gospodarkę lipidami skóry suchej i tłustej.

Depigmentacyjne [127]:

- wpływają na zmniejszenie rozmiarów melanocytów oraz redukcję ilości melaniny - barwnika skóry, który produkowany w nadmiarze powoduje tworzenie niepożądanych przebarwień; redukują posłoneczne i hormonalne przebarwienia,
- zmniejszają również przebarwienia pozapalne, np. przebarwienia potrądzikowe.

Przeciwtąrdzikowe [128]:

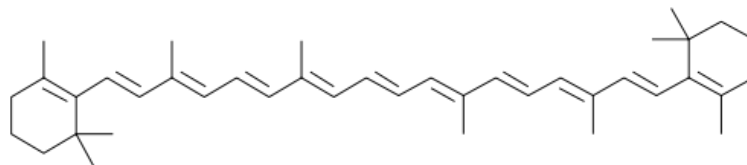
- przeciwdziałają wolnym rodnikom, które atakują lipidowe składniki sebum, powodując powstawanie produktów drażniących skórę oraz reakcje zapalne (trądzik),
- normalizują pracę gruczołów łojowych, obniżają tendencję do powstawania zaskórników i wyprysków,
- oczyszczają ujścia mieszków włosowych. Pory skóry ulegają zwężeniu, regulują i przyspieszają proces eksfoliacji naskórka, zapobiegając zmianom trądzikowym.

2.8. β -karoten

β -karoten jest bezpieczną odmianą karotenu, organizm przetwarza tylko taką jego ilość, jaką potrzebuje. Charakteryzuje się żółtym zabarwieniem. Absorbuje światło o długości fali $\lambda = 450$ nm. β -karoten charakteryzuje się silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi. Źródłem pokarmowym β -karotenu są między innymi: marchew, słodkie ziemniaki, papryka czerwona, arbuz, morele, dynia, brzoskwinia, papaja oraz szpinak [129, 130]. Pierwszy raz naturalny β -karoten został wyekstrahowany z marchwi przez Wackenrodera w 1931 roku [131], jego pierwsza forma syntetyczna została otrzymana w 1950 roku [131], natomiast już od 1954 roku był on produkowany na skalę przemysłową jako barwnik o szerokim zastosowaniu [132].

2.8.1. Budowa

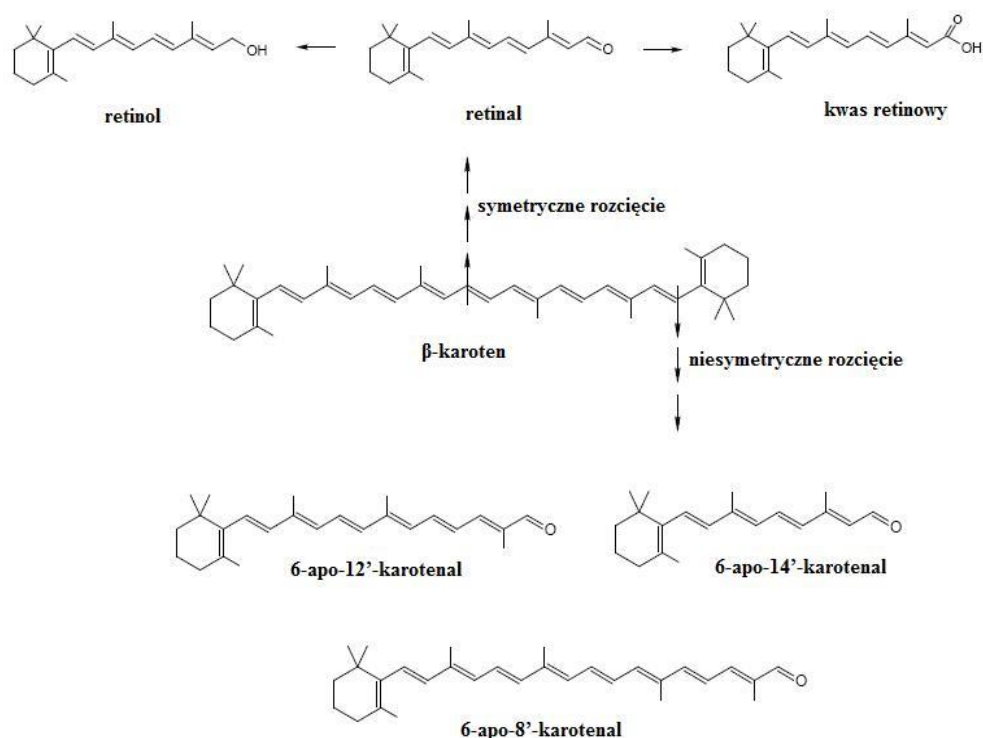
β -karoten zbudowany jest z 40 atomów węgla, zawiera 11 sprzężonych i 2 niesprężone podwójne wiązania (rys. 9). Jest związkiem o dwóch pierścieniach β -jononu, stwierdzono występowanie sześciu wiązań dodatkowych bocznych z grupami metylowymi -CH₃ [132].



Rys. 9. Szkieletowy, prosty wzór strukturalny β -karotenu.

Struktura β -karotenu podobna jest do all-trans-retinolu, czyli aktywnej formy witaminy A i właśnie dlatego β -karoten jest jej głównym prekursorem w organizmie [133-136]. Przemiana β -karotenu w witaminę A zachodzi na drodze enzymatycznej (rys. 10). 15,15'-deoksygenaza powoduje symetryczne, oksydacyjne rozerwanie wiązania podwójnego, które znajduje się na środku cząsteczki, czyli wiązania C15-C15'. W wyniku tej reakcji otrzymuje się dwie cząsteczki retinalu, który jest redukowany do retinolu oraz aktywnej formy witaminy A, czyli kwasu retinowego. Proces ten zachodzi w wątrobie, ale tylko w takich ilościach, na jakie jest zapotrzebowanie organizmu. Nadmiar β -karotenu gromadzi się w tkance podskórnej i jest wykorzystywany w przypadku niedoborów retinolu [135,136].

β -karoten ulega również niesymetrycznemu oksydacyjnemu rozcięciu na wiązaniu C13'-C14', tylko wtedy gdy znajduje się ono w konfiguracji cis. Z cząsteczki β -karotenu mogą powstać 6-apo-8'-karotenal, 6-apo-12'-karotenal lub 6-apo-14'-karotenal [137].



Rys. 10. Drogi rozpadu β -karotenu w wątrobie [137].

2.8.2. Właściwości i zastosowanie

β -karoten [138]:

- pozytywnie wpływa na funkcjonowanie systemu immunologicznego,
- wspomaga prawidłowe funkcjonowanie narządu wzroku,
- redukuje ilość komórek nowotworowych w organizmie ludzkim,
- chroni wyściółkę przewodu pokarmowego i dróg oddechowych przed infekcjami,
- zapobiega rozedmnie płuc i bronchitowi,
- powoduje obniżenie poziomu cholesterolu,
- sprzyja prawidłowemu rogowaceniu nabłonków,
- opóźnia procesy starzenia się.

Stwierdzono, że β -karoten ogranicza ryzyko zachorowania na choroby nowotworowe, oraz przyczynia się do zahamowania promocji oraz progresji nowotworów [139]. Zauważono, że wyżej wymieniony karotenoid powoduje zwiększenie produkcji komórek cytotoksycznych, stymuluje je do produkcji dużych ilości cytokin oraz ułatwia ich migrację do komórek rakowych. W ten sposób dochodzi do niszczenia proliferującej formy guza. Stwierdzono, że β -karoten charakteryzuje się właściwościami supresji innych onkogenów. Ponadto spełnia istotną rolę w kontroli aktywności genu - białka p53. β -karoten pobudza do działania syntezę niektórych białek szoku termicznego np. hsp70 [135]. β -karoten stosowany jest również w leczeniu schorzeń związanych z nadwrażliwością na światło, takich jak: protoporfiria

erytropoetyczna, pokrzywka słoneczna, wielopostaciowe osutki świetlne, opryszczka ospówkowata, toczень rumieniowaty oraz reakcje fotoalergiczne i fototoksyczne, które spowodowane są przyjmowaniem leków zawierających składniki światłouczulające [136,137]. Wykorzystuje się fotoprotekcyjne zdolności β -karotenu do wygaszania tlenu singletowego, który jest głównym czynnikiem nasilającym objawy fotodermatoz [127]. Wertz i wsp. [137] wykazali, że β -karoten prowadzi do supresji indukcji metaloproteiny macierzy pozakomórkowej (MMPs) typu: MMP-1 (enzymu kalogenazy fibroblastów), MMP-3 (enzymu nazywanego stromelizyną-1, odpowiadającego za degradację kolagenu typu II, III, IV, IX, i X, proteoglikanów, fibronektyny, lamininy oraz elastyny) oraz MMP-10 (enzymu nazywanego stromelizyną-2, odpowiadającego za syntezę proteoglikanów i fibronektyny) uczestniczących w procesie fotostarzenia. β -karoten blokował także stymulowaną przez tlen singletowy aktywację ww. metaloproteinaz, a zwłaszcza MMP-1 i MMP-10 [137].

β -karoten jest składnikiem żywności, w której wykorzystywany jest jako barwnik i suplement diety. Związek ten jest używany w produktach mlecznych, tłuszczach i olejach, a także w przetworzonych owocach i sokach owocowych, wykorzystany jest również w preparatach dla niemowląt jako źródło witaminy A. β -karoten znalazł swoje zastosowanie jako barwnik jedzenia i napojów takich jak: jogurty, napoje mleczne, lody, puddingi, wyroby cukiernicze i piekarnicze oraz przyprawy. Według FDA (ang. *Food and Drug Administration*) β -karoten jako dodatek barwnikowy, może być bezpiecznie używany w lekach i kosmetykach. Stosowany jest w pożywieniu dla zwierząt. W suplementach diety β -karoten stosowany jest jako skuteczny i stabilny zamiennik do tej pory używanych antyoksydantów, które opóźniają procesy starzenia się skóry oraz chronią organizm od wewnątrz przed promieniowaniem UV [136-139].

2.8.3. Zastosowanie w przemyśle kosmetycznym

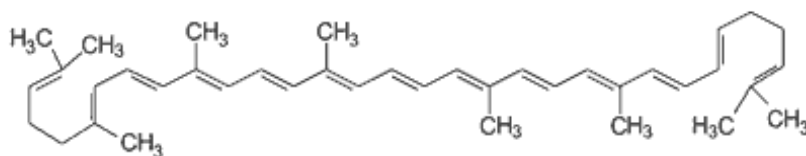
Mimo niestabilnych właściwości, β -karoten jest stosowany w przemyśle kosmetycznym jako składnik środków do mycia i kąpieli, szamponów, odżywek do włosów, produktów do pielęgnacji twarzy i ciała oraz preparatów przeciwstarzeniowych. Jest on również składnikiem wielu preparatów do opalania, ponieważ wykazuje działanie promieniochronne, zmniejszając jednocześnie wrażliwość skóry na poparzenia słoneczne [112]. Stosowany jest jako barwnik w kremach samoopalających, dzięki nim skóra przybiera złocisty kolor. Najczęściej β -karoten odnajduje swoje zastosowanie w serii kremów, serum anti-aging, których zadaniem jest zapobieganie oraz likwidowanie już istniejących zmarszczek [140]. β -karoten wchodzi w skład kosmetyków regulujących poziom sebum, przeciwtrądzikowych, oraz zmiękczających naskórek. Przy stosowaniu przez dłuższy czas preparatów zawierających β -karoten w ilości 30 mg/dzień może dojść do hiperkarotenodermii, czyli odwracalnego zabarwienia skóry na żółto. Spowodowane jest to tym, że β -karoten gromadzi się nie tylko w wątrobie, jelicie czy krwi, ale również w warstwie rogowej naskórka i jest jednym z głównych barwników nadających kolor skórze. Aby uniknąć tej nieestetycznej przypadłości, należy pamiętać o stosowaniu kilkudniowych przerw między zażywaniem preparatów zawierających ten karotenoid [141].

2.9. Likopen

Likopen ((6E,8E,10E,12E,14E,16E,18E,20E,22E,24E,26E)-2,6,10,14,19,23,27,31-oktametylodotriakonta-2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tridekaen) jest jednym z najważniejszych przedstawicieli karotenoidów. Rozpuszcza się w tłuszczach. Występuje głównie w czerwonych owocach i warzywach, takich jak arbuz, różowy grejpfrut, papaja, morele, oraz w niektórych gatunkach alg czy grzybów. Jednak głównym i najbardziej znanym źródłem likopenu są pomidory. Jest syntetyzowany w roślinach i mikroorganizmach. Ani człowiek, ani zwierzęta nie mają zdolności produkowania likopenu, musi być dostarczany wraz z pożywieniem. Likopen łatwo rozpuszcza się w tłuszczach, dlatego po podgrzaniu, jest on lepiej przyswajany przez człowieka w postaci przetworzonej niż z surowych warzyw i owoców [142].

2.9.1. Budowa

Związek ten jest nienasyconym węglowodorem alifatycznym, zbudowanym z ośmiu reszt izoprenowych, tworzących łańcuch węglowy o czterdziestu atomach węgla, który zawiera 11 sprzężonych i 2 niesprężone wiązania podwójne (rys. 11). Likopen nie posiada, w przeciwieństwie do witaminy A, dwóch pierścieni β -jononowych, dlatego nie posiada właściwości prowitaminy. Najczęściej spotykanymi formami są izomery all-trans (forma najbardziej stabilna termodynamicznie), 5-cis, 9-cis, 13-cis i 15-cis [143]. Zawarte w jego strukturze wiązania podwójne mogą ulegać izomeryzacji z pozycji trans do mono- lub poli-cis pod wpływem światła, temperatury czy reakcji chemicznych [143]. Likopen charakteryzuje się intensywnym zabarwieniem mimo braku w jego cząsteczkach grup chromoforowych [144]. Jego kolor przypisujemy obecności licznych sprzężonych ze sobą wiązań podwójnych, dzięki którym związek ten pochłania światło widzialne [145].

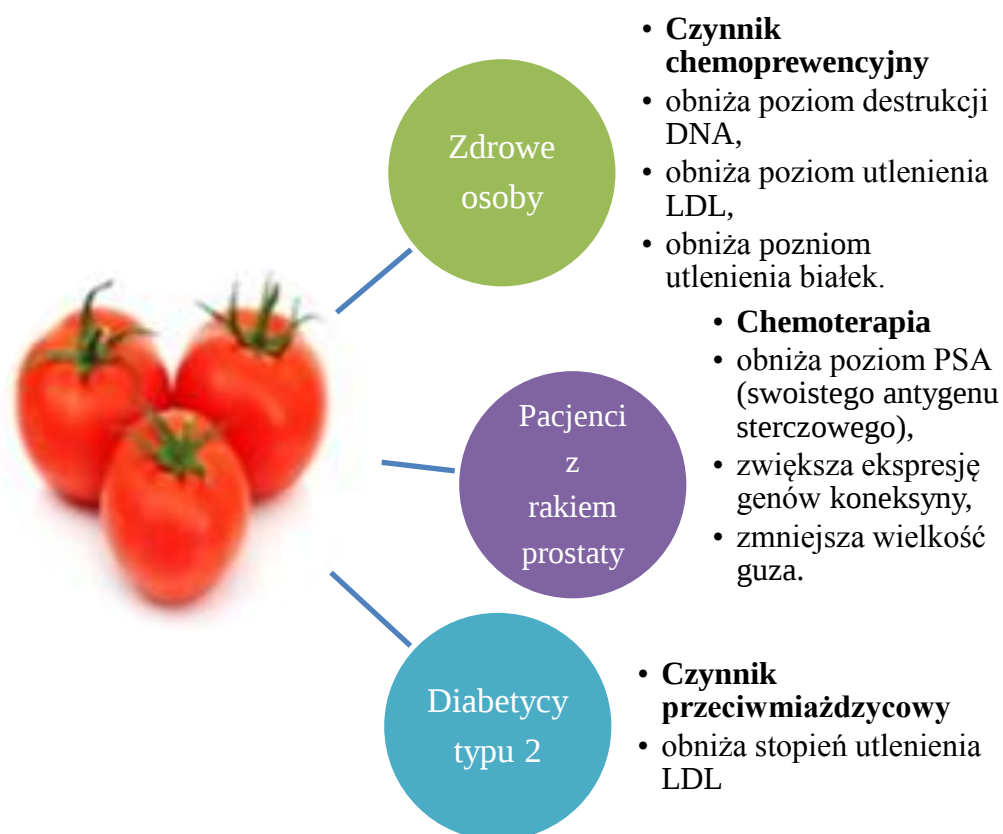


Rys.11. Szkieletowy, prosty wzór strukturalny likopenu.

2.9.2. Właściwości i zastosowanie

Głównym zadaniem likopenu w komórkach roślinnych jest pochłanianie światła oraz udział w procesach fotosyntezy, spełnia on rolę pigmentu wspomagającego, ponieważ występuje w otoczce chloroplastów. Likopen chroni komórki przed wrażliwością na światło, pochłaniając promienie słoneczne [142]. Likopen znajduje się w organizmie człowieka we krwi ludzkiej, osoczu oraz narządach. Jego poziom w osoczu dla różnych populacji wynosi 50 - 90 nmol/dm³. Wpływ na poziom likopenu mają zarówno czynniki ogólnoustrojowe, jak również prowadzony tryb życia [143]. Przyjmuje się, że stanowi on ok. 30% wszystkich karotenoidów występujących w organizmie człowieka [143]. Likopen charakteryzuje się

właściwościami chroniącymi organizm przed licznymi chorobami (m.in. zawałem serca), a przede wszystkim przed rozwojem nowotworów [144]. Zawartość likopenu maleje wraz z wiekiem. Wielu naukowców wskazuje, że jego duże ilości we krwi minimalizują ryzyko zachorowań na nowotwory przełyku, żołądka, okrężnicy i odbytnicy, a także w mniejszym stopniu na raka jamy ustnej, gardła i pęcherza moczowego [145]. Chroni również przed schorzeniami serca (miażdżyca, choroba niedokrwienna serca) i naczyń krwionośnych tłumiąc syntezę cholesterolu, a zwłaszcza utlenianie jego frakcji [146]. Likopen charakteryzuje się różnym działaniem na zdrowy i chory organizm (rys. 12), w szczególności w przypadku osób z rakiem prostaty działa wspomagająco w leczeniu, tj. obniża poziom swoistego antygenu sterczowego, zwiększa ekspresję genów koneksyny oraz zmniejsza wielkość guza. W badaniach przesiewowych wykazano, że równoczesne przyjmowanie olejów rybnych oraz likopenu obniżyło zdolność utleniania LDL *ex vivo* indukowaną przez oleje z ryb oraz obniżało utlenianie DNA. Stężenie trójglicerydów ulega zmniejszeniu bardziej, niż przy stosowaniu samego oleju rybiego. Likopen przyczynia się do zmniejszenia stresu oksydacyjnego na dwóch drogach - poprzez usuwanie wolnych rodników, które uszkadzają DNA oraz przez regulowanie mechanizmów naprawczych DNA (rys. 12) [147-148]. Likopen pobudza komunikację międzykomórkową przez tzw. połączenia typu neksus, czyli kanały białkowe w błonach komórkowych, dzięki czemu utrudnia tworzenie się substancji wywołujących nowotwory oraz hamuje nienaturalne podziały komórek w organizmie. Powoduje indukcję apoptozy oraz wpływa na system immunologiczny przez zwiększanie liczby komórek obronnych [149]. Likopen lokalizuje się preferencyjnie w skórze, ze względu na najwyższą hydrofobowość i rozpuszczalność w tłuszczach w porównaniu z innymi karotenoidami. Stężenie likopenu w skórze jest dwukrotnie wyższe niż β -karotenu oraz kilkadziesiąt razy wyższe niż ksantofili. Wynosi ok. 2 pmol/mm średnicy biopsji [150]. Charakteryzuje się największym potencjałem antyoksydacyjnym [151].



Rys. 12. Schemat działania likopenu na zdrowy i chory organizm ludzki.

2.9.3. Zastosowanie w przemyśle kosmetycznym

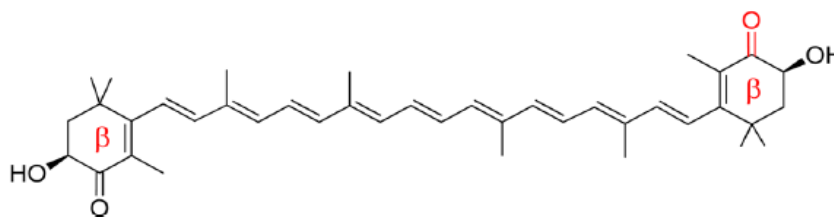
Likopen zmniejsza szkodliwe efekty promieniowania słonecznego zarówno te krótkotrwałe (poparzenia słoneczne), jak i długotrwałe (rak skóry). Odpowiedzialny jest za pobudzanie naturalnej ochrony przeciwsłonecznej, dlatego też stosowany jest w formułacjach kosmetycznych, których zadaniem jest odnowa naskórka i ochrona przed promieniowaniem ultrafioletowym [152]. Związek ten odznacza się silną lipofilowością ($\log P \sim 15$), co powoduje, że jego przenikanie do warstwy rogowej naskórka jest utrudnione ze względu na duże powinowactwo do warstw lipidowych naskórka oraz zatrzymywanie w tej warstwie. Likopen najczęściej występuje w formie all-trans, forma ta charakteryzuje się wyższą stabilnością oraz większą biodostępnością do *stratum corneum* niż forma cis [153]. Likopen pobudza syntezę prokolagenu, czyli białka prekursorowego kolagenu, które odpowiedzialne jest za sprężystość skóry, dlatego też stosowany jest w kremach anti-age, spłyca istniejące zmarszczki i zapobiega powstawaniu nowych. Jest powszechnie wykorzystywany w leczeniu trądziku młodzieńczego, rozjaśnia cerę oraz poprawia koloryt skóry. Likopen przejawia zdolność do aktywacji procesu regeneracji skóry oraz przyspiesza gojenie się ran. Poprawia ogólną kondycję skóry, nawilża ją, odżywia, zmiękcza, oczyszcza, oraz działa regenerująco-ujędniająco. Stosowany jest w tonizacji cery tłustej i w kosmetykach przeznaczonych dla skóry suchej, szarej oraz zmęczonej [154-159].

2.10. Astaksantyna

Astaksantyna ((6S)-6-hydroksy-3-[(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-18-[(4S)-4-hydroksy-2,6,6-trimetylo-3-okso-1-cycloheksenyl]-3,7,12,16-tetrametyloktadeka-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenyl]-2,4,4-trimetylo-1-cycloheks-2-enone) zwana jest królową karotenoidów. Jest naturalnym barwnikiem zwierząt i roślin, nadaje im piękny czerwony kolor. Zauważyć ją można w upierzeniu flamingów, mięśniach łososi i innych ryb, homarach, oraz w krewetkach. Największą ilością astaksantyny charakteryzują się algi. To właśnie one są głównym źródłem pozyskiwania tego związku [160].

2.10.1. Budowa

Astaksantyna jest ksantofilem, w strukturze chemicznej posiada dwie grupy hydroksylowe oraz dwie grupy karbonylowe (rys. 13). Dzięki takiej budowie ma silniejsze działanie antyoksydacyjne oraz efektywniej działa w organizmie. Nie wykazuje aktywności do witaminy A, ponieważ posiada tlenowe grupy w swojej cząsteczce [161].



Rys. 13. Szkieletowy, prosty wzór strukturalny astaksantyny.

2.10.2. Właściwości i zastosowanie

Astaksantyna jako przeciwutleniacz jest 14 razy silniejsza niż witamina E, 54 razy silniejsza niż β -karoten oraz 65 razy silniejsza niż witamina C [162,163]. Jako jedna z nielicznych związków przechodzi przez barierę krew-mózg oraz krew-siatkówka, zaopatrując organy oraz układ nerwowy i krwionośny w przeciwutleniacze, które wymiatają wolne rodniki. Skutkiem tego jest zapobieganie uszkodzeń tych narządów. Karotenoid ten ze względu na swoje silne właściwości przeciwutleniające wpływa korzystnie na wiele tkanek naszego organizmu. Chroni serce przed zawałem oraz nowotworami poprzez wytwarzanie substancji przeciwzakrzepowych. Oslania wątrobę oraz chroni przed stanami zapalnymi. Zapobiega chorobom stawów, ścięgien i mięśni. Zmniejsza ryzyko zachorowania na artretyzm. Podczas wysiłku fizycznego mięśnie są intensywnie natleniane, wskutek czego dochodzi do ich skurczy. Astaksantyna tłumy ten proces dzięki czemu możemy ćwiczyć dalej. Odpowiedzialna jest za napięcie błony komórkowej. Przenika barierę między siatkówką a układem krwionośnym zaopatrując oko w przeciwutleniacze, w związku z czym zapobiega powstawaniu stanom zapalnym [164].

2.10.3. Zastosowanie w przemyśle kosmetycznym

Rozpuszczalna w tłuszczach astaksantyna dobrze przenika w warstwę rogową naskórka, w niewielkim stopniu do skóry właściwej i tkanki podskórnej. Przejawia działanie normalizujące w procesach różnicowania keratynocytów. Wpływa na funkcje regulacyjne skóry. W naskórku astaksantyna wpływa na syntezę białek, metabolizm komórkowy, podziały komórkowe, wydzielanie czynników transkrypcyjnych oraz czynników wzrostu. Przyspiesza jego odnowę. Jest odpowiedzialna za proliferację komórek warstwy żywej naskórka. Dzięki poprawie struktur warstwy rogowej powoduje wzmocnienie funkcji ochronnej naskórka i zmniejszenie przeznaskórkowej utraty wody - TEWL [160-168]. W warstwach skóry właściwej zwiększa produkcję kolagenu i elastyny. „Królowa karotenoidów” chroni skórę przed uszkodzeniami spowodowanymi przez promieniowanie słoneczne na kilka sposobów. Zwiększa gęstość optyczną, neutralizuje tlen singletowy ($^1\text{O}_2$) oraz tworzy kwas all-trans-retinowy, który jest stosowany w leczeniu dermatoz, wywołanych promieniowaniem słonecznym [162]. Redukcja rumienia jest jednym z czynników potwierdzających zdolność astaksantyny do ochrony przed promieniowaniem UV. Redukuje również poziom oksydacji lipidowej. Astaksantynę wykorzystuje się do produkcji preparatów matujących. Zwłaszcza u osób posiadających cerę tłustą i mieszaną, dla której szczególnie trudno znaleźć nie tylko odpowiednie produkty do pielęgnacji, ale również do makijażu. Wykorzystywana jest do produkcji kremów posiadających właściwości odżywcze, nawilżające, ujędrniające i tonizujące [163].

2.11. Badania *in vivo* formulacji kosmetycznych (testy na probantach)

Producenci przed wprowadzeniem na rynek konsumencki produktów, zobowiązani są do zapewnienia ich bezpieczeństwa oraz stabilności. Aktualne przepisy opierają się na Rozporządzeniu Unii Europejskiej (1223/2009) z dnia 30 listopada 2009 roku [169]. Jej priorytetem jest zagwarantowanie bezpieczeństwa produktu kosmetycznego oraz określenie wymagań jakie powinien spełniać każdy kosmetyk dopuszczony na rynek konsumencki. Odwołując się do ustawodawstwa europejskiego polska ustawa o kosmetykach z dnia 30 marca 2001 roku, (Dz.U.z 2001 r. Nr 42 z późniejszymi zmianami, tekst ustawy w wersji ujednoliconej: Dz. U. 2013 r. poz. 475) przeniosła odpowiedzialność za produkt na producenta, dystrybutora lub importera kosmetyku [170]. Wskazano obowiązki jakim powinien sprostać producent, żeby wprowadzić nowy preparat na rynek. Dokumenty kosmetyku muszą przedstawiać najistotniejsze informacje: ilościowy i jakościowy skład kosmetyku, specyfikację fizykochemiczną i mikrobiologiczną składników, ocenę fizykochemiczną kosmetyku obejmującą wyniki stabilności preparatu, ocenę mikrobiologiczną końcowego produktu jak również oceny chemicznej i mikrobiologicznej czystości gotowego produktu kosmetycznego, charakterystykę metody produkcji, dobranej według dobrej praktyki produkcji, dokumentację potwierdzającą zapewniane działanie na opakowaniu, informacje o niepożądanych skutkach na zdrowie ludzi spowodowane poprzez stosowanie kosmetyku oraz ocenę wpływu produktu kosmetycznego na zdrowie ludzi, uwzględniającą charakterystykę toksykologiczną składników, ich struktury chemicznej oraz stopnia kontaktu z ciałem badanego przy użyciu metod aplikacyjno-aparaturowych [171,172].

Ocena potencjalnego bezpieczeństwa stosowania każdego nowego kosmetyku musi zostać wykonana przed wprowadzeniem go na rynek konsumencki. Preparat ten powinien zostać przebadany również pod kątem skuteczności działania przez producenta. Badania te przeprowadza się metodą *in vivo*, przy pomocy testów aplikacyjnych (naskórkowych) na skórze człowieka (probanta) [173]. Wyłącznie produkty, których skład został wcześniej potwierdzony pod względem bezpieczeństwa może zostać poddany badaniom dokonanych na ludziach [174,175]. Wykonywane są badania dermatologiczne, które mają na celu sprawdzenie rodzaju i stanu skóry, tendencji do alergii. Badacz powinien zebrać informacje na temat przebytych, aktualnych chorób skóry, sposobów ich leczenia oraz ogólnego stanu zdrowia. Aby doświadczenie mogło zostać przeprowadzone zgodnie z wymogami Komisji Bioetycznej wszyscy probanci muszą podpisać formularz świadomej zgody na udział w doświadczeniu, otrzymać wyczerpujące informacje dotyczące celu analizy, sposobu jej wykonania, jak również ewentualnych skutków ubocznych. Probanci otrzymują teczkę z pisemną instrukcją, w jaki sposób należy stosować badany produkt oraz ankietę. Na podstawie ankiety poznajemy opinię probantów oraz informacje, które pozwalają na ewentualne zmiany, które powinny prowadzić do ulepszenia preparatów kosmetycznych. Badania trwają od kilku do kilkunastu tygodni. Najczęściej preparaty aplikowane są na przedramię dwa razy dziennie, rano i wieczorem [176,177].

2.11.1. Testy płatkowe

Do metod stosowanych w ocenie działania drażniącego badanego produktu kosmetycznego z wykorzystaniem testów naskórkowych (ocena dermatologiczna) należą: testy jednorazowej aplikacji pod okluzją, tzw. testy płatkowe (ang. *on-time occlusive tests*), test Schwartz-Pecka, testy wielokrotnej aplikacji w teście płatkowym (ang. *repeated occlusive tests* ROT) oraz testy powtarzanej otwartej aplikacji (ang. *repeated open application test* ROAT), testy płatkowe z powtarzalnym użyciem płatka (ang. *Human Repeated Insult Patch Tests* – HRIPT), z przerywaną ekspozycją (test Draize’a, Shelańskiego-Shelańskiego i Vossa-Griffitha), z ciągłą ekspozycją (ang. zmodyfikowany test Draize’a) oraz wzmocnienia (ang. *Human Maximization Test*) [178,179]. Testy płatkowe (ang. *patch tests*) są najczęściej wykorzystywaną metodą sprawdzania odczynu alergicznego na badany produkt kosmetyczny [180]. Jednorazowa aplikacja w teście płatkowym przeprowadzana jest przez 24 lub 48 godzin. Jednakże testy jednorazowej aplikacji nie odzwierciedlają autentycznego narażenia w życiu codziennym. Kontakt z czynnikiem wywołującym podrażnienie jest najczęściej długotrwały i powtarzalny [181]. Stworzono liczne modele mające na celu odwzorowanie kontaktu z czynnikiem podrażniającym przebiegającym w warunkach codziennych [182]. Do oceny drażniącego działania kosmetyków najczęściej stosuje się metodę, która polega na krótkotrwałej ekspozycji skóry na daną substancję w teście płatkowym. Reakcja skóry zostaje porównana z wzorcem substancji drażniącej [183]. Zakłada się probantom testy płatkowe na skórę ramiona. Reakcja skórna oceniana jest po 24, 48 i 72 godzinach. Testy przeprowadzane są najczęściej przez 7-14 dni [184]. Basketter i wsp. [185] stwierdzili, że testy te pozwalają sklasyfikować substancje aktywne występujące w produktach kosmetycznych jako drażniące lub niewywołujące podrażnienia. [186].

W tabeli 5 przedstawiono testy kontaktowe stosowane do identyfikacji odczynu drażniącego w produktach kosmetycznych.

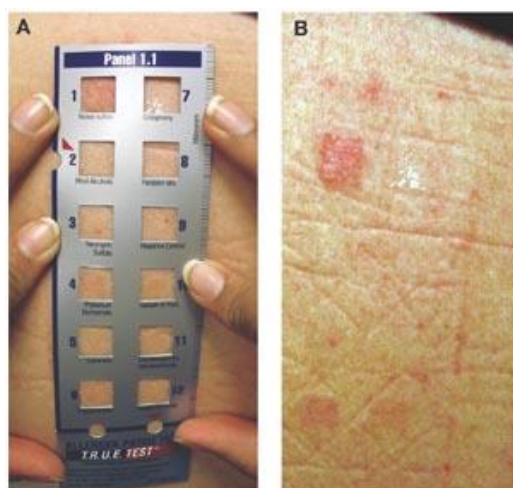
Tab. 5. Testy kontaktowe [187-195].

Test	Miejsce ekspozycji	Liczba ekspozycji	Czas trwania ekspozycji [h]	Ekspozycja przypominająca	Liczba testowanych osób
Schwartz-Peck	górna część ramienia	1	24-72-96	48h test płatkowy +4 tyg. test użytkowy w kompletnym teście	200
Draize	górna część ramienia lub pleców	10	24	24h test płatkowy	200
Shelanski- Shelanski	górna część ramienia	15	24	48h test płatkowy	200
Voss - Griffth	górna część ramienia	9	24	24h test płatkowy	200
zmodyfikowany Draize	górna lub dolna część pleców	10	48	72h test płatkowy	200
wzmocnienia	nałożenie SLS na przedramię lub na łydkę	5	48	5% wag. SLS na 24 h, następnie 48h test płatkowy z badaną substancją	200

SLS - Laurylosiarczan sodu (ang. Sodium Lauryl Sulfate), sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego. Związek jest wykorzystywany jako detergent o charakterze jonowym.

2.11.2. TRUE test

TRUE test (ang. *Thin-layer Rapid Use Epicutaneous test*) jest to gotowy do nałożenia naskórkowy test płatkowy, aplikowany najczęściej na plecy bądź przedramiona (rys. 14). Składa się z 10 lub 12 pól, na 9 lub 11 polach powinny znaleźć się badane substancje, natomiast na ostatnim polu umieszczona jest próba kontrolna (rys. 15). W stosowanych plastrach, alergen jest zamknięty w hydrofilowym żelu, na którym znajduje się nieprzepuszczalny dla wody poliester. Ilość alergenów została określona zgodnie z europejskimi i międzynarodowymi wymogami. Dzięki użyciu TRUE testu możemy zidentyfikować 47 substancji wywołujących alergię. Test ten jest rekomendowany przez organizację *Food and Drug Administration* (FDA). Jest także zgodny z prawem Unii Europejskiej normalizującym produkty lecznicze [196-198]. Badanie dermatologiczne przeprowadzane w formie naskórkowego testu płatkowego ma na celu wykrycie objawów, które świadczyłyby o szkodliwym, tj. alergicznym lub toksyczno-drażniącym, wpływie wyrobu na skórę.



Rys. 14. TRUE test zaaplikowany na plecach probanta (A) oraz odpowiedź skóry ochotnika po 48 h na metale Ni i Co (B) [199].



Rys. 15. TRUE test.

2.11.3. Testy powtarzanej otwartej aplikacji oraz prowokacyjny test używania

Testy powtarzanej otwartej aplikacji (ang. *Repeated Open Application Test - ROAT*) oraz prowokacyjny test używania (ang. *Provocative Use Test – PUT*) polegają na czasowej ekspozycji skóry na produkt poddany doświadczeniom [200,201]. Testy HRIPT (ang. *Human Repeated Insult Patch*) są to testy tolerancji skóry - określają potencjalne podrażnienie i wrażliwość skóry związane z użytym produktem kosmetycznym. Testy powtarzanej otwartej aplikacji i prowokacyjny test używania zostały zaklasyfikowane do testów używania (ang. *use tests*). Naśladują one codzienne stosowanie produktów. Znana ilość preparatu aplikowana jest 1 - 2 razy dziennie najczęściej na skórę przedramienia przez 4 - 28 dni [201-203]. Wadą testów jest długość trwania badania. Odmianą tych testów są „wash test” lub „exaggerated wash test”. Polegają one na zmywaniu znanego produktu najczęściej ze skóry przedramienia w wyznaczonym czasie i z określoną częstotliwością [204,205]. Przeprowadza się także ocenę kliniczną i pomiary biofizycznych właściwości skóry. Zauważono brak idealnej zgodności w ocenie działania drażniącego na skórę pomiędzy wynikami testów naskórkowych pod okluzją oraz testów otwartych. Testy płatkowe mają za zadanie ocenę ostrego działania drażniącego.

Testy używania pozwalają natomiast na oszacowanie zdolności substancji do wywołania reakcji z podrażnieniem na skutek powtarzalnej i przewlekłej ekspozycji [206-208].

Tabela 6 zawiera podsumowanie wszystkich stosowanych metod do oceny działania uczulającego, w tym objętych niniejszym przeglądem literaturowym testów płatkowych i otwartych.

Tab. 6. Przegląd metod stosowanych do oceny wpływu substancji na skórę człowieka [209].

Metoda	Przejrzystość metody badania	Powtarzalność	Liczba prób >3	Znaczenie dawki	Końcowe znaczenie dla człowieka	Korelacja z danymi klinicznymi	Możliwość pomiaru kontrolnego
–testy płatkowe z jednokrotnym użyciem płatków	+++	+++	+	+++	+++	-	+
–HRIPT (testy płatkowe z powtarzanym użyciem płatków)	+	nieznana	++	+++	nieznane	-	-
–ROAT (testy obciążeniowe)	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++

+++ dobra/e

++ dość dobra/e

+ słaba/e

2.12. Analiza instrumentalna

Po zakończeniu testów następuje ocena instrumentalna skóry pod kątem obecności rumienia, złuszczenia, rozpadlin oraz pomiar parametrów biofizycznych takich jak: poziom nawilżenia, zawartość tłuszczu na powierzchni skóry, elastyczność oraz gładkość skóry, stopień intensywności zabarwienia skóry i pomiar przeznaskórkowej utraty wody przy użyciu nieinwazyjnych metod badawczych. Pierwszy parametr zależy od wilgotności warstwy rogowej naskórka, został oznaczony przy wykorzystaniu własności elektrycznych skóry (nazwa aparatu: korneometr). Pomiar poziomu natłuszczenia skóry opiera się na zasadzie fotometrii tłustej plamy [210]. Aparat sebometr stosuje się do oznaczenia poziomu zawartości tłuszczu za pomocą folii z tworzywa sztucznego, której przepuszczalność światła zmienia się po zwilżeniu tłuszczem powierzchni. Badanie to obrazuje w jaki sposób funkcjonują gruczoły łojowe skóry. Do pomiaru elastyczności przeznaczona jest sonda, w której poprzez otwór znajdujący się na powierzchni aparatu pod ciśnieniem jest zasysana skóra. Sonda zasysa więcej skóry wiotkiej, a mniej skóry jędrnej. Wyniki otrzymywane są w postaci bezwymiarowych współczynników elastyczności skóry (R). Powierzchnia skóry pokryta jest różnymi bruzdami pomiędzy którymi znajdują się wzniesienia, dlatego też obraz powierzchni skóry zmienia się w zależności od jej stanu oraz działania czynników zewnętrznych [211]. Wyspecjalizowaną kamerą wykonuje się zdjęcia mikrotopograficzne powierzchni naskórka wraz ze wszystkimi zagłębieniami i nierównościami. Przy użyciu tej metody oznaczamy

szorstkość i gładkość naskórka, stopień jego złuszczenia, długość, szerokość i głębokość zmarszczek, oraz można stwierdzić ogólną kondycję skóry. Badanie intensywności zabarwienia skóry przeprowadza się za pomocą kolorymetrycznej oceny stopnia zaczerwienienia oraz intensywności zabarwienia brązowo-brunatnego skóry [212]. Pomiary dokonuje się za pomocą sondy, mierzącej stopień intensywności zabarwienia skóry. Najbardziej istotnym parametrem jest pomiar przeznaskórkowej utraty wody za pomocą aparatu tewametru, który mierzy szybkość parowania wody z powierzchni skóry. Doświadczenie to stwierdza długość utrzymywania się prawidłowego stopnia nawilżenia skóry. Poddaje się również ocenie stopień nasilenia rumienia oraz intensywność zabarwienia plam barwnikowych [213-215].

2.13. Analiza sensoryczna

Analiza sensoryczna jest to dział analityki, który zajmuje się pomiarem i oceną właściwości produktu przy użyciu zmysłów: dotyku, wzroku, słuchu, smaku, węchu, w trakcie jego używania. Badania przeprowadzane są przez panelistów na grupie ochotników - potencjalnych, przyszłych konsumentów, w ściśle określonych i kontrolowanych warunkach [214]. Pomiary te przeprowadzane są metodą „pół na pół” tzn. ochotnik otrzymuje dwa produkty testowe, którymi są kosmetyki różniące się składem lub stężeniem składników aktywnych. Stosowana jest także metoda tzw. podwójnej ślepej próby polegająca na tym, że ani osoba biorąca udział w badaniu ani osoba prowadząca badanie nie wie, jaka jest różnica pomiędzy ocenianymi preparatami [215]. Badania sensoryczne kosmetyków są uważane za podstawę kompleksowej charakterystyki cech testowanego produktu. Na podstawie wyników badań konsumenckich oceniane są cechy produktu istotne dla danej grupy odbiorców. Polegają one na ocenie odczuć probantów podczas stosowania produktu za pomocą ujednoliconych standardów weryfikacyjnych. Producenci wykorzystują najczęściej te badania przy wprowadzeniu lub ulepszeniach swoich produktów [215,216-219].

2.14. Badanie biodostępności dermalnej z wykorzystaniem metody zdzierania

Substancje aktywne, które znajdują swoje zastosowanie w przemyśle kosmetycznym powinny spełniać szereg wymagań. Jednym z najbardziej istotnych warunków jest zmaksymalizowanie stężenia substancji czynnej w miejscu działania. W celu stwierdzenia w jakim stopniu dana substancja przenika do naszej skóry, aby potwierdzić jej działanie oraz określić potencjalną toksyczność lub wyeliminować niepożądane efekty uboczne, wprowadzono badanie biodostępności dermalnej. Biodostępność dermalna została opisana jako model stężenia wolnej substancji czynnej w czasie oraz w miejscu docelowym. Wartość tego modelu pozostaje w dużym stopniu teoretyczna, ze względu na trudność w określeniu zawartości substancji w skórze [220]. Dostępne algorytmy pozwalają na oszacowanie maksymalnej ilości substancji przenikającej przez skórę. Do najczęściej stosowanych metod badania biodostępności dermalnej należą badania *in vivo* wykorzystujące metody spektroskopowe. Metoda zdzierania (*ang. strippingu*) w farmakologii jest jedną z najczęściej stosowanych metod określania biorównoważności substancji aktywnych zawartych w kosmetykach, dermokosmetykach lub lekach. Badanie jest coraz częściej wykorzystywane ze

względem na możliwość oszacowania przy jego pomocy wielkości i stopnia biodostępności dermalnej produktów. Metoda ta pozwala ustalić ilość produktu obecnego w *stratum corneum* w funkcji czasu zaraz po aplikacji oraz po zmyciu preparatu zawierającego substancję aktywną. Wadą tej metody jest brak stwierdzenia klinicznego bezpieczeństwa stosowania substancji czynnej oraz jej skuteczności. Metoda zdzierania nie uzyskała standardów potrzebnych do użycia dla skóry chorej. Natomiast jej zaletą jest prostota wykonania oznaczeń, bezbolesność i nieinwazyjność, stosunkowo niskie koszty. W trakcie badań tylko martwe komórki naskórka - korneocyty zostają usunięte [221]. Test zdzierania polega na usunięciu kolejnych warstw SC przy użyciu taśmy adhezyjnej. Metoda ta znalazła swoje szczególne zastosowanie w badaniach nad kinetyką epidermalnego wzrostu oraz właściwości *stratum corneum*. Jest również wykorzystywana w pomiarach masy komórkowej SC, funkcji barierowych oraz wydzielania endogennych substancji czynnych [220]. Badanie to znalazło zastosowanie w biologii naskórka do określenia funkcji barierowych, zbadania zapaleń oraz zaburzeń nowotworowych, do sprawdzania ekspresji genów, jak również do oceniania skóry zwierzęcej jako formy zastępczej dla skóry ludzkiej. Wykorzystywane jest w celu zidentyfikowania chorób zapalnych, nowotworów oraz przy monitorowaniu ekspresji genów. Metoda ta po raz pierwszy została wynaleziona w latach czterdziestych XX wieku przez Pinkusa [220]. W metodzie tej wykazano wzrost aktywności mitotycznej komórek naskórka na skutek przeprowadzenia testu zdzierania. Uważał, że zdarta warstwa komórek rogowych została zastąpiona przez komórki, które powstały podczas podziałów mitotycznych. Metoda zdzierania (strippingu) wykorzystująca taśmy adhezyjne powoduje zwiększenie między innymi: syntezy lipidów, syntezy DNA w komórkach naskórka [220]. Stripping obejmuje usuwanie kolejnych mikroskopijnych warstw SC. Procedura wykonania metody polega na wyznaczeniu pola badanego na powierzchni skóry, naniesieniu na pole równomiernej ilości preparatu z substancją czynną, umieszczeniu taśmy adhezyjnej na powierzchni skóry, po którym dociska się delikatnie naklejone taśmy zapewniając ich dobry kontakt z komórkami *stratum corneum* oraz usunięciu taśmy z powierzchni naskórka. Przeprowadzona procedura jest bezbolesna oraz nieinwazyjna. Wraz z taśmą adhezyjną usuwane są tylko martwe komórki naskórka (korneocyty), które występują w jego lipidowym cemencie [220]. Homeostatyczna odpowiedź naskórka wywoływana jest natychmiastowo, co powoduje szybką odnowę funkcji barierowych [220]. Kolejnym etapem jest poddanie zerwanej taśmy adhezyjnej ekstrakcji rozpuszczalnikiem oraz określenie ilościowo stężenia zaadsorbowanej substancji czynnej [221]. Procedura oznaczenia ilościowego zależy od właściwości substancji czynnej oraz ilości zatrzymanej na taśmie adhezyjnej. Do metod najczęściej stosowanych należą: spektrofotometria UV-VIS, chromatografia ciekłowa HPLC wykorzystująca detekcję UV, fluorescencja rentgenowska, chromatografia gazowa GC oraz spektroskopia FTIR. Oznaczenie ilościowe zawartości substancji aktywnej przy użyciu wielu taśm adhezyjnych pozwala na oszacowanie łącznej zawartości w SC. Ilość usuniętego *stratum corneum* na każdej pojedynczej taśmie zależy od wielu wewnętrznych i zewnętrznych czynników [220]. Wielkość korneocytów zależy od anatomicznego obszaru na powierzchni naskórka, wieku oraz pory roku podczas której przeprowadzane jest badanie. Do zewnętrznych czynników mających wpływ na ilość usuniętego SC przy użyciu taśm adhezyjnych należą: rodzaj taśm, siła z jaką jest ona odrywana z powierzchni skóry, czas jej oddziaływania na skórę oraz typ miejscowo zastosowanej substancji czynnej. Zdarza się, że czynniki zewnętrzne nie ulegające

zmianie mogą nie prowadzić do stałej ilości usuniętych komórek SC na każdej taśmie adhezyjnej z powodu czynników wewnętrznych. W 1998 roku US Food and Drug Administration (FDA) opublikowało procedury przeprowadzania badań biodostępności substancji metodą zdzierania [221].

Czynniki wpływające na technikę zdzierania [221]:

- miejsce aplikacji

Zrywanie *stratum corneum* przy użyciu metody zdzierania przeprowadza się w uniwersalny sposób. Na powierzchni, na której zostanie zaaplikowany preparat nie powinny znajdować się żadne włosy, a powierzchnia powinna być gładka i nie pokryta bruzdami. W przypadku pomiaru owłosionych części ciała włosy powinny one zostać usunięte.

- rodzaj taśmy

W badaniu używa się różnego rodzaju taśm adhezyjnych (komercyjnych oraz wytworzonych samodzielnie). Powinno się w każdym z przypadku zagwarantować jednorodny skład i rozmieszczenie warstwy adhezyjnej na taśmie. Taśmy powinny charakteryzować się następującymi właściwościami: przezroczystością, elastycznością. Powinna zostać sprawdzona kompatybilność taśmy ze skórą probanta w celu uniknięcia działań ubocznych.

- sposób aplikacji taśmy

Taśmy adhezyjne powinny być ostrożnie nakładane na wyznaczone miejsca na powierzchni skóry, tak aby uniknąć fałd.

- nacisk podczas aplikacji taśmy

Jednorodny nacisk na nałożoną na powierzchnię skóry taśmę jest jednym z podstawowych czynników wpływających na ilość zerwanego SC.

- szybkość zrywania

Nie został do chwili obecnej zestandaryzowany czynnik wpływający na ilość usuniętego SC - szybkość zrywania taśmy z powierzchni skóry. Sposób zrywania taśmy przez osobę prowadzącą pomiar ma znaczenie co do ilości SC usuniętego na taśmie adhezyjnej. Zawsze powinno się stosować tę samą szybkość zrywania taśmy. Zwalnianie lub całkowite zatrzymanie czynności zrywania może powodować wzrost ilości korneocytów, które przylegają do taśmy. Wzrost szybkości zrywania powoduje zmniejszenie się ilości SC przyklejonych do taśmy adhezyjnej.

- wpływ bruzd

Powierzchnia skóry charakteryzuje się elastyczną siecią bruzd. Sieć ta może spowodować zerwanie jakiejś części SC z różnych poziomów warstw komórek przez taśmę. Uważane jest to za wadę strippingu, ponieważ ograniczone zostają badania nad penetracją oraz przenikaniem zaaplikowanych preparatów [222,223].

W tabeli 7 przedstawiono przykładowe substancje aktywne wykorzystywane w dermokosmetykach, które zostały poddane badaniu biodostępności.

Tab. 7. Przykładowe substancje aktywne stosowane w dermo kosmetykach poddane badaniu biodostępności przy użyciu metody zdzierania.

Substancja aktywna	Zastosowanie w kosmetykach	Literatura
Keratyna	składnik szamponów, odżywek, lakierów oraz innych preparatów do stylizacji włosów, płynów do trwałej ondulacji i rozjaśniania włosów, odżywek typu "włos w płynie"	[224,225]
Tlenek tytanu (IV)	jako wysoki filtr przeciwsłoneczny w kremach na dzień, podkładach, pudrach, szminkach, balsamach do ciała oraz maseczkach	[226]
Cyklodekstryny	termiczny rozkład cyklodekstryny jest m.in. wykorzystywany do produkcji układów zdolnych do powolnego uwalniania substancji zapachowych. Dodaje się je np. do proszków do prania	[227]
Ekstrakt z Arniki montany	używany jest jako składnik żelów do oczu, który niweluje opuchliznę	[228]
Kwas retinowy	poprawa struktury i spójności naskórka, konturu twarzy oraz nawilżenia skóry, wygładza skórę i redukuje zrogowaciałe warstwy naskórka, cofa objawy fotostarzenia skóry, zastępuje uszkodzone słońcem i czynnikami zewnętrznymi komórki skóry, zdrowymi i prawidłowo uformowanymi, powoduje ogólne pogrubienie i renowację skóry oraz rozjaśnia przebarwienia posłoneczne i hormonalne.	[229]
Kwas salicylowy	zastosowanie kwasu salicylowego w preparatach kosmetycznych, które warunkują jego właściwości przeciwwaskórnikowe, bakteriobójcze, antyseptyczne, przeciwzapalne, przeciwgrzybiczne, keratolityczne, które pomagają w walce z zaskórnikami, powierzchniowymi przebarwieniami oraz zmniejszają łojotok. Stosowany jest w tonikach złuszczeniowych.	[230]
Laurylosiarczan sodu (SLS)	detergenty syntetyczne, stosowane do odłuszczenia i mycia. Możemy je znaleźć w praktycznie każdym szamponie, żelu myjącym, czy płynie do kąpieli	[231]
Minoksydyl	stosowany w szamponach przeciwdziałających wypadaniu włosów	[232]
Koenzym Q10	jest nieocenionym składnikiem opóźniającym procesy starzenia się, dodającym skórze energii i witalności, usuwającym z niej toksyny oraz walczącym z wolnymi rodnikami	[233]
Miedź	wykazuje właściwości przeciwutleniające - przyspiesza produkcję kolagenu, jako składnik kosmetyków pomaga ujędrnić skórę oraz zredukować zmarszczki. Miedź działa także antybakteryjnie i przeciwzapalnie, można ją odnaleźć w preparatach antybakteryjnych.	[234]
4-metylobenzylideno kamfora(4-MBC)	znalazła zastosowanie jako substancja promieniochronna w kremach na dzień oraz przeciwsłonecznych	[235]

2.15. Stabilność emulsji kosmetycznych

Badania bezpieczeństwa oraz stabilności emulsji są jednymi z najważniejszych wymogów, które powinny być spełnione przez producentów firm kosmetycznych oraz

farmaceutycznych. Wykonywane są w celu potwierdzenia właściwych standardów fizykochemicznych i mikrobiologicznych badanych produktów [236]. Określenie stabilności emulsji odnosi się do zdolności emulsji, do przeciwstawiania się dążeniu układu termodynamicznie niestabilnego do uzyskania jak najniższej wartości entropii, czyli do zmian w rozkładzie przestrzennym lub zmian w organizacji struktury cząsteczek emulsji [237]. Zmiany te prowadzą do powstania procesów starzenia się emulsji: śmietanowania, sedymentacji, koalescencji, flokulacji, inwersji faz oraz dojrzewania Oswaldowskiego [238,239]. Różnorodność produktów kosmetycznych, kosmeceutycznych oraz farmaceutycznych, różne warunki ich przechowywania i wykorzystywania oraz rosnąca ilość składników sprawiły, że testy stabilności wykonywane metodą klasyczną mogą być długotrwałe i trudne do interpretacji [240].

2.15.1. Rodzaje niestabilności emulsji

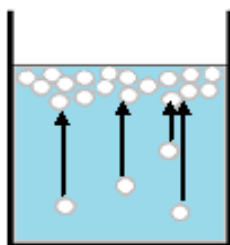
W emulsjach termodynamicznie nietrwałych można zaobserwować zachodzenie procesów destabilizacji, w wyniku czego zachodzi rozdział faz tworzących układ [167, 241]. Biorąc pod uwagę mechanizmy fizykochemiczne, typy niestabilności emulsji można podzielić na odwracalne i nieodwracalne [241]:

- niestabilności odwracalne - śmietanowanie, sedymentacja, flokulacja,
- niestabilności nieodwracalne - koalescencja.

Niestabilność odwracalna

Jest to niestabilność, którą usuwa się poprzez wymieszanie układu. Wśród niestabilności emulsji tego typu wyróżnia się [242]:

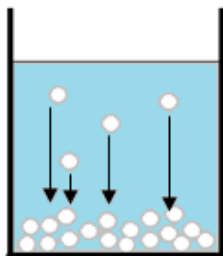
- śmietanowanie emulsji - jest to zjawisko gromadzenia się cząstek fazy zdyspergowanej o niezmiennym rozmiarze na powierzchni układu (rys. 16). Niestabilność ta występuje zazwyczaj w emulsjach typu O/W, co jest wynikiem przemieszczania się kropli substancji zdyspergowanej o mniejszej gęstości w kierunku powierzchni emulsji. Aby zapobiec śmietanowaniu, należy zwiększyć lepkość i gęstość fazy rozpraszającej emulsji [167,242].



Rys. 16. Schemat śmietanowania emulsji [zaadoptowane z 167].

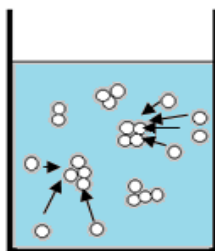
- sedymentacja emulsji - jest to proces analogiczny do śmietanowania, różniący się tym, że cząstki fazy rozproszonej o niezmiennych rozmiarach gromadzą się na dnie naczynia, w którym znajduje się emulsja (rys. 17). Sedymentacja jest spowodowana

oddziaływaniami grawitacji ziemskiej na cząstki fazy zdyspergowanej. Zachodzi we wszystkich rodzajach emulsji. Tak jak w śmietanowaniu, sedymentację można zmniejszyć przez dobór odpowiednich parametrów, takich jak lepkość i gęstość fazy dyspergującej, a także rozmiar i ładunek miceli emulsji [167,243].



Rys. 17. Schemat sedymentacji emulsji [zaadoptowane z 167].

- flokulacja emulsji - zjawisko to polega na gromadzeniu się czyli agregacji cząstek fazy rozproszonej razem, bez ich zlewania się w większe krople oraz bez znacznego przemieszczania się ku dolnej lub górnej części naczynia, w którym się znajduje (rys. 18) [167,244].

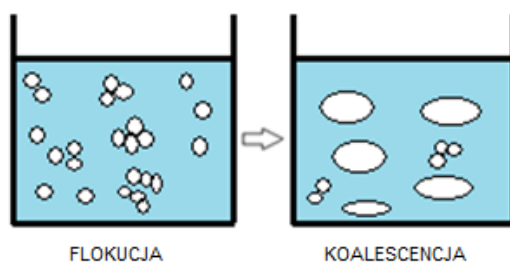


Rys. 18. Schemat flokulacji emulsji [zaadoptowane z 167].

Niestabilność nieodwracalna

Jest to niestabilność, której nie możemy usunąć przez wymieszanie układu. Do zjawisk nieodwracalnych zaliczamy:

- koalescencję, zjawisko będące najczęściej następstwem flokulacji. Polega na zlewaniu się cząstek fazy zdyspergowanej w większe krople (rys. 19) [167,245].



Rys. 19. Schemat koalescencji emulsji [zaadoptowane z 167].

- złamanie emulsji, polega na całkowitym rozwarstwieniu się układu na fazę wodną i olejową. Niestabilność ta jest najczęściej efektem końcowym procesu koalescencji (rys. 20) [167,246].



Rys. 20. Schemat złamania emulsji [zaadoptowane z 167].

2.15.2. Przyczyny destabilizacji emulsji kosmetycznych

Destabilizacja emulsji jest procesem złożonym i zależnym przede wszystkim od ruchu cząstek fazy zdyspergowanej. Do najważniejszych zjawisk fizykochemicznych mających wpływ na destabilizację emulsji możemy zaliczyć prostoliniowy ruch cząstki fazy wewnętrznej w emulsji, ruch cząstek fazy wewnętrznej ku sobie, ruchy Browna oraz zjawisko Ostwalda [167].

Prostoliniowy ruch cząstki fazy wewnętrznej w emulsji

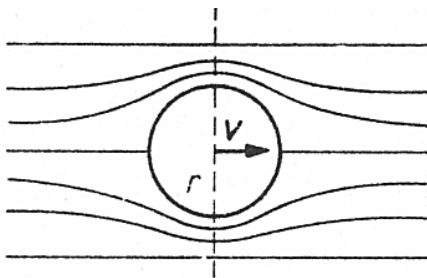
Prostoliniowy ruch cząstki fazy wewnętrznej w emulsji jest opisane prawem Stokesa (przy założeniu, że kropla fazy zdyspergowanej ma kształt kulisty). Nawiązuje głównie do procesów śmietanowania i sedymentacji, zachodzących w układzie [247]. Prawo Stokesa charakteryzuje siłę oporu, którą powinno pokonać kuliste ciało, aby mogło poruszać się prostoliniowo w cieczy lub gazie z określoną prędkością (rys. 21).

Prawo Stokesa opisywane jest następującym wzorem:

$$\vec{F} = -6\pi\eta r\vec{v}$$

gdzie:

$\vec{F}$ oznacza siłę oporu, η – lepkość dynamiczną płynu, r – promień kuli, a $\vec{v}$ to prędkość ciała względem płynu. Wzór jest spełniony tylko dla niewielkich prędkości ciał kulistych [247].



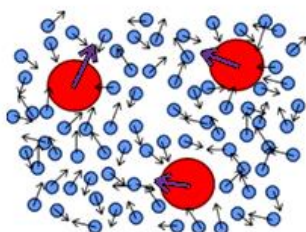
Rys. 21. Schematyczne przedstawienie prawa Stokesa [247].

Ruch cząstek fazy wewnętrznej ku sobie

Zjawisko ruchu cząstek fazy wewnętrznej ku sobie wywołują siły van der Waalsa, które oddziałują pomiędzy elektrycznie obojętnymi cząstkami lub atomami. Gdy krople fazy wewnętrznej są od siebie oddalone, można zaobserwować polaryzację ładunków elektrycznych tych kropli, co powoduje ich wzajemne przyciąganie. Natomiast gdy drobiny fazy wewnętrznej znajdują się zbyt blisko siebie, możemy zaobserwować wzajemne odpychanie drobin, co jest przyczyną takich zjawisk jak flokulacja i koalescencja. Aby zmniejszyć wpływ sił Van der Waalsa na destabilizację emulsji, należy zwiększyć stopień rozdrobnienia emulsji, co zapewni zwiększenie odległości pomiędzy drobinami fazy wewnętrznej [167].

Oscylacyjne ruchy cząstek fazy zdyspergowanej (ruchy Browna)

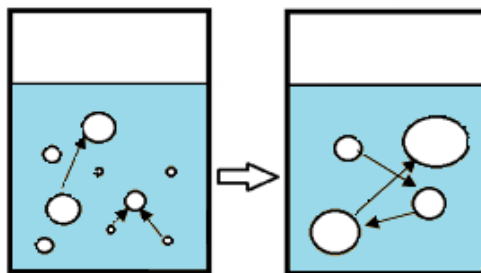
Oscylacyjne ruchy cząstek fazy zdyspergowanej są to chaotyczne ruchy cząstek zdyspergowanych w płynie, które zachodzą w wyniku ich zderzeń z cząstkami fazy dyspergującej (rys. 22). Ruchy Browna słabną wraz ze wzrostem rozmiarów cząstek i spadkiem temperatury układu, co oznacza, że w przypadku stabilnej, homogenicznej emulsji są one nieuniknione i maleją, gdy emulsja ulega destabilizacji [248].



Rys. 22. Ruchy Browna [248].

Zjawisko Ostwalda

Zjawisko Ostwalda powoduje wzrost rozmiarów cząstek fazy zdyspergowanej, a jego efekt jest podobny do koalescencji. Mechanizm zlewania się kropli fazy wewnętrznej jest inny, niż przy koalescencji, cząstki fazy wewnętrznej poruszają się w fazie ciągłej od jednej kropli do drugiej (rys. 23). Zjawisko Ostwalda można zaobserwować, gdy krople fazy zdyspergowanej różnią się od siebie rozmiarem oraz energią wewnętrzną. Migracja cząstek fazy rozproszonej może zachodzić pośrednio - migracja cząstki fazy wewnętrznej wraz z kilkoma cząstkami emulgatora lub bezpośrednio - migracja samych cząstek fazy wewnętrznej. Warunkiem, który musi zostać spełniony aby zaszła migracja bezpośrednia jest częściowa rozpuszczalność zdyspergowanych drobin w fazie ciągłej. Destabilizację emulsji na skutek zjawiska Ostwalda, tak jak w przypadku ruchów Browna, zmniejszyć można przez homogenizację układu [167, 249, 250].



Rys. 23. Schemat zjawiska Ostwalda w emulsji [zaadoptowane z 167].

Sposoby stabilizacji emulsji

Wprowadzenie emulgatora do układu dwóch niemieszających się faz umożliwia powstawanie układu dyspersyjnego, w którym cząstki fazy wewnętrznej emulsji są rozproszone w postaci drobnych kropelek w fazie rozpraszającej. Emulgator obniża międzyfazowe napięcie powierzchniowe, natomiast niemożliwe jest obniżenie jego wartości do zera. Dlatego też każda emulsja wykazuje tendencję do destabilizacji. Zjawisku powstawania emulsji towarzyszy wzrost entropii badanego układu. Jest to przyczyną ich niestabilności. Wszystkie układy dążą do uzyskania jak najniższej entropii [167].

Istnieją metody, umożliwiające zwiększenie stabilności emulsji. Polegają one na stabilizacji emulsji ładunkiem elektrycznym, „wzmocnieniu” powierzchni międzyfazowej oraz na utrudnieniu kontaktu cząstek fazy zdyspergowanej.

2.15.3. Metody stabilizacji emulsji ładunkiem elektrycznym

Metoda ta polega na wprowadzeniu ładunku elektrycznego na powierzchnię kropli fazy zdyspergowanej. Ładunek wprowadzany jest za pomocą cząstek adekwatnie dobranego emulgatora. Zostaje utworzona podwójna warstwa elektryczna wokół kropli fazy rozproszonej, która powoduje odpychanie poszczególnych kropli tej fazy, dzięki czemu utrudniona zostaje ich flokulacja i koalescencja. Metoda stabilizacji układu emulsyjnego jest zadowalająca wtedy, gdy do wykonania emulsji wykorzystuje się fazę zewnętrzną, dobrze przewodzącą ładunek. Metoda ta znajduje zastosowanie w praktyce do stabilizacji emulsji typu O/W. Wadą metody jest łamanie się emulsji. Spowodowane jest to wprowadzeniem do układu nadmiaru elektrolitów [167,251,252].

2.15.4. Metody polegające na „wzmocnieniu” powierzchni międzyfazowej

„Wzmocnienia” granicy faz emulsji dokonuje się za pomocą zwiększenia upakowania cząstek emulgatora na granicy kropli fazy rozproszonej, co możemy osiągnąć dzięki emulgowaniu układu dwóch niemieszających się faz używając mieszaniny emulgatorów. Metoda ta zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia koalescencji. W części doświadczalnej pracy stosowano jako emulgatory dla kremów typu O/W - monostearynian glicerolu oraz alkohol cetylowy, natomiast dla emulsji typu W/O - alkohol cetylowy oraz lanolinę [167,252].

2.16. Metody badania składu form kosmetycznych

Zgodnie z ustawą o kosmetykach z dnia 30 marca 2001 roku, (Dz.U.z 2001 r. Nr 42 z późniejszymi zmianami, tekst ustawy w wersji ujednoliconej: Dz. U. 2013 r. poz. 475) [170] aby wprowadzić nowy preparat na rynek, dokumentacja kosmetyku musi zawierać jego ilościowy i jakościowy skład [253-263].

2.16.1. Badanie składu kremów komercyjnych zawierających karotenoidy za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC)

Chromatografia jest metodą analityczną, która wykorzystuje zjawisko różnej szybkości migracji składników analizowanej próby w fazie gazowej lub ciekłej. Chromatografię dzielimy na gazową lub ciekową [264-268]. Chromatografia ciekowa wykorzystuje efekt rozdziału chromatograficznego z użyciem cieczy jako fazy ruchomej. Dobór składu fazy ciekłej i rodzaju fazy stacjonarnej jest uzależniony od składu badanych próbek [269-271].

Odmianą chromatografii ciekowej jest wysokosprawna chromatografia ciekowa (HPLC - ang. *High Performance Liquid Chromatography*), która jest uniwersalną metodą analityczną, stosowaną głównie do analizy złożonych próbek, zwłaszcza zawierających nielotne związki chemiczne, a w szczególności substancje biologicznie czynne [266-273].

Metoda wysokosprawnej chromatografii ciekowej charakteryzuje się następującymi zaletami:

- pozwala na łatwe przeprowadzenie analiz jakościowych i ilościowych,
- kolumny HPLC mogą być stosowane wielokrotnie bez konieczności regeneracji, rozdział próbki na tych kolumnach jest lepszy od uzyskiwanych tradycyjnymi metodami,
- uzyskane wyniki charakteryzują się bardzo dobrą odtwarzalnością,
- czas analizy jest relatywnie krótki,
- pomiar może być całkowicie zautomatyzowany.
- technikę rozdziału HPLC łatwo jest połączyć z wieloma rodzajami detekcji [267].

Oznaczanie składu mieszaniny substancji, z reguły wiąże się z koniecznością rozdzielenia na poszczególne składniki lub grupy substancji. Możliwe jest wtedy ustalenie zawartości analitu w badanej próbce, czyli dokonanie oznaczenia - analizy ilościowej. Wyznaczenie zależności pomiędzy wartością sygnału detektora, a stężeniem/ masą składnika przepływającego przez naczynko pomiarowe detektora, pozwala na wykonanie kalibracji.

W praktyce używa się czterech zasad oznaczania ilościowego (tab.8) [267]:

- metoda krzywej kalibracyjnej (tzw. „metoda wzorca zewnętrznego”),
- metoda wzorca wewnętrznego,
- metoda normalizacji (najczęściej metoda normalizacji ze współczynnikami korekcyjnymi),
- metoda dodatku wzorca.

Tab. 8. Metody oznaczania ilościowego w HPLC [267].

Metoda	Opis
krzywej kalibracyjnej	• stosując tę metodę nie oznacza się rzeczywistego stężenia, a zawartość względną. Uzyskiwany wynik odzwierciedla „umowną zawartość” substancji w badanym materiale. Zaletą tej metody jest porównywalność otrzymanych wyników oraz prosty sposób postępowania kalibracyjnego. Metoda jest łatwa do odtworzenia w innym laboratorium.
wzorca wewnętrznego	• trudność stanowi znalezienie analitu, który wykazuje podobne właściwości do badanych substancji oraz jednocześnie rozdziela się od pozostałych składników badanej mieszaniny w stosowanych warunkach chromatograficznych. • wzorzec wewnętrzny powinien charakteryzować się znaną chemiczną strukturą, wysoką czystością, • zastosowanie tej metody kompensuje błędy związane z utratą analitów podczas jej przechowywania na etapie przygotowywania próbki lub niepowtarzalnego dozowania szczególnie bardzo małych ilości, • techniki rozcieńczania izotopowego, które często są stosowane w technice MS, są odmianą metody standardu wewnętrznego. W rozcieńczeniu izotopowym wzorzec wewnętrzny jest tą samą substancją lecz zbudowaną z izotopu takiego jak deuter, tryt lub radioizotopy. W przypadku wykorzystywania radioizotopów stosuje się detektor radiometryczny- najczulszy ze wszystkich istniejących umożliwiający oznaczenie nawet 50 cząsteczek.
normalizacji	• stosując tą metodę nie oznacza się rzeczywistego stężenia grupy, lecz stężenie orientacyjne, w przypadku stosowania tzw. „normalizacji prostej” dla wszystkich detektorów oprócz FID- LC w przypadku węglowodorów i detektora CORONA- dla wszystkich analitów. • grupy oznaczanych substancji muszą się charakteryzować zbliżonymi wartościami współczynnika odpowiedzi, w przeciwnym razie trzeba zastosować normalizację ze współczynnikami korekcyjnymi. Konieczna jest wówczas znajomość tzw. współczynnika odpowiedzi.
dotatku wzorca	• metodę wykorzystuje się, gdy oznaczeniu poddaje się wieloskładnikowe próbki różniące się składem matrycy, która jest dodatkowo złożona lub nieznana. • warunkiem koniecznym, umożliwiającym stosowanie tej metody jest wprost proporcjonalna zależność rejestrowanego sygnału od stężenia oraz zerowy sygnał ślepej próby. • na podstawie uzyskanych chromatogramów wykreśla się zależność przyrostu powierzchni lub wysokości pików od ilości analitu dodanego do próbki (składnika oznaczanego).

Badania oznaczenia zawartości karotenoidów w formulacjach kosmetycznych przeprowadzono na podstawie norm europejskich PN- EN 12823-2 (Artykuły żywnościowe. Oznaczanie zawartości witaminy A metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej) oraz normy PN-90 A-75101/12 (Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczanie zawartości sumy karotenoidów i β -karotenu). Przeprowadzenie pierwszej syntezy karotenoidów spowodowało opracowanie metod oznaczenia ilości tych związków w produktach spożywczych. Stosuje się różne techniki oznaczenia karotenoidów: cienkowarstwową chromatografię cieczową (TLC), spektrofotometrię UV-Vis oraz wykorzystywaną w niniejszej pracy doktorskiej wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC). Oznaczenia karotenoidów za pomocą wyżej wymienionej metody zostało wprowadzone w roku 1971 przez Stewarta i Wheatona. Badali oni ilość karotenoidów w ekstrakcie z owoców cytrusowych.

Do oznaczenia karotenoidów stosuje się wiele różnych metod. Najbardziej popularne zostały przedstawione w tabeli 9.

Tab. 9. Metody oznaczenia karotenoidów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Typ próbki	Analizowany karotenoid	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Detekcja - długość fali	Literatura
warzywa zielone	β -karoten	ODS-Hypersil, 3 μ m	metanol/ acetonitryl/chloroform/woda (200:250:90:11)	450 nm	[268]
groszek, marchewka, słodki ziemniak, jarmuż, szpinak, dynia, morela, brzoskwinia	9-cis, 13-cis, oraz all-trans- β -karoten	Vydac 201 TP, 5 μ m	methanol/ chloroform (94:6)	475 nm	[269]
marchewka, ziemniak, borówka	α -karoten, β -karoten	Partisil 5 ODS	acetonitryl/ tetrahydrofuran/ woda (85:12,5:2,5)	470 nm	[270]
margaryna	karoteny, witamina A	LiChrosorb Si-60, 5 μ m	heksan/ eter naftowy (92:8)	453 nm	[271]
sok pomarańczowy	α -karoten, β -karoten, zeaksantyna	Vydac 201 TP, 5 μ m	metanol/ chloroform (90:10)	475 nm	[272]
warzywa i owoce	kantaksantyna, α -karoten, β -karoten, likopen	Vydac 201 TP, 5 μ m	metanol/acetonitryl/ tetrahydrofuran (52:40:8)	470 nm	[273]
papryka	zeaksantyna, β -karoten, β -kryptoksantyna	Zorbax ODS, 5 μ m	A= aceton/ woda (75:25) B= aceton/ metanol (75:25)	460 nm	[274,275]

2.17. Badanie kinetyki uwalniania z formulacji kosmetycznych

Badanie kinetyki uwalniania stanowi nowoczesną metodę, określającą dostępność składników czynnych zawartych w produktach kosmetycznych. Metoda ta przyczynia się do oceny jakościowej końcowego preparatu. Znalazła ona swoje zastosowanie na kilku etapach produkcji: w stadium początkowym opracowania formulacji kosmetycznych oraz w końcowych etapach mających za zadanie potwierdzenie powtarzalności procesu produkcyjnego dla każdej serii produktu kosmetycznego [276]. Doświadczenie to ocenia zdolność dyfuzji substancji aktywnej z bazy kosmetycznej przez membranę do odpowiedniego roztworu. Na badanie dostępności substancji czynnej wpływają następujące czynniki: właściwy dobór membrany dializacyjnej, która imituje barierę skórną, płynu akceptorowego oraz temperatury procesu. Zastosowane membrany powinny charakteryzować się dużą porowatością, minimalną grubością oraz obojętnością w stosunku do płynu akceptorowego, jak i bazy emulsji. Cechy te ułatwiają dyfuzję substancji czynnej [276]. Membrany są odpowiedzialne za utrzymanie badanego preparatu w stałym miejscu. Zapobiegają również zmianie powierzchni uwalniania oraz chronią przed przedostaniem się cząsteczek substancji pomocniczych do płynu akceptorowego. W doświadczeniu polegającym na uwalnianiu substancji aktywnej stosuje się płyny akceptorowe (medium) o właściwościach zbliżonych do warunków fizjologicznych skóry. Substancja, którą chcemy zbadać musi być rozpuszczalna w medium. Istotnym parametrem, wpływającym na wyniki badania jest pH płynu akceptorowego [276,277]. Najodpowiedniejsze pH roztworu zbliżone jest do pH skóry człowieka (zakres pH 5-6). W przypadku gdy substancja aktywna jest rozpuszczalna w wodzie używa się najczęściej bufor fosforanowy jako płyn akceptorowy, natomiast gdy substancja czynna nie jest rozpuszczalna w wodzie stosuje się roztwór wodno - alkoholowy.

Badanie dostępności substancji aktywnej z formulacji kosmetycznych przeprowadzany jest najczęściej w temperaturze 25, 32 lub 37°C. Czas analizy zależy od rozpuszczalności badanej substancji czynnej [278,279]. W celu uzyskania poprawnych wyników uwalniania zalecane jest wykonanie sześciu niezależnych pomiarów.

W tabeli 10 przedstawiono przykładowe substancje aktywne stosowane w przemyśle kosmetycznym dla których wyznaczono kinetykę uwalniania.

Tab. 10. Przykładowe substancje aktywne stosowane w przemyśle kosmetycznym dla których wyznaczono kinetykę uwalniania.

Nazwa substancji aktywnej	Stosowany aparat	Literatura
Diklofenak sodu (działanie przeciwbólowe)	Aparat łopatkowy FPVI- Varian 7025	[280]
Heparyna (działanie przeciwzakrzepowe)	Aparat łopatkowy VK- 7010	[281]
Izotretynoina (działanie przeciwtrądzikowe)	Aparat łopatkowy VK- 7010	[281]
Octan hydrokortyzonu (działanie przeciwzapalne)	Komora Franza	[282]
Polifenole (działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne)	Komora Franza	[283]
Rutyna (działanie pielęgnacyjne)	Komora Franza	[284]
(d) - alfa -tokoferol - witamina E (hamuje procesy starzenia się skóry, związane z niszczącym działaniem aktywnych form tlenu)	Komora Franza	[285]
Octan retinyłu - prowitamina A (działanie stymulujące, zmniejsza zmiany pojawiające się wraz z procesem starzenia, jest ona niezbędna do prawidłowego formowania się i regulowania wzrostu komórek skóry)	Komora Franza	[285]
Kwas askorbinowy - witamina C (przeciwdziała procesom starzenia się skóry)	Komora Franza	[285]
Pirydoksyna - witamina B6 (przyspiesza procesy gojenia się skóry)	Komora Franza	[285]
Kwas retinowy (działanie złuszczące, przeciwdziała procesom starzenia się skóry)	Komora Franza	[286]
Nikotynamid (działanie przeciwbakteryjne)	Komora Franza	[287]
Olej palmowy (działanie uspokajające, odżywiające skórę)	Komora Franza	[288]
Kapsaicyna (przeciwdziałanie rozwojowi nowotworowi prostaty)	Komora Franza	[289]
Oktylo Metoksycynamonian (OMC) (ochrona przed niekorzystnymi skótkami promieniowania UV)	Komora Franza	[290, 291]
Kwas salicylowy (właściwości złuszczące, przeciwbakteryjne)	Komora Franza	[290]
Cyklodekstryna (pochłanianie nieprzyjemne zapachy)	Komora Franza	[292]
Ekstrakt z tymianku	Metoda membranowa przy użyciu aparatu wg Mutimera	[293]
Arbutyna (działanie rozjaśniające)	Aparat do badania uwalniania 600 HH, Erweka	[294]

III. CEL PRACY

Analiza danych źródłowych z piśmiennictwa wykazała, że karotenoidy znajdują coraz szersze zastosowanie w walce o zdrowy oraz młodszy wygląd naszej skóry [123]. Duże zainteresowanie naturalnymi preparatami kosmetycznymi, przeznaczonymi do pielęgnacji skóry stwarza potrzebę ciągłego doskonalenia i opracowywania nowych receptur kosmetycznych. Dlatego też w ramach niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę opracowania i przetestowania oryginalnego produktu kosmetycznego, przeznaczonego do pielęgnacji skóry, zawierającego w swoim składzie karotenoidy. Przeprowadzone badania miały na celu ocenę przydatności karotenoidów - prekursorów witaminy A, w pielęgnacji skóry oraz określenie ich właściwości fizykochemicznych.

W celu realizacji powyższych założeń zaplanowano następujące zadania:

- opracowanie metodyki oznaczania karotenoidów w preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC),
- oznaczanie zdolności antyoksydacyjnej produktów kosmetycznych zawierających karotenoidy,
- analizę jakościową karotenoidów zawartych w komercyjnych kremach za pomocą spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-IR),
- długoterminowe badania stabilności emulsji kosmetycznych przygotowanych różnymi metodami,
- testy *in vivo* (badania aplikacje na probantach) z wykorzystaniem przygotowanych emulsji kosmetycznych zawierających β -karoten. Pomiary nawilżenia, elastyczności skóry, przeskórkowej utraty wody (TEWL), zawartości tłuszczu na skórze odpowiednio wyselekcjonowanych ochotników oraz określenie wpływu rodzaju formułacji na biodostępność wybranych karotenoidów za pomocą specjalnego paska („tape stripping”),
- badanie zdolności wygaszania wolnego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu przez samodzielnie przygotowane emulsje kosmetyczne typu O/W, W/O oraz O/W na zimno oraz komercyjne zawierające karotenoidy,
- testy *in vitro* (badanie kinetyki uwalniania) preparatów kosmetycznych zawierających β -karoten, likopen, astaksantynę.

Przesłanką do zrealizowania powyższych zadań był zamiar otrzymania preparatów kosmetycznych o antyoksydacyjnym spektrum działania, wpływających na poprawę nawilżenia i innych parametrów skóry. Integralną część pracy doktorskiej stanowiło zaproponowanie procedury umożliwiającej określenie biodostępności karotenoidów z wykorzystaniem metody zdzierania („strippingu”) oraz kinetyki uwalniania substancji aktywnej z formułacji kosmetycznych z wykorzystaniem komory dyfuzyjnej.

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

4.1. Materiały wykorzystane w badaniach

W ramach niniejszej pracy doktorskiej prowadzono badania z zastosowaniem preparatów kosmetycznych zawierających karotenoidy.

4.1.1. Formułacje komercyjne

Materiały stosowane do badań stanowiły kosmetyki komercyjne (tab. 11-13) zawierające następujące karotenoidy: β -karoten, likopen oraz astaksantynę.

Tab. 11. Spis komercyjnych formułacji zawierających β -karoten.

Nazwa kosmetyku	Rodzaj i funkcje
AA ECO Carrot	krem antyoksydacyjny
Ava Laboratorium, krem karotenowy	krem przeciwzmarszczkowy
Bielenda Karoten Przeciwzmarszczkowy	krem do twarzy na dzień/noc
Bielenda Karoten	masło do ciała
Cerkobalm	balsam z β -karotenem do pielęgnacji skóry suchej
Cashmere Care Express Illuminator	krem liftingujący, rozświetlający, usuwający oznaki zmęczenia i stresu
Dax Men	krem dla mężczyzn, energizujący, przeciw oznakom zmęczenia
Sylveco, krem brzożowo-rokitnikowy z betuliną	krem do pielęgnacji skóry wrażliwej atopowej oraz przesuszonej
Sylveco, lekki krem rokitnikowy	krem przeciwstarzeniowy, odżywczy, rewitalizujący oraz przywracający blask
Tołpa Planet of Nature	odmładzający krem przeciwzmarszczkowy 45+
Ziaja, Sopot Rozświetlanie	krem opalizujący

Tab. 12. Spis komercyjnych formułacji zawierających likopen.

Nazwa kosmetyku	Rodzaj i funkcje
AA ECO Pomidor	krem wzmacniający
Eveline, Koenzymy Młodości Q10 plus R	przeciwzmarszczkowy krem pod oczy
Mincer Pharma, Eco Innovation	przeciwstarzeniowy krem na dzień i na noc

Tab. 13. Spis komercyjnych formułacji zawierających astaksantynę.

Nazwa kosmetyku	Rodzaj i funkcje
Oriflame, Time Reversing Intense Deep Night Reformer	krem przeciwzmarszczkowy na noc
Oriflame, Time Reversing Intense Every Day Perfector	krem przeciwzmarszczkowy na dzień
Oriflame, Time Reversing Intense Eye Illuminator	krem rozświetlający pod oczy

4.1.2. Samodzielnie przygotowane emulsje kosmetyczne

Do badań użyto również samodzielnie przygotowane emulsje kosmetyczne typu: O/W, W/O oraz O/W na zimno.

4.1.3. Wykaz odczynników chemicznych stosowanych w pracy

W niniejszej pracy do prowadzenia badań zastosowano odczynniki chemiczne zebrane w tabeli 14.

Tab. 14. Spis odczynników chemicznych stosowanych do badań.

Nazwa wraz z czystością	Nazwa chemiczna (wg IUPAC)	Nazwa wg INCI	Firma
aceton, 99,5%, cz.d.a.	propanon	acetone	POCH
acetonitryl, 99,9%, cz.do HPLC	acetonitryl	acetonitrile	J.T. Baker
alkohol cetylowy, cz.d.a.	1-heksadekanol	cetyl alkohol	Sigma-Aldrich
alkohol etylowy, 96,0%, cz.d.a.	etanol	ethanol	POCH
alkohol metylowy, cz.d.a.	metanol	methanol	POCH
alkohol metylowy, 99,8%, cz. do HPLC	metanol	methanol	J.T. Baker
alphaflow 20 (uwodorniony polidecen)	uwodorniony polidecen	alphaflow 20	CréationsCouleurs
astaksantyna, < 98,0%, cz.	6-hydroksy-3-[(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-18-[4-hydroksy-2,6,6-trimetylo-3-okso-1-cykloheksenylo]-3,7,12,16-tetrametyloktadeka-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenylo]-2,4,4-trimetylo-1-cykloheks-2-enon	astaxanthin	TriMen
astaksantyna, < 94,0%, cz.	6-hydroksy-3-[(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-18-[4-hydroksy-2,6,6-trimetylo-3-okso-1-cykloheksenylo]-3,7,12,16-tetrametyloktadeka-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenylo]-2,4,4-trimetylo-1-cykloheks-2-enon	astaxanthin	TriMen
β-karoten, < 97,0%, cz.	1,3,3-trimetylo-2-[3,7,12,16-tetrametylo-18-(2,6,6-trimetylocykloheks-1-en-1-yl)oktadeka-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaen-1-yl]cykloheks-1-ene	β-carotene	TriMen
β-karoten < 97,0%, cz.	1,3,3-trimetylo-2-[3,7,12,16-tetrametylo-18-(2,6,6-trimetylocykloheks-1-en-1-yl)oktadeka-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaen-	β- carotene	Sigma Aldrich

	1-yl]cykloheks-1-ene		
creagel EZ7 (poliakrylamid, uwodorniony polideken, eter laurylowypolioksyetyleny)	poliakrylamid, uwodorniony polideken, eter laurylowypolioksyetyleny	Creagel EZ7	Créations Couleurs
czerwień Kongo	sól disodowa kwasu 4-amino-3-[4-[4-(1-amino-4-sulfonatonaftalen-2-ylo)diazenylofenylo]fenylo] diazenylonafthaleno-1-sulfonowego	direct red 28	Sigma Aldrich
dichlorometan, cz. do HPLC	dichlorometan	dichloromethane	J.T. Baker
diwodorofosforan potasu, cz.d.a.	diwodorofosforan potasu	potassium dihydrogen phosphate	Chem-Lab NV
dpph(1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl), cz.d.a.	1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl	dpph	Sigma Aldrich,
kwas askorbinowy, cz.	(<i>r</i>)-3,4-dihydroksy-5-((<i>s</i>)-1,2-dihydroksyetylo)furan-2(5 <i>h</i>)-on	ascorbic acid	Sigma Aldrich
kwas ortofosforowy, cz.	trihydroksydooksydofosfor	phosphoric acid	J.T. Baker
Lanolina	lanolina	lanolin	FlukaAnalytical
likopen, < 85,0%, cz.	(6 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,12 <i>E</i> ,14 <i>E</i> ,16 <i>E</i> ,18 <i>E</i> ,20 <i>E</i> ,22 <i>E</i> ,24 <i>E</i> ,26 <i>E</i>)-2,6,10,14,19,23,27,31-oktametylodotriakonta-2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tridekaen	lycopene	Sigma Aldrich
likopen < 75,0%, cz.	(6 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i> ,12 <i>E</i> ,14 <i>E</i> ,16 <i>E</i> ,18 <i>E</i> ,20 <i>E</i> ,22 <i>E</i> ,24 <i>E</i> ,26 <i>E</i>)-2,6,10,14,19,23,27,31-oktametylodotriakonta-2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tridekaen	lycopene	TriMen
monostearnian glicerolu, cz.	oktadekanyan 2,3-dihydroksypropylu	glycerol monostearate	Sigma-Aldrich
n-heksan, 99,0%, cz.d.a.	n-heksan	n-hexane	POCH
octan etylu, 99,9%, cz. do HPLC	etanian etylu	ethylacetate	Sigma- Aldrich CHROMASOLV
olej słonecznikowy	olej	sunflower oil	-
woda destylowana			-
woda, gradient grade do HPLC	tlenek diwodoru	water	J.T. Baker,
wodorotlenek potasu, cz.	wodorotlenek potasu	potassium hydroxide	P.P.H. Stanlab
Wodorotlenek sodu, 98,8%, cz.d.a.	wodorotlenek sodu	sodium hydroxide	POCH
wosk pszczeli, Ph.cz.	wosk pszczeli	beeswax	Fluka Analytical

V. Metodyka

5.1. Preparatyka kremów

5.1.1. Przygotowanie kremów typu O/W

W zlewce o pojemności 25 ml przygotowano fazę tłuszczową przez odważenie 6,499 g oleju słonecznikowego, 2,997 g alkoholu cetylowego oraz 2,003 g monostearynianu glicerolu (tab.15). W drugiej zlewce o pojemności 50 ml odważono 40,000 g wody destylowanej. Fazę tłuszczową ogrzano na łaźni wodnej w temperaturze 70°C do momentu stopienia wszystkich składników. Fazę wodną ogrzano na łaźni wodnej do osiągnięcia przez nią temperatury około 70°C, a następnie przeniesiono ją na mieszadło magnetyczne. Cały czas intensywnie mieszając dodano do niej, małymi porcjami, fazę tłuszczową. Pozostawiono na mieszadle do ostygnięcia. Następnie dodano odpowiedni karotenoid i mieszano jeszcze przez 5 min. Otrzymano krem o lekkiej konsystencji (rys. 24).

Tab. 15. Składniki kremów typu O/W.

Skład	Zawartość[%±0,001]
Olej słonecznikowy	12,620
Monostearynian glicerolu	3,890
Alkohol cetylowy	5,820
Woda destylowana	77,664
Karotenoidy: β-karoten Likopen Astaksantyna	0,006



Rys. 24. Krem typu O/W.

5.1.2. Przygotowanie kremów typu W/O

Składniki tłuszczowe: lanolinę, olej słonecznikowy, воск pszczeli oraz alkohol cetylowy ogrzano do temperatury 70°C (tab. 16). Jednocześnie ogrzano wodę destylowaną do uzyskania tej samej temperatury, co dla składników fazy tłuszczowej. Po całkowitym rozpuszczeniu składników fazy tłuszczowej, dodano do nich wodę, układ cały czas mieszano intensywnie na mieszadle magnetycznym. Następnie dodano odpowiedni karotenoid i mieszano jeszcze przez 5 min. Otrzymano krem jak na rys.25.

Tab. 16. Składniki kremów typu W/O.

Skład	Zawartość[%±0,001]
Lanolina	10,210
Olej słonecznikowy	39,900
Wosk pszczeli	4,990
Alkohol cetylowy	4,990
Woda destylowana	39,904
Karotenoidy: β-karoten Likopen Astaksantyna	0,006



Rys. 25. Krem typu W/O.

5.1.3. Przygotowanie kremów typu O/W na zimno

W pierwszej zlewce o pojemności 50 ml odważono 5,000 g Creagel oraz 8,500 g Alphaflow (tab. 17). W drugiej zlewce o pojemności 50 ml odważono 36,5497 g wody destylowanej. Zawartość pierwszej zlewki, w temperaturze pokojowej, dokładnie wymieszano na mieszadle magnetycznym. Cały czas mieszając, małymi porcjami, dodano wodę destylowaną. Następnie dodano odpowiedni karotenoid i mieszano jeszcze przez 5 min. Otrzymano gęsty krem o białej barwie (rys. 26).

Tab. 17. Składniki kremów typu O/W na zimno.

Skład	Zawartość[%±0,001]
Creagel EZ7 - uwodorniony polideken, eter Laurylowypolioksyetylen	10,000
Alphaflow 20 - uwodorniony polidecen	17,000
Woda destylowana	72,994
Karotenoidy: β-karoten Likopen Astaksantyna	0,006



Rys. 26. Krem typu O/W na zimno.

5.2. Ocena właściwości fizykochemicznych kremów zawierających karotenoidy

5.2.1. Pomiar lepkości

Otrzymane emulsje kosmetyczne zbadano pod względem ich lepkości. Lepkość emulsji kosmetycznych jest istotnym parametrem fizykochemicznym, to od niej zależy smarowność emulsji oraz uwalnianie z niej substancji czynnych. Lepkość zdefiniować można jako właściwość substancji płynnych oraz plastycznych ciał stałych, którą charakteryzuje opór wewnętrzny stawiany przez badane substancje, przeciw płynięciu. Pomiar lepkości dokonuje się za pomocą lepkościomierza [295]. Do badania kremów zawierających karotenoidy wykorzystano lepkościomierz rotacyjny z nastawianym momentem ścinającym (rys. 27). Urządzenie to mierzy opór lepkościowy na kręcącym się dysku, zanurzonym w badanym ośrodku.



Rys. 27. Lepkościomierz rotacyjny Rheotec.

Na skutek obrotów wrzeciona pomiarowego następuje ścinanie badanej próbki, której miarą lepkości jest prędkość obrotowa ustalająca się po przyłożeniu zadanego momentu obrotowego. Wrzeciono wyposażone w dysk stosowane jest do badania substancji o niewielkiej lepkości. Próbkę o dużej lepkości mierzy się za pomocą wrzeciona posiadającego walec.

Wiskozymetr rotacyjny RCO2 firmy Rheotec, który został użyty do badań, posiada 6 różnych wrzecion, które dobiera się odpowiednio do lepkości próbki. Umożliwia to prowadzenie pomiaru lepkości przy różnych prędkościach wrzecion w szerokim zakresie od 20 do 13000000 [mPa·s]. Opór stawiany ruchowi wrzeciona przez badaną próbkę zmienia się proporcjonalnie do wielkości wrzeciona i szybkości jego obracania się. Zależy on od lepkości badanej substancji. Wartość kąta odchylenia wrzeciona w odniesieniu do sprężyny daje wartość momentu obrotowego. Stosunek momentu obrotowego do prędkości wrzeciona nazywany jest lepkością istotną, wyrażoną w jednostce [mPa·s]. Wiskozymetry rotacyjne charakteryzują się dużą dokładnością pomiarów [295].

W celu zbadania lepkości wszystkich formułacji kosmetycznych, będących przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej, w wąskich zlewkach umieszczono przygotowane próbki. Pomiary wykonywano przy użyciu wszystkich wrzecion, rozpoczynając od najwolniejszych obrotów. Badania przeprowadzono od razu po sporządzeniu kremu oraz po upływie 100 dni. Przez okres trwania badania preparaty kosmetyczne przechowywane były w różnych warunkach:

- temperatura pokojowa z dostępem światła,
- temperatura pokojowa bez dostępu światła,
- temperatura 4°C,
- temperatura 45°C.

5.2.2. Badanie wartości pH

Zbadano również wartość pH przygotowanych wcześniej emulsji zawierających karotenoidy oraz emulsji komercyjnych. Badania przeprowadzono od razu po sporządzeniu

kremu oraz po upływie 100 dni. Przez ten czas preparaty przechowywane były w warunkach opisanych w paragrafie 6.2.1. Oznaczenie wykonano według normy BN-77/6140-01/07 [296].

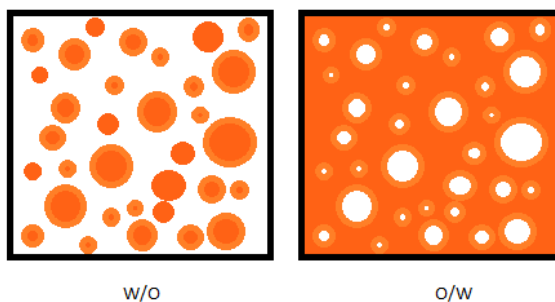
Do zlewki o pojemności 100 ml odważono 5g wcześniej przygotowanych kremów. Do pomiaru zastosowano pehametr firmy Shott (rys. 28) wyposażony w elektrodę kombinowaną.



Rys. 28. Pehametr firmy Shott.

5.2.3. Określenie typu emulsji metodą mikroskopową

Typ otrzymanych formułacji kosmetycznych określono przy użyciu mikroskopu. Metoda polega na dodaniu do badanej emulsji barwnika, a następnie jej obserwacji pod mikroskopem. Wybarwieniu ulega faza, która rozpuszcza dany barwnik (rys. 29). Do wybarwienia fazy wodnej stosuje się barwnik o charakterze hydrofilowym, np. oranż metylowy lub czerwień Kongo natomiast fazę tłuszczową wybarwia się barwnikiem Sudan IV o charakterze liofilowym.



Rys. 29. Obraz mikroskopowy emulsji zabarwionej rozpuszczalnym w wodzie barwnikiem.



Rys. 30. Mikroskop optyczny połączony z komputerem do określania rodzaju emulsji.

W celu przeprowadzenia pomiaru 1 gram emulsji dokładnie połączono z barwnikiem czerwień Kongo (sól disodowa kwasu 4-amino-3-[4-[4-(1-amino-4-sulfonatonaftalen-2-ylo)diazenylofenylo]fenylo]diazenylonafthaleno-1-sulfonowego), aż do uzyskania jednolitej konsystencji. Do ucierania mieszaniny wykorzystano moździerz. Tak przygotowaną mieszaninę nałożono w postaci cienkiej warstwy na szkiełko podstawowe i przykryto szkiełkiem nakrywkowym, a następnie określano typ emulsji za pomocą mikroskopu optycznego Novex Holland (rys. 30).

5.2.4. Określenie współczynnika refrakcji otrzymanych emulsji kosmetycznych

Wyznaczono współczynnik refrakcji światła przygotowanych emulsji. Wielkość ta opisuje załamanie światła przy jego przejściu z jednego ośrodka do drugiego. Liczbowo współczynnik załamania światła (n) wyrażany jest jako stosunek prędkości światła w jednym ośrodku (v_1) do prędkości w drugim ośrodku (v_2):

$$n = v_1 / v_2$$

Współczynnik refrakcji jest wielkością charakterystyczną dla danej substancji i jest pomocny w jej identyfikacji. Jego wartość liczbową zależy od takich parametrów, jak gęstość, stężenie, temperatura substancji badanej i otoczenia, a także od długości fali światła widzialnego przechodzącego przez badany ośrodek [297].

Pomiaru współczynnika refrakcji dokonano za pomocą refraktometru przenośnego firmy Mettler Toledo (rys. 31). Badanie wykonuje się poprzez naniesienie na okienko pomiarowe niewielką ilość badanej formułacji kosmetycznej. Następnie dokonuje się odczytu.



Rys.31. Refraktometr 30PX firmy Mettler Toledo.

5.3. Oznaczanie zawartości karotenoidów w preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

5.3.1. Oznaczanie β -karotenu

W badaniach oznaczania zawartości β -karotenu w komercyjnych kremach z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej użyto norm opisujących oznaczanie karotenoidów w produktach spożywczych: PN-EN 12823-2 (Artykuły żywnościowe. Oznaczanie zawartości witaminy A metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej) oraz PN-90 A-75101/12 (Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych). Do oznaczania zawartość β -karotenu w preparatach kosmetycznych odpowiednio zmodyfikowano ww. metody [298-301]. Do ilościowego oznaczenia zawartości β -karotenu w ogólnodostępnych kremach kosmetycznych wykorzystano chromatograf cieczowy Varian 920-LC. W tabeli 18 przedstawiono warunki oznaczania zawartości β -karotenu w kremach komercyjnych.

Tab. 18. Warunki oznaczania zawartości β -karotenu w komercyjnych kremach za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

WARUNKI PROWADZENIA POMIARU			
Kolumna chromatograficzna	Zorbax SB- C18 (250x4,6mm; 5,0 μ m)		
Faza ruchoma	A: metanol: woda (80:20 v/v) B: octan etylu		
Prędkość przepływu fazy ruchomej	1ml/min		
Długość fali detektora UV-Vis, przy której prowadzono detekcję	$\lambda = 450$ nm		
Objętość dozowanych próbek	10 μ l		
Elucja gradientowa	Czas [min]	A [%]	B [%]
	0,0	80,0	20,0
	2,5	77,5	22,5
	20,0	50,0	50,0
	24,0	20,0	80,0
	31,0	0,0	100,0
Czas analizy	31 min		

Przygotowanie próbki do badań polegało na przeprowadzeniu: homogenizacji kremu, zmydłaniu pod chłodnicą zwrotną, do przeprowadzenia którego użyto 1g kwasu askorbinowego, 30 ml alkoholowego roztworu wodorotlenku potasu, a w ostatnim etapie ekstrakcji za pomocą 10ml n-heksanu. Roztwór wzorcowy przygotowano przez odważenie 5 mg β -karotenu i rozpuszczenie go w 5 ml kolbce z fazą ruchomą. Następnie wykonano serię rozcieńczeń: 2,4,8,10 i 16 μ g/ml. Kolbkę umieszczono w łaźni ultradźwiękowej w celu dokładnego rozpuszczenia β -karotenu. W pierwszym etapie badań wyznaczono krzywą kalibracyjną dla β -karotenu, na podstawie której oznaczano zawartość tej substancji aktywnej w formulacjach kosmetycznych. Identyfikacji zawartości karotenoidów w próbkach rzeczywistych dokonano na podstawie porównania czasów retencji z czasami retencji wzorców.

Na podstawie powierzchni pików β -karotenu otrzymanych na chromatogramach obliczono stężenie masowe β -karotenu w preparatach kosmetycznych.

Podczas obliczeń korzystano ze wzoru:

$$C = \frac{A_x \cdot C_s \cdot V}{A_s \cdot P}$$

gdzie:

A_x - powierzchnia pików uzyskana dla roztworu próbki do badań w jednostkach powierzchni [mAU·min]

C_s - stężenie roztworu wzorcowego o znanej czystości [μ g/ml]

V - całkowita objętość roztworu próbki do badań [ml]

A_s - powierzchnia pików uzyskana dla roztworu wzorca w jednostkach powierzchni [mAU·min]

P - masa próbki [g]

5.3.2. Oznaczanie likopenu

W badaniach oznaczania kremów komercyjnych zawierających likopen z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej użyto wymienionych w rozdziale 6.3.1 norm, metodyki oraz aparatury. Szczegółowe warunki pomiarów przedstawiono w tabeli 19.

Tab. 19. Warunki oznaczania zawartości likopenu w kremach komercyjnych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

WARUNKI PROWADZENIA POMIARU	
Kolumna chromatograficzna	Zorbax SB- C18 (250x4,6mm; 5,0 μ m)
Faza ruchoma	A: acetonitryl: dichlorometan: metanol (70:20:10 v/v)
Prędkość przepływu fazy ruchomej	1ml/min
Długość fali detektora UV-Vis, przy której prowadzono detekcję	$\lambda = 472$ nm
Objętość dozowanych próbek	10 μ l
Czas analizy	10 min

Przygotowanie próbki do badań zostało przedstawione w podrozdziale 4.3.1. Roztwór wzorcowy przygotowano poprzez odważenie 5 mg likopenu, rozpuszczeniu go w 5 ml fazy ruchomej. Następnie wykonano serię rozcieńczeń: 2,4,8,10 i 16 μ g/ml. Kolbkę umieszczono na łaźni ultradźwiękowej w celu dokładnego rozpuszczenia likopenu.

Obliczeń dokonano na podstawie wzoru przedstawionego w podrozdziale 5.3.1.

5.3.3. Oznaczanie stabilności β -karotenu oraz likopenu zawartych w samodzielnie przygotowanych formulacjach kosmetycznych

Do oznaczenia stabilności β -karotenu w samodzielnie przygotowanych emulsjach kosmetycznych typu O/W, W/O oraz O/W na zimno użyto opisanej w podrozdziałach 4.3.1 oraz 4.3.2 norm, metodyki, aparatury oraz warunków prowadzenia pomiarów. Sporządzone emulsje poddano badaniu zaraz po przygotowaniu, po jednym i dwóch tygodniach oraz po jednym, dwóch oraz po trzech miesiącach. Wyniki zmiany zawartości karotenoidów w czasie porównywano do odpowiednio przygotowanej próbki wyjściowej ze znaną zawartość β -karotenu oraz likopenu (6 mg/100 g). Identyfikacji oznaczanych karotenoidów w próbkach rzeczywistych dokonano na podstawie porównania ich czasów retencji z czasami retencji wzorców.

Obliczeń dokonano na podstawie wzoru opisanego w podrozdziale 5.3.1.

5.3.4. Oznaczanie astaksantyny

W niniejszej pracy doktorskiej nie oznaczono zawartości astaksantyny w komercyjnych preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Kosmetyki firmy Oriflame, Time Reversing Intense Deep Night Reformer, Time Reversing Intense Every Day Perfector oraz Time Reversing Intense Eye Illuminatorw skład, których wchodziła astaksantyna, zostały wycofane z rynku.

5.4. Analiza jakościowa karotenoidów zawartych w komercyjnych kremach metodą spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-IR)

Technika ATR-IR wykorzystuje zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia promieniowania w układzie pomiarowym składającym się z kryształu diamentowego oraz ułożonej na jego powierzchni próbki. Wiązka światła podczerwonego, wielokrotnie odbijającego się wewnątrz kryształu, penetruje na niewielką głębokość próbkę emulsji. Otrzymane widma odbiciowe dostarczają informacji o obecności oczekiwanych grup funkcyjnych w porównaniu z widmami wzorca [302].

Analizy kremów komercyjnych zawierających karotenoidy wykonano na podstawie badań Baranowskiego, Schutza oraz Schulza [303]. W celu przygotowania próbki odważono 1 g emulsji. Widma badanych preparatów wykonano zgodnie z instrukcją obsługi spektrofotometru Cary 630 FTIR firmy Agilent Technologies. Przed każdym pomiarem kryształ przystawki ATR-IR przemywano acetonem. Zakres liczb falowych promieniowania wynosił $4000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$. Rejestracji widm dokonywano z rozdzielczością 16 cm^{-1} .

5.5. Zdolność wygaszania wolnego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu przez komercyjne kremy zawierające karotenoidy

Aktywność antyoksydacyjną komercyjnych kremów oraz samodzielnie przygotowanych emulsji zawierających karotenoidy oznaczano według zmodyfikowanej metody Branda - Williamsa i współpracowników [304] zużyciem syntetycznego rodnika DPPH[•] (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu - rys. 32). Oznaczanie metodą DPPH[•] polega na redukcji obecnego w badanej próbce przeciwutleniacza. Redukcja przeprowadzana jest za pomocą stabilnego rodnika azotowego, co powoduje spadek absorpcji. Niesparowane elektrony zostają sparowane przez karotenoidy. Rodnik DPPH[•] w roztworach przybiera barwę purpurową, która ulega zmianie w wyniku jego reakcji z karotenoidami. Absorbancję roztworu mierzono przy długości fali $\lambda=517\text{ nm}$.

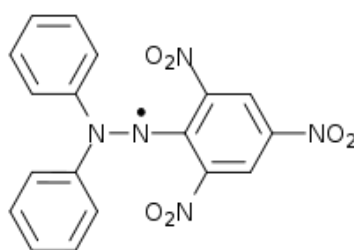
Alkoholowy roztwór DPPH[•] przygotowano rozpuszczając 2,8 mg rodnika DPPH[•] ($M=394,32\text{ g/mol}$) w 100 ml metanolu, następnie odczytano jego absorbcję (próba kontrolna). Roztwór przechowywano w pomieszczeniu bez dostępu światła. Wykonano 16 prób różnych komercyjnych kremów zawierających karotenoidy. Przygotowanie prób zawierających przeciwutleniacze - 1 gram kremu poddano ekstrakcji metanolem w rozdzielaczu, następnie gwałtownie mieszano przez około 5 minut. Następnie ekstrakt

przesączało za pomocą lejka Büchnera i przechowywano w ciemnym miejscu. Do 3ml roztworu DPPH, dodano 2 ml wcześniej przygotowanego ekstraktu. Całość podgrzewano w łaźni wodnej o temperaturze 37°C przez 30 minut. Następnie mierzono od zainicjowania reakcji przez 30 minut absorbancję przy pomocy spektrofotometru UV-Vis.

Wyniki przedstawione zostały za pomocą procentu wygaszania wolnych rodników obliczonego według wzoru:

$$\% \text{ Inhibicji} = 100 (A_0 - A_1) / A_0$$

gdzie: A_0 - absorbancja roztworu rodnika DPPH[•] po 30 minutach bez dodatku karotenoidu, A_1 - absorbancja roztworu rodnika DPPH[•] po 30 minutach w obecności karotenoidu [304].

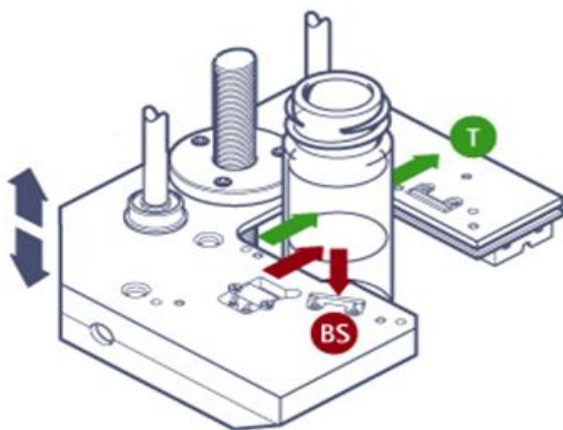


Rys. 32. Wzór strukturalny rodnika DPPH[•] (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu).

5.6. Pomiar stabilności emulsji kosmetycznych zawierających karotenoidy metodą wielokrotnego rozpraszania światła

Badanie stabilności przygotowanych emulsji kosmetycznych zostało przeprowadzone za pomocą urządzenia Turbiscan Lab Expert (Formulation).

Analizowaną formulację umieszczano w cylindrycznej celi pomiarowej. Źródłem światła w aparacie jest dioda elektroluminescencyjna, która emituje światło bliskiej podczerwieni o długości fali 880 nm. Aparat posiada również dwa zsynchronizowane sensory optyczne, które odbierają odpowiednio światło przechodzące przez próbkę (T, 180° od źródła padającego światła) oraz światło wstecznie rozproszone przez próbkę (BS, 45° od źródła padającego światła) - rys. 33. Zasada pomiaru przy pomocy tego urządzenia opiera się na zjawisku wielokrotnego rozproszenia światła. Wyemitowane przez diodę fotony ulegają wstecznemu rozproszeniu przez cząstki emulsji zanim zostaną zebrane na detektorze światła wstecznie odbitego. Intensywność światła wstecznie odbitego zależy od wielkości cząstek, objętości frakcji rozproszonej oraz od różnicy współczynnika załamania światła fazy ciągłej i rozproszonej.



Rys. 33. Schemat działania aparatu Turbiscan Lab Expert wraz z jego zdjęciem [305].

Za pomocą aparatu Turbiscan Lab Expert zbadano stabilność przygotowanych formułek kosmetycznych oraz stwierdzono jakie dokładnie zjawisko destabilizacji występuje w badanych kremach. Pomiar stabilności emulsji kosmetycznych zawierających β -karoten, likopen oraz astaksantynę przeprowadzano w temperaturze 25°C oraz 45°C od momentu sporządzenia preparatów w ciągu 100 dni. Analiza każdej próbki kremu trwała 30 minut z częstotliwością pomiaru co jedną minutę.

Głowica optyczna urządzenia Turbiscan skanuje całą wysokość próbki (do 55 mm), zbierając światło transmisyjne i wstecznie rozproszone, co 40 μ m. Otrzymane krzywe przedstawiają intensywność transmisji lub wstecznego rozproszenia światła (%) w funkcji wysokości celi pomiarowej (w mm). Pomiar transmisji stosuje się w przypadku analizy próbek przejrzystych i mętnych, a wstecznego rozproszenia do próbek nieprzejrzystych [305].

5.7. Badanie rozkładu wielkości cząstek emulsji kosmetycznych techniką dyfrakcji laserowej

Zbadano rozkład wielkości cząstek otrzymanych produktów kosmetycznych. Do badań tych wykorzystano analizator wielkości cząstek Mastersizer 2000 (Malvern). Pomiaru dokonano z użyciem zjawiska rozproszenia światła laserowego. Wiązka światła przechodząca przez celę pomiarową rozpraszana jest na cząstkach analizowanej próbki, a następnie kierowana w stronę odpowiedniego układu detektorów, które wychwytyują światło rozproszone pod różnymi kątami. Natężenie rozpraszania na cząstkach jest dodatkowo wzmacniane przez zastosowanie w układzie pomiarowym światła niebieskiego lasera He-Ne o długości fali 466 nm. Wynik analizy przedstawiony jest graficznie jako zależność natężenia światła rozproszonego docierającego do poszczególnych detektorów od ich numerów. Kontrola parametru rozkładu wielkości cząstek w jednostce czasu pozwala na identyfikację zjawisk destabilizacji emulsji. Krytycznym parametrem wpływającym na stabilność układów koloidalnych jest wielkość cząstek fazy wewnętrznej. Podstawą tej metody jest założenie, że rozproszenie światła, któremu ulegają fotony rozproszone przez cząstki dyspersji, zależą od wielkości tych cząstek. Dla cząstek mniejszych wzrost wielkości cząstek skutkuje wzrostem intensywności światła wstecznie odbitego czyli większą niestabilnością badanego układu.

Natomiast dla większych cząstek wzrost wielkości cząstek powoduje spadek intensywności światła wstecznie odbitego czyli układ charakteryzuje się mniejszą niestabilnością.

Mastersizer 2000 (rys. 34) zbudowany jest z przystawki półautomatycznej oraz złożonego układu pomiarowego. Przystawka służy do pomiarów wszystkich materiałów o dużej gęstości i/lub polidispersyjnym rozkładzie. Wbudowane w przystawkę mieszadło umożliwia dyspersję badanej substancji w szerokim zakresie wielkości cząstek. Zintegrowana z mieszadłem pompa ułatwia przepływ cieczy do układu pomiarowego. Sonda ultradźwiękowa (20 kHz) służy do rozbijania aglomeratów cząstek, co jest przydatne przy ocenie zmian stabilności i rozkładu wielkości cząstek emulsji w czasie [306]. Za pomocą użytego analizatora bada się dyspersje cieczowe. Zakres pomiarowy urządzenia mieści się w zakresie od 0,02 do 1000 μm a pomiar przeprowadzany jest w oparciu o zjawisko dyfrakcji laserowej z teorią rozpraszania Mie, przedstawiającą opis rozpraszania elastycznego pola elektromagnetycznego na jednorodnej kuli o dowolnym rozmiarze i właściwościach optycznych [307]. Pomiaru przygotowanych emulsji kosmetycznych dokonano od razu po sporządzeniu oraz po 100 dniach. Formułacje kosmetyczne przechowywane były w dwóch różnych temperaturach, w temperaturze pokojowej, której towarzyszył dostęp lub brak światła oraz w temperaturze 45°C.

Wyniki badania przedstawiono jako procenty $d(0,1)$, $d(0,5)$ i $d(0,9)$:

- $d(0,1)$ [μm] - 10% z rozkładu cząstek znajduje się poniżej tej wartości,
- $d(0,5)$ [μm] - mediana rozkładu cząstek,
- $d(0,9)$ [μm] - 90% z rozkładu cząstek znajduje się poniżej tej wartości.

Wyniki opisano również za pomocą średnich średnic $D(4,3)$ oraz $D(3,2)$:

- średnica $D(3,2)$ [μm] obliczana jest ze stosunku sumy objętości cząstek do sumy ich powierzchni, jest miarą powierzchni czynnej ziaren tworzących zawiesinę polidispersyjną.
- średnia średnica $D(4,3)$ [μm], która obliczana jest na podstawie momentu masy i objętości, informuje, gdzie w układzie zawiesiny skupiona jest masa cząstek.



Rys. 34. Analizator rozkładu wielkości cząstek Mastersizer 2000 firmy Malvern.

5.8. Badania *in vivo* przeprowadzone na probantach z wykorzystaniem samodzielnie przygotowanych emulsji kosmetycznych zawierających β -karoten

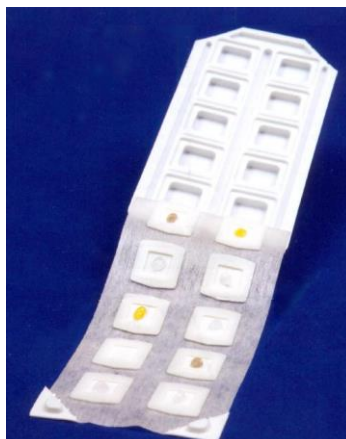
Badania przeprowadzono metodą *in vivo*, czyli przez użycie testów aplikacyjnych (naskórkowych) na skórze człowieka [308]. Tylko substancje aktywne i produkty, których składniki wcześniej nie zostały uznane za niebezpieczne z powodu właściwości żrących lub toksycznych mogą być badane z udziałem ludzi [309]. Praca badawcza, została rozpoczęta po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej (zał. 1). Badania *in vivo* przeprowadzone zostały u zdrowych ochotników (tzw. probantów), których dobrano pod względem wieku. Uczestnicy badania otrzymali wcześniej przygotowane kremy. Jeden z kremów zawierał substancję aktywną - β -karoten, drugi kosmetyk został przygotowany bez substancji aktywnej – placebo. Przed testem przeprowadzone było badanie dermatologiczne, podczas którego, stwierdzono brak skłonności alergicznych względem użytego β -karotenu. Zbierane były również informacje na temat przebytych lub aktualnych chorób skóry i ich sposobów leczenia, a także na temat ogólnego stanu zdrowia probanta. Przed przystąpieniem do badań każdy ochotnik podpisał formularz świadomej zgody na udział w testach (zał. 2,3). Probantom udzielono szczegółowych informacji na temat celu doświadczenia, sposobu jego przeprowadzania oraz ewentualnych skutków ubocznych. Każda osoba biorąca udział w badaniu otrzymała dokumenty, tj. pisemną instrukcję, jak należy stosować testowany kosmetyk (zał. 4,5) oraz ankietę, którą probanci wypełnili podczas stosowania preparatu (zał. 7). Dzięki ankiecie możemy poznać opinię przyszłych konsumentów na temat testowanego kosmetyku, co pozwala na ewentualne zmiany prowadzące do polepszenia walorów kosmetycznych. Badania trwały sześć tygodni. W doświadczeniu brało udział 28 osób. Probandci aplikowali badaną substancję na przedramię dwa razy dziennie, rano i wieczorem. W trakcie doświadczenia nie mogli stosować innych kosmetyków niż testowany [310].

5.8.1. Aplikacja TRUE testów

Do metod służących ocenie działania drażniącego danej substancji (ocena dermatologiczna) należą: testy płatkowe polegające na jednorazowej aplikacji badanej substancji pod okluzją (ang. *on-timeocclusive tests*). Do badań zastosowano TRUE test (ang. *Thin-layer Rapid Use Epicutaneous test*), który zawiera komory IQ Ultra firmy Chemotechnique Diagnostics. Jest on hipoalergicznym, wodoszczelnym plastrem, na którym znajduje się 12 komór testowych (rys. 35) [311-313]. Test przeprowadzono na skórze wszystkich 28-u probantów. Test został przyklejony na plecy probantów po wcześniejszym nałożeniu do pola pierwszego β -karotenu. Probandci naklejone testy nosili przez 48 godzin. Ochotnicy zostali poproszeni, aby podczas trwania badania nie moczyli pleców, unikali promieni słonecznych oraz aby nadmiernie się nie wysilali. Po 48 godzinach zdjęto plastry i sprawdzono czy nie wystąpiły odczyny alergiczne za pomocą płytki IQ Ultra Reading Plate.

Po upływie 96 godzin plecy probantów zostały ponownie skontrolowane. Przed przystąpieniem do badania probanci podpisali formularz świadomej zgody na udział w

badaniu testu płatkowego (zał.2,3) oraz zapoznano ich z informacjami dotyczącymi przebiegu testu (zał.4, 5). Test ten umożliwia wykrycie czy probant reaguje alergicznie na β -karoten.



Rys. 35. TRUE test.

5.8.2. Badania poziomu nawilżenia naskórka

Badania poziomu nawilżenia naskórka przeprowadzono na 28 probantach, pomiarowi zostały poddane prawe i lewe przedramiona probantów, czyli miejsca, gdzie został nakładany krem z β -karotenem oraz krem niezawierający substancji aktywnej. Badanie prowadzono za pomocą zespołu sond MPA 580 Courage + Khazaka electronic GmbH połączonego z komputerem i wyposażonym w sondę do mierzenia temperatury oraz wilgotności powietrza. Badania były powtarzane co tydzień przez 6 tygodni. Poziom nawilżenia badany był za pomocą korneometru, który mierzy zawartość wody w warstwie rogowej naskórka. Pomiar opiera się na przewodnictwie elektrycznym. Im większa zawartość wody w naskórku, tym mniejsza pojemnościowa oporność, co wskazuje na wyższy stopień nawilżenia skóry.

5.8.3. Pomiar przeznaskórkowej utraty wody

Pomiar przeznaskórkowej utraty wody przeprowadzono na skórze wszystkich probantów. Badania przeznaskórkowej utraty wody (TEWL - ang. *Transepidermal Water Loss*) wykonano za pomocą tewametru, wchodzącego w skład zespołu sond MPA 580 Courage + Khazakaelectronic GmbH. Urządzenie posiada czujniki mierzące wilgotność i temperaturę, w związku z czym można określić czas utrzymywania się właściwego poziomu nawilżenia skóry (szybkość parowania wody).

5.8.4. Badanie poziomu elastyczności skóry

Poziom elastyczności badany był za pomocą kutometru połączonego z wspomnianym w poprzednich rozdziałach zestawu. Zasada działania kutometru opiera się na podciśnieniu wytwarzanym w urządzeniu, do którego dołączona jest niewielka sonda. Zaopatrzona jest ona w otwór, którym przykładana się urządzenie do powierzchni skóry. Pod wpływem podciśnienia

skóra jest delikatnie zasysana do wnętrza otworu. Wewnątrz sondy znajduje się optyczny system pomiarowy. Składa się on z źródła i receptorów światła oraz dwóch pryzmatów ustawionych naprzeciwko siebie, przekazujących światło od transmittera do receptora. Intensywność światła zmienia się w zależności od stopnia zassania skóry przez urządzenie. Ludzka skóra jest lekko sprężysta, znaczy to, że zawiera składniki o cechach elastycznych oraz te o cechach plastycznych. Opór skóry przeciwko jej wessaniu do wnętrza sondy (odporność na odkształcenia) oraz zdolność powrotu odkształconej skóry do pierwotnego położenia (elastyczność) są podstawowymi parametrami warunkującymi zdrową skórę.

Wyniki TEWL, nawilżenia i elastyczności w grupie stosujących krem placebo oraz krem z β -karotenem przedstawiono za pomocą średniej, odchylenia standardowego oraz wartości minimalnej i maksymalnej. Za pomocą testu Shapiro - Wilka sprawdzono zgodność tych parametrów z rozkładem normalnym. W przypadku porównania wyników TEWL, nawilżenia i elastyczności, kiedy parametry spełniały kryterium normalności, w celu wykrycia różnic stosowano parametryczny test t dla zmiennych niepowiązanych. Testem Friedmana (a następnie testem post - hoc) sprawdzono, czy istnieją statystycznie istotne różnice między wartościami TEWL, nawilżenia i elastyczności mierzonych na różnych etapach badania.

5.8.5. Kontrola jakości stosowanych kremów

Zgodnie z kontrolą jakości kremów kosmetycznych (wg normy BN-64/6140-02) [314] określono następujące cechy:

- wygląd, barwę,
- zapach,
- stabilność.

5.8.6. Ocena sensoryczna

Analiza sensoryczna opiera się na pomiarze i ocenie cech preparatu kosmetycznego za pomocą zmysłów dotyku, wzroku oraz węchu. W trakcie badania pod uwagę bierze się przedstawione w tabeli 20 właściwości.

Tab. 20. Ocena sensoryczna badanych emulsji [315].

Lp.	Cecha	Definicja	Sposób wykonania badania
Cechy produktu			
1.	Efekt poduszki	Ilość emulsji odczuwana pomiędzy palcami (wskazującym i kciukiem) podczas pocierania ich o siebie. Efekt tym silniejszy im więcej emulsji odczuwa się między palcami.	Niewielką ilość badanego produktu umieszczono pomiędzy palcami, określono wyczuwalną ilość emulsji.
2.	Jednolitość	Dobry produkt powinien być jednorodny, o gładkiej powierzchni, bez widocznych niejednorodnych fragmentów oraz pęcherzyków powietrza.	Jednolitość i gładkość oceniono w naczyniu, a następnie po naniesieniu nie wielkiej ilości kosmetyku rozsmarowano ruchem kolistym na oczyszczonej skórze przedramienia.
3.	Konsystencja	Jest wynikiem gęstości i spójności emulsji.	Zanurzono palec w emulsji pod kątem 45-60°, a następnie szybko wyjęto. Zwrócono uwagę na opór kremu podczas zanurzania palca oraz na kontakt palca z kremem w trakcie jego wyciągania.
4.	Przyczepność	Możliwość nabrania preparatu na opuszek palca, emulsję o dobrej przyczepności jest łatwo nabierana.	Z naczynia badawczego pobrano emulsję na opuszek palca. Dobra przyczepność charakteryzuje emulsję, która łatwo się nabiera, nie spływa i nie rozlewa się.
Efekty na skórze			
1.	Rozprowadzanie	Łatwość rozprowadzania produktu na skórze.	Niewielką ilość emulsji naniesiono na oczyszczoną skórę przedramienia, rozprowadzono palcami. W trakcie rozprowadzania oceniono opór, jaki emulsja stawia podczas aplikacji.
2.	Kleistość	Stopień pozostawiania na skórze lepkiej, kleistej warstwy po aplikacji.	Niewielką ilość emulsji naniesiono na oczyszczoną skórę przedramienia, rozprowadzono palcami i po chwili przyciśnięto dłoń do posmarowanego miejsca sprawdzając czy odczuwalne jest klejenie się kosmetyku.
3. i 4.	Tłustość i natłuszczenie	Stopień pozostawiania na skórze tłustego depozytu bezpośrednio po aplikacji (tłustość) i po upływie ok. ½ godziny oraz godziny po aplikacji (natłuszczenie).	Niewielką ilość emulsji naniesiono na oczyszczoną skórę przedramienia, rozprowadzono palcami i po chwili przyciśnięto dłoń do posmarowanego miejsca sprawdzając czy pozostał tłusty film. Sprawdzenie powtórzono następnie po ½ i 1 godzinie.
5.	Wchłanianie	Szybkość wchłaniania się emulsji w warstwę zewnętrzną naskórka.	Niewielką ilość emulsji naniesiono na oczyszczoną skórę przedramienia, rozprowadzono palcami i oceniono po jakim czasie preparat uległ wniknięciu w naskórek.
6.	Wygładzanie	Stopień wygładzenia skóry po określonym czasie od zastosowania emulsji.	Niewielką ilość emulsji naniesiono na oczyszczoną skórę przedramienia, rozprowadzono palcami. Po ½ i 1 godzinie oceniono gładkość skóry posmarowanej emulsją poprzez porównanie z obszarem niesmarowanym.

Po 6 tygodniach stosowania badanych kremów, probanci wypełnili tabele z oceną sensoryczno-jakościową (zał. 7). Każdej ocenianej właściwości przypisane zostały wartości liczbowe wg pięciopunktowej skali (tab. 21). Każdej liczbie (notcie) odpowiada stosowny poziom jakości

Tab. 21. Tabela oceny sensoryczno - jakościowej.

Nota	Poziom jakości
1	zły
2	niedostateczny
3	dostateczny
4	dobry
5	bardzo dobry

Wszystkie uzyskane wyniki zostały uśrednione i zaprezentowane za pomocą wykresów liniowych. Stworzono również wykres radarowy, na którym zostały przedstawione badane kremy w celu ich porównania.

5.8.7. Ocena sensoryczno - hedonistyczna

Po zakończonych badaniach probanci wypełnili również tabelę z oceną sensoryczno-hedonistyczną (zał.7). Służy ona do sprawdzenia stopnia akceptacji preparatu kosmetycznego przez ochotników. Stosowana jest tutaj skala bipolarna z zerem, która posiada wartości jak zostało to przedstawione w tabeli 22.

Tab. 22. Tabela oceny sensoryczno - hedonistycznej.

Nota	Ocena
-3	Zdecydowanie mi się nie podoba
-2	Nie podoba mi się
-1	Niezbyt mi się podoba
0	Nie mam zdania
1	Trochę mi się podoba
2	Podoba mi się
3	Bardzo mi się podoba

Wszystkie wyniki zostały uśrednione i przedstawione za pomocą wykresów liniowych i radarowych.

5.9. Badanie kinetyki uwalniania karotenoidów z samodzielnie przygotowanych formulacji kosmetycznych

Zbadano uwalnianie karotenoidów zawartych w komercyjnych emulsjach. Do badań wykorzystano aparat dyfuzyjny Agilent Technologies 708-DS, wyposażony w spektrofotometr UV-Vis (Cary 50 Bio, firmy Varian).

5.9.1. Pomiar wartości $\lambda_{\max}$ dla badanych karotenoidów

Za pomocą spektrofotometru UV-Vis (Cary 50 Bio, firmy Varian) dokonano pomiarów absorpcji promieniowania badanych karotenoidów. Jako rozpuszczalnik użyto mieszaninę etanolu z buforem fosforanowym. Badania te wykonano w celu oznaczenia $\lambda_{\max}$ każdego z badanych karotenoidów, przy której absorbancja związku jest największa. Aparatura służąca do badania uwalniania substancji z preparatów kosmetycznych, połączona jest ze spektrofotometrem UV-Vis. Ustawienie spektrofotometru na odpowiednią długość fali umożliwia dokładną ocenę ilości uwolnionej substancji, która absorbuje promieniowanie z zakresu ultrafioletu i promieniowania widzialnego. Jest to zgodne z prawem Lamberta- Beera, które mówi, że absorbancja jest wprost proporcjonalna do stężenia substancji w roztworze [316].

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

gdzie:

A- absorbancja,

ε - molowy współczynnik absorpcji [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$],

c- stężenie [mol / dm^3],

l- grubość warstwy absorbującej [cm].

5.9.2. Przygotowanie buforu - płynu akceptorowego

Płyn akceptorowy to ciecz, do której w trakcie pomiaru z badanej emulsji uwalnia się substancja czynna. Istotnym parametrem płynu akceptorowego zwanego również medium jest wartość jego pH. Przy doborze medium należy kierować się miarą jego podobieństwa do warunków fizjologicznych skóry. W zależności od rozpuszczalności badanej substancji aktywnej stosuje się roztwory wodne (substancje dobrze rozpuszczalne w wodzie) lub wodno-alkoholowe (substancje trudno rozpuszczalne w wodzie).

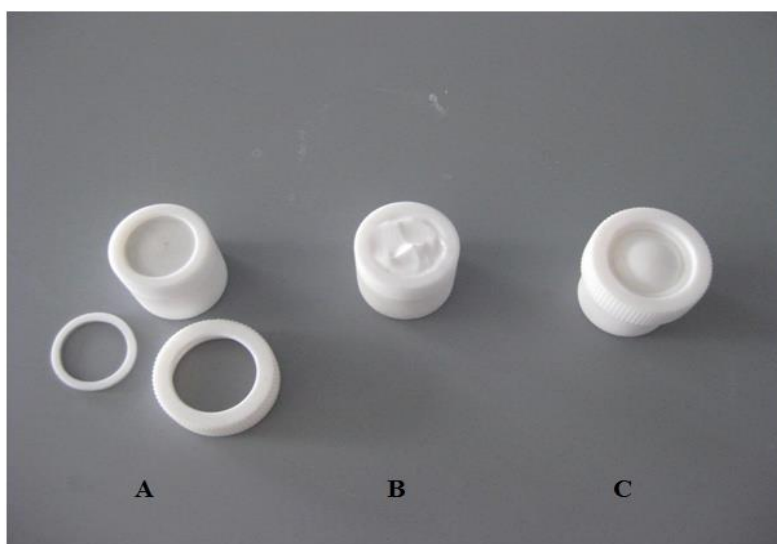
Do badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej jako medium wykorzystano mieszaninę buforu fosforanowego o pH równym 5,8 oraz 96% etanol w stosunku 35 jednostek objętościowych etanolu: 65 jednostek objętościowych buforu. Bufor wykonano samodzielnie. Diwodorofosforan (V) potasu (32,5 g) rozpuszczono w 2000 ml wody destylowanej. W oddzielnym naczyniu rozpuszczono 8 g wodorotlenku sodu w 2000 ml wody destylowanej. Z tak otrzymanego roztworu pobrano 1464 ml i połączono z uprzednio przygotowanym roztworem diwodorofosforanu (V) potasu. Wartość pH otrzymanego roztworu buforowego wyniosła 5,8.

5.9.3. Przygotowanie roztworu wzorcowego

Przygotowano roztwór wzorca o objętości 50 ml, zawierający 25 mg badanego karotenoidu o czystości 99,6 %. Stężenie masowe wzorcowa $\rho = 0,5$ [mg/ml].

5.9.4. Przygotowanie próbek

W trzech teflonowych kuwetach ekstrakcyjnych odważono po 2 g badanego kremu, nałożono na nie membrany imitujące ludzką skórę oraz pierścienie typu O-ring przytrzymujący membranę przed przemieszczeniem. Całość zakręcono nakrętką tak aby membrana była odpowiednio naciągnięta i nie występowały pęcherzyki powietrza (rys. 36). W badaniach wykorzystano membranę wykonaną z polimeru naturalnego będącego typem celulozy o nazwie Membrana Cuprophan firmy Agilent.



Rys. 36. Kuwety do uwalniania A- pusta kuweta, pierścień typu O-ring, B- kuweta z badanym kremem, C- kuweta gotowa do pomiaru.

5.9.5. Ustalenie warunków pomiaru

Pomiary procesu uwalniania karotenoidów tak jak: β -karoten, likopen oraz astaksantyna z komercyjnych preparatów kosmetycznych prowadzono w temperaturze $32,3 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Czas każdego pomiaru wynosił łącznie 24 godziny, a próbki były pobierane co 30 min. Prędkość obrotów mieszadeł była nastawiona na 100 obrotów/min.

5.9.6. Budowa i przygotowanie aparatury do pomiaru szybkości procesu uwalniania

Urządzenie Agilent Technologies 708 - DS wyposażone jest w 8 naczyń o pojemności 200 ml. W każdym naczyniu znajduje się łopatką. Łopatki, które są zamieszczone nad komorami ekstrakcyjnymi, są elementami składowymi ruchomej głowicy aparatu. Przepływ płynu akceptorowego, zawierającego uwolnioną substancję pomiędzy komorami

pomiarowymi a spektrofotometrem zapewnia pompa. System do pomiaru szybkości procesu uwalniania jest także wyposażony w aparat do ogrzania wody znajdującej się w łaźni. Do pięciu komór pomiarowych wprowadzono płyn akceptorowy, do pozostałych trzech odpowiednio wzorzec oraz płyn akceptorowy. Do naczyń wypełnionych medium wprowadzono teflonowe komory ekstrakcyjne zawierające badaną emulsję.

Obserwacja zjawiska uwalniania badanej substancji z podłoża kosmetycznego do medium jest możliwa dzięki badaniu zmian absorbancji w czasie. Do obliczenia ilości uwolnionej substancji w czasie skorzystano ze wzoru [316].

$$\% \text{ uwolnienia} = \left(\frac{A_p}{A_w} \right) \left(\frac{m_w [\text{mg}] \times C_w}{V_w [\text{ml}]} \right) \left(\frac{1}{D_w} \right) \left(\frac{V_p [\text{ml}]}{m_p [\text{ml}]} \right) \cdot 100\%$$

gdzie:

A_p - absorbancja próbki [-],

A_w - absorbancja wzorca [-],

m_w - masa wzorca [mg],

V_w - objętość roztworu wzorcowego [ml],

C_w - czystość wzorca,

D_w - rozcieńczenie wzorca,

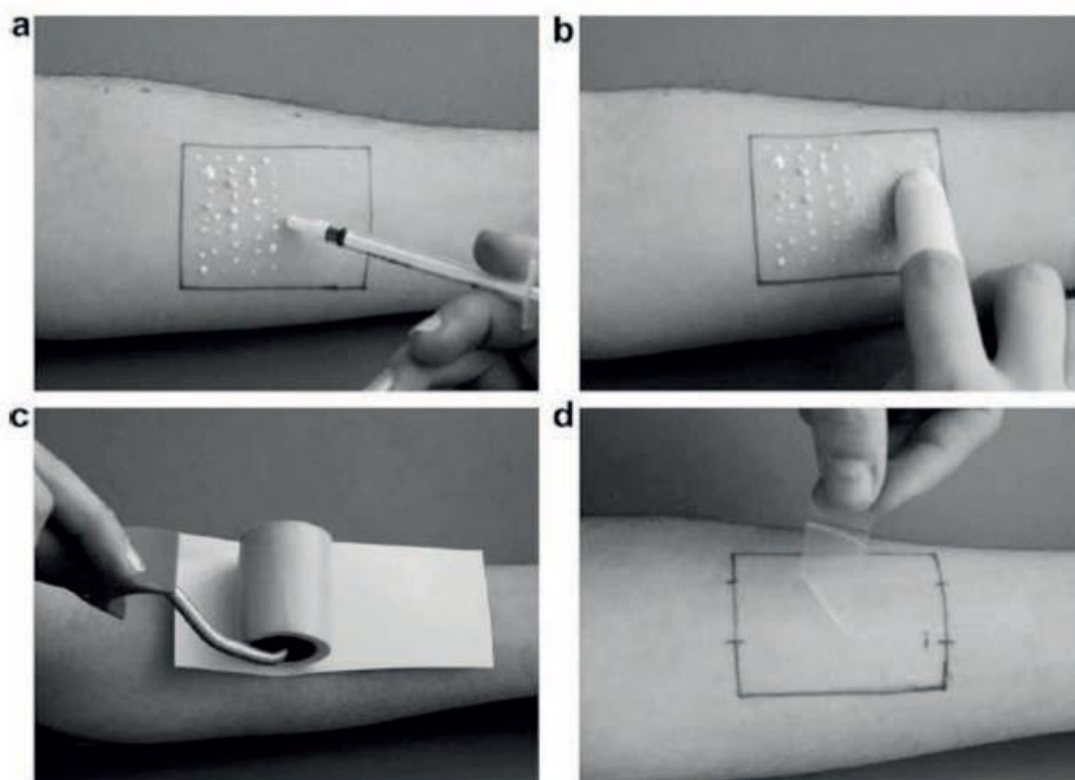
m_p - masa substancji oznaczanej zawartej w próbce [mg],

V_p - objętość medium [ml].

5.10. Badanie biodostępności dermalnej β -karotenu za pomocą metody zdzierania

Metoda zdzierania określa biorównoważność badanej substancji aktywnej. Polega na usuwaniu kolejnych warstw rogowych naskórka *stratum corneum* przy pomocy taśmy adhezyjnej [317]. Taśma Instant d-Squame® Skin Indicators zastosowana została do badań dermatologicznych dotyczących przenikania β -karotenu przez *stratum corneum*. Procedura obejmuje umieszczenie taśmy adhezyjnej na powierzchni skóry, następnie delikatny naciskana taśmę zapewniający dobry kontakt taśmy z komórkami *stratum corneum* oraz usunięcie taśmy z powierzchni naskórka poprzez szybkie oderwanie (rys. 37). Procedura jest bezbolesna i nieinwazyjna, ponieważ wraz z taśmą usuwane są tylko martwe komórki naskórka (korneocyty) wbudowane w lipidowy cement naskórka [318]. Usuwanie *stratum corneum* może polegać na wzajemnym oddziaływaniu adhezyjnych sił taśmy adhezyjnej oraz międzykomórkowych sił kohezji [319]. Badania przeprowadzone zostały u zdrowych ochotników (tzw. probantów), których dobrano pod względem wieku. W badaniach brało udział 18 osób. Zbierane były również informacje na temat przebytych lub aktualnych chorób skóry i ich sposobów leczenia, a także na temat ogólnego stanu zdrowia probanta. Przed przystąpieniem do badań każdy ochotnik podpisał formularz świadomej zgody na udział w testach (zał. 2, 3). Probantom udzielono szczegółowych informacji na temat celu

doświadczenia, sposobu jego przeprowadzania oraz ewentualnych skutków ubocznych. Każda osoba biorąca udział w badaniu otrzymała dokumenty, tj. pisemną instrukcję, jak należy stosować testowany kosmetyk oraz ankietę, którą wypełniła podczas stosowania preparatu (zał.6,7). W pierwszym tygodniu probanci otrzymali wcześniej przygotowane kremy z β -karotenem, którymi smarowali przez 5 tygodni prawe przedramię. Przed przystąpieniem do aplikacji kremu probanci zostali poddani badaniom przeznaskórkowej utraty wody (TEWL) aby sprawdzić początkowy stan bariery naskórkowej. Kolejnym etapem było określenie ilościowej zawartości β -karotenu w plastrach adhezyjnych pozwalających na wyznaczenie łącznej zawartości β -karotenu w *stratum corneum*.



Rys. 37. Procedura metody strippingu (a) - aplikacja preparatu na wyznaczone pole, (b) - równomierne rozsmarowanie (c) - taśma adhezyjna jest dociskana do powierzchni skóry wałkiem, (d) - zerwanie taśmy [320].

5.10.1. Metoda określania ilości zerwanego *stratum corneum* - metoda ważenia różnicowego

Najbardziej bezpośrednią metodą, a w rzeczywistości jedyną potrzebną do kalibracji pozostałych procedur jest zważenie każdej taśmy adhezyjnej przed i po strippingu, co pozwala na określenie ilości usuniętej tkanki (m) na podstawie różnicy mas taśmy. Ponieważ znana jest powierzchnia badana (A) oraz gęstość tkanki (p) to można wyznaczyć głębokość oraz odległość (x) ingerencji w tkankę na podstawie wzoru [321]:

$$x = m / (A \cdot p)$$

5.10.2. Określenie ilości pozostałego β -karotenu w *stratum corneum* za pomocą pomiaru przeznaskórkowej utraty wody (TEWL)

Pomiary TEWL przeprowadzone były na polu aplikacyjnym chwilę przed i po posmarowaniu prawego przedramienia kremem zawierającym β -karoten. Pomiaru dokonano w celu sprawdzenia wpływu kremu z β -karotenem na stan bariery naskórkowej za pomocą Tewametru.

TEWL odniesienia ($TEWL_0$) z pola kontrolnego nie poddanego zdzieraniu obliczono na podstawie wzoru pierwszego prawa dyfuzji Ficka:

$$TEWL_0 = D \cdot K / L \cdot \Delta C$$

gdzie:

D- współczynnik dyfuzji wody w warstwie *stratum corneum* ($2,4172 \cdot 10^{-10} [m^2/h]$)

K- współczynnik podziału wody w lipidach zawartych w SC (0,06)

L- grubość warstwy SC [m]

ΔC - różnica w stężeniu wody pomiędzy naskórkiem a środowiskiem zewnętrznym ($1000000 [g/m^3]$)

Po zdzieraniu, w wyniku którego usunięto warstwę SC o grubości x, wartość TEWL wzrosła do wielkości opisanej wzorem:

$$TEWL_x = D \cdot k / (L - x) \cdot \Delta C$$

Inwersja drugiego równania ukazuje liniową zależność między $(TEWL_x)^{-1}$ i x, a rzut punktu znajdującego się na tej prostej na oś odciętych wskazuje grubość SC.

Wyniki zostały przedstawione jako ilość na znormalizowany ułamek usuniętego SC.

$$SC = x / L$$

Taki sposób wyrażania wyników doświadczeń pozwolił racjonalizować wyniki otrzymane dla probantów charakteryzujących się różną grubością SC [321].

5.10.3. Określanie ilości zerwanego *stratum corneum* za pomocą metody spektroskopii optycznej

W związku z tym, że pseudo - absorbancja korneocytów może być wykorzystana do określenia ilości zerwanego SC, paski adhezyjne po usunięciu z powierzchni skóry były poddawane ekstrakcji 25 ml acetonu, po której wykonywano pomiary za pomocą spektrofotometru UV-Vis Cary 50 Bio, firmy Varian. Przeprowadzono oznaczenia przy całej długości zakresu UV-Vis, następnie stwierdzano czy została wykryta charakterystyczna długość fali dla β -karotenu. Poddano analizie próbki z β -karotenem przy charakterystycznej dla niego długości fali $\lambda=454nm$.

W badaniach strippingu porównania takich parametrów jak procentowy TEWL zmierzony i obliczony, parametr D/L^2 oraz % stężenie β -karotenu między poszczególnymi tygodniami badania wykonano za pomocą testu ANOVA dla pomiarów powtarzalnych z

testem post-hoc. Współczynniki korelacji między $1/TEWL$ a głębokością ingerencji w tkankę, głębokością ingerencji w tkankę a % zmierzonego $TEWL$ oraz głębokością ingerencji w tkankę a % obliczonego $TEWL$ wykonano za pomocą testu korelacji rang Spearmana lub korelacji Pearsona.

Wszystkie obliczenia wykonano w programie STATISTICA PL v 10.0 firmy StatSoft. Wyniki uznano za istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

VI. WYNIKI BADAŃ I ICH DYSKUSJA

6. Ocena właściwości fizykochemicznych formułacji kosmetycznych zawierających karotenoidy

6.1. Pomiar lepkości

6.1.1. Samodzielnie przygotowane emulsje kosmetyczne zawierające karotenoidy

Lepkość emulsji kosmetycznych jest bardzo ważnym parametrem fizykochemicznym w ocenie formułacji kosmetycznych. To od niej zależy między innymi dobra smarowalność, wchłanianie formułacji kosmetycznych, szybkość uwalniania z niej substancji aktywnych oraz stabilność. Szczególnie istotna jest wartość lepkości fazy zewnętrznej. Wzrost stężenia fazy zewnętrznej skutkuje wzrostem lepkości emulsji niezależnie od tego, która z cieczy stanowi tę fazę [322]. W miarę wzrostu stężenia fazy wewnętrznej rośnie liczba kropli tej fazy przypadających na jednostkę objętości. Maleje odległość między kroplami, co powoduje silniejsze wzajemne oddziaływania. Zderzające się krople tworzą agregaty, które mogą zatrzymywać we wnętrzu pewną ilość fazy ciągłej, w następstwie czego lepkość emulsji rośnie [323]. W tabeli 23 przedstawiono wartości lepkości dla różnych typów emulsji zawierających β -karoten, likopen, astaksantynę oraz wyjściowej bazy kosmetycznej (bez substancji aktywnej, tj. karotenoidów).

Tab.23. Wartości lepkości dla różnych typów baz kosmetycznych zawierających β -karoten, likopen, astaksantynę oraz wyjściowych baz kosmetycznych.

Typ emulsji	Lepkość [mPa·s][$\pm 3\%$]			
	β -karoten	likopen	astaksantyna	baza kosmetyczna
Badanie bezpośrednie po przygotowaniu				
O/W na zimno	14 400	15 000	14 000	14 400
O/W	13 000	14 000	12 000	14 000
W/O	44 600	44 000	44 000	44 600
Temperatura pokojowa z dostępem światła, po 100 dniach				
O/W na zimno	14 000	14 500	13 500	14 000
O/W	12 500	13 500	11 500	13 500
W/O	44000	43 500	43 500	44 000
Temperatura pokojowa bez dostępu światła, po 100 dniach				
O/W na zimno	14 300	14 800	13 900	14 200
O/W	12 900	13 800	11 800	13 900
W/O	44 500	43 900	44 000	44 500
Temperatura 4°C, po 100 dniach				
O/W na zimno	14 400	15 000	14 000	14 000
O/W	12 900	13 900	11 900	13 900
W/O	44 500	44 000	43 900	44600
Temperatura 45°C, po 100 dniach				
O/W na zimno	13 400	14 000	13 000	14 000
O/W	12 000	13 000	11 000	13 400
W/O	43 500	43 000	43 000	44 000

Kosmetyki zbadano bezpośrednio po przygotowaniu oraz po 100 dniach przechowywania w różnych warunkach (temperatura pokojowa bez dostępu światła,

temperatura pokojowa z dostępem światła, obniżona temperatura, tj. 4°C oraz podwyższona temperatura, tj. 45°C). Na podstawie badań lepkości kremów zawierających karotenoidy, przechowywanych w różnych warunkach można stwierdzić, że im mniejsza zawartość wody w emulsji tym większa jest lepkość (emulsja typu W/O). Emulsje typu O/W, które zawierają więcej wody nie są gęste, tłuste oraz lepkie. Preparaty przygotowane na zimno oraz na ciepło tylko nieznacznie różniły się wartościami lepkości. W miarę wzrostu temperatury przechowywania badanych emulsji kosmetycznych, w wyniku zwiększania się energii kinetycznej cząsteczek, zmniejszają się siły przyciągania działające między cząsteczkami efektem czego jest spadek lepkości emulsji [324]. Warunki przechowywania preparatów miały wpływ na ich lepkość. Wartość lepkości uległa zmianie na skutek ilościowych zmian składu emulsji kosmetycznych. Do otoczenia uwolniły się substancje lotne wchodzące w skład emulsji [325,326]. Zaobserwowano, że lepkość kosmetyków spada po 100 dniach. Największy spadek lepkości zanotowano w przypadku przechowywania emulsji w temperaturze 45°C. W temperaturze tej dochodzi do rozwarstwienia emulsji. Wartość początkowa lepkości preparatów praktycznie nie zmieniła się, gdy były one przechowywane w temperaturze 4°C. Najwyższą wartością lepkości we wszystkich warunkach charakteryzowały się emulsje zawierające β -karoten, następnie likopen, natomiast najniższą preparaty z astaksantyną.

6.1.2. Kremy komercyjne zawierające karotenoidy

Poddane analizie kremy komercyjne, które zawierały karotenoidy charakteryzowały się wartościami lepkości poniżej 20 000 [mPa·s] mieszczącymi się w przedziałach odpowiednio dla formułacji z β -karotenem 13 000-17 000, z likopenem 13 000-15 000 i astaksantyną 13 000 - 16 000 [mPa s]. Analiza składu każdego z kosmetyków pozwoliła na wyciągnięcie wniosku, że preparaty zawierające większą liczbę składników tłuszczowych cechują się wyższymi lepkościami.

Badane kremy komercyjne możemy podzielić na: emulsje O/W oraz W/O. Pierwsze z nich szybko wnikają w skórę, są mniej tłuste, tworzą na skórze film ochronny. Stosowane są one w preparatyce kremów nawilżających. Przykładami emulsji O/W są: balsamy pielęgnacyjne, ochronne, odżywczo-regenerujące oraz mleczka zmywające i pielęgnacyjne. Emulsje W/O dobrze wnikają w skórę, ale pozostawiają na niej tłustą warstwę. Stosuje się je w preparatach przeznaczonych do pielęgnacji skóry suchej oraz skóry niemowlęcej i starczej. Przykładami takich emulsji są: kremy ochronne, kremy na noc oraz kremy półtłuste [326]. W tabeli 24 przedstawiono wartości lepkości komercyjnych preparatów kosmetycznych zawierających badane, w ramach niniejszej pracy, karotenoidy.

Tab. 24. Wartości lepkości emulsji komercyjnych zawierających karotenoidy.

Nazwa kosmetyku*	Lepkość [mPa·s][± 3%]
Preparaty kosmetyczne zawierające β-karoten	
AA ECO Marchewka	15 000
Ava Laboratorium	17 000
Bielenda krem	15 000
Bielenda masło	17 000
Cerkobalm	14 000
Cashmere	13 000
DaxMen	16 000
Sylveco z betulina	15 000
Sylveco lekki krem	14 000
Tołpa	16 000
Ziaja	15000
Preparaty kosmetyczne zawierające likopen	
AAECO Pomidor	15 000
Eveline	13 000
Mincer	15 000
Preparaty kosmetyczne zawierające astaksantynę	
Oriflame Night	16 000
Oriflame Day	16 000
Oriflame Eye	13 000

* Pełne nazwy analizowanych emulsji kosmetycznych zostały przedstawione w tab. 11-13.

6.2. Badanie wartości pH

6.2.1. Samodzielnie przygotowane emulsje kosmetyczne zawierające karotenoidy

W tabeli 25 przedstawiono wartości pH dla różnych typów emulsji zawierających β-karoten, likopen, astaksantynę oraz bazy kosmetycznej. Kosmetyki zbadano od razu po przygotowaniu oraz po 100 dniach przechowywania w różnych warunkach (jak w rozdziale 6.1.1).

Badane preparaty charakteryzowały się pH zbliżonym do pH fizjologicznego ludzkiej skóry (pH 5,5). W trakcie przechowywania formułacji kosmetycznych w różnych warunkach zauważono niewielki spadek wartości pH. Obniżenie parametru w przypadku emulsji przechowywanych przez 100 dni w temperaturze 45°C było znaczące, zaś minimalne w temperaturze pokojowej z dostępem światła. Natomiast w temperaturze pokojowej bez dostępu światła oraz w 4°C spadek wartości pH był najniższy.

Zawartość karotenoidów w emulsjach mogła spowodować obniżenie wartości pH, gdyż związki te, będące przeciwutleniaczami mają charakter kwaśny. Obniżenie pH emulsji przez cały okres badawczy może również wynikać z utlenienia osnowy olejowej głównie do wodoronadtlenków kwasów tłuszczowych w czasie ich przechowywania. W olejach roślinnych takich jak: olej rzepakowy, kukurydziany, słonecznikowy i z różnych pestek w większości znajdują się kwasy wielonienasycone, które w swojej strukturze chemicznej mają więcej niż jedno wolne wiązanie podwójne. Oznacza to, że oleje te łatwo się utleniają. Olej,

po stosunkowo krótkim czasie kontaktu z powietrzem, powoduje obniżenie pH emulsji [327-330].

Tab. 25. Wartości pH dla różnych typów emulsji zawierających β -karoten, likopen, astaksantynę oraz bazy kosmetycznej. Kosmetyki zbadano od razu po przygotowaniu oraz po 100 dniach przechowywania w różnych warunkach.

Typ emulsji	Wartość pH [$\pm 0,02$]			
	β -karoten	likopen	astaksantyna	baza kosmetyczna
Badanie bezpośrednie po przygotowaniu				
O/W na zimno	6,00	6,10	6,00	6,15
O/W	6,50	6,25	6,39	6,68
W/O	5,80	5,50	5,35	5,85
Temperatura pokojowa z dostępem światła, po 100 dniach				
O/W na zimno	6,50	5,40	5,70	5,80
O/W	6,10	5,80	5,95	6,18
W/O	5,20	5,00	5,10	5,45
Temperatura pokojowa bez dostępu światła, po 100 dniach				
O/W na zimno	6,20	6,00	5,90	6,05
O/W	6,40	6,05	6,15	6,45
W/O	5,50	5,30	5,20	5,60
Temperatura 4°C, po 100 dniach				
O/W na zimno	6,00	6,10	6,00	6,05
O/W	6,50	6,20	6,30	6,60
W/O	5,75	5,45	5,30	5,85
Temperatura 45°C, po 100 dniach				
O/W na zimno	6,40	5,30	5,60	5,70
O/W	6,05	5,70	5,85	6,10
W/O	5,15	5,05	5,10	5,40

6.2.2. Kremy komercyjne zawierające karotenoidy

Badane formuły komercyjne, tak jak i samodzielnie przygotowane emulsje zawierające karotenoidy, charakteryzowały się również pH zbliżonym do pH fizjologicznego ludzkiej skóry (tab. 26).

Posiadanie zbliżonej wartości pH do pH fizjologicznego ludzkiej skóry umożliwiło wprowadzenie tych kosmetyków na rynek konsumencki. Tworzenie kwaśnego płaszcza na powierzchni skóry ma kluczowe znaczenie dla dojrzewania bariery naskórkowej i procesów naprawczych. Wiele czynników wpływa na tworzenie kwaśnego płaszcza, w tym wydzielanie łju, potu (kwas mlekowy), aminokwasów i ich pochodnych (kwas urokaninowy i kwas pirolidyno-2-karboksylowy). W chwili narodzin odczyn pH skóry noworodka waha się od 6,3 do 7,5 [330]. Takie pH obniża zdolność skóry do obrony przeciw bakteriom. W przeciągu dwóch pierwszych tygodni życia pH skóry obniża się niemal do 5,0, co jest zbliżone do wartości obserwowanych w życiu dorosłym. Należy zauważyć również, że pH powierzchni skóry dorosłych także waha się w szerokim zakresie (od 4,0 do 6,7). Najwyższym pH charakteryzował się krem Bielenda masło (pH 6,76), natomiast najniższym Sylveco lekki krem (pH 5,30). Różnica w wartościach pH poszczególnych kremów może wynikać z

różnego składu badanych emulsji oraz sposobu ich przygotowania (temperatura przygotowania oraz dodatek emulgatora). Wartości pH zbadanych kremów komercyjnych zawierających karotenoidy zbliżone są do naturalnego pH (~5,5) skóry, dlatego niższe emulsje kosmetyczne nie naruszają naturalnego płaszcza hydrolipidowego naskórka, nie pozbawiają go składników natłuszczających i nawilżających. Otrzymane wartości pH badanych emulsji są odpowiednimi wartościami, ponieważ gdyby odczyn naszej skóry zmienił się na wyższy na skutek stosowania kosmetyków charakteryzujących się bardziej alkalicznymi wartościami pH znacznie łatwiej dochodziłoby do jej przesuszenia oraz uszkodzeń, gdyż staje się ona mniej odporna na czynniki zewnętrzne, takie jak wiatr czy działanie promieni słonecznych. Skóra o nieprawidłowym dla siebie odczynie staje się także znacznie mniej odporna na działanie wirusów i bakterii, które łatwiej przenikają do jej wnętrza. Wirusy i bakterie mogą stać się przyczyną podrażnień oraz chorób [330].

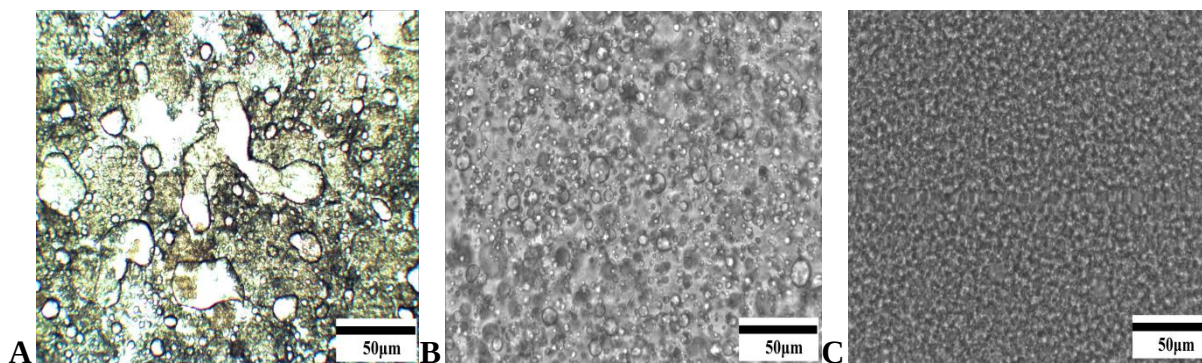
Tab. 26. Wartości pH dla emulsji komercyjnych zawierających karotenoidy.

Nazwa kosmetyku	Wartość pH[± 0,02]
β-karoten	
AA ECO Marchewka	5,85
Ava Laboratorium	6,36
Bielenda krem	5,76
Bielenda masło	6,76
Cerkobalm	5,40
Cashmere	5,83
Dax Men	6,32
Sylveco z betulina	5,83
Sylveco lekki krem	5,30
Tołpa	6,00
Ziaja	5,30
Likopen	
AA ECO Pomidor	5,52
Eveline	5,72
Mincer	5,60
Astaksantyna	
Oriflame Night	6,20
Oriflame Day	6,50
Oriflame Eye	6,10

6.3. Określenie typu emulsji metodą mikroskopową

6.3.1. Samodzielnie przygotowane emulsje kosmetyczne typu O/W, W/O oraz O/W na zimno zawierające karotenoidy

Rodzaj emulsji typu O/W oraz W/O określono na podstawie zabarwienia faz. Zabarwieniu ulega faza, która rozpuszcza dany barwnik [167]. Na rys. 38 A i C przedstawiono zdjęcia emulsji O/W. Zaobserwowano czerwone zabarwienie kropli fazy tłuszczowej emulsji, spowodowane dodatkiem barwnika czerwieni Kongo. Rys. 38 B przedstawia zdjęcie emulsji typu W/O. Potwierdza to zabarwienie fazy zewnętrznej, którą jest dla tego typu emulsji woda.

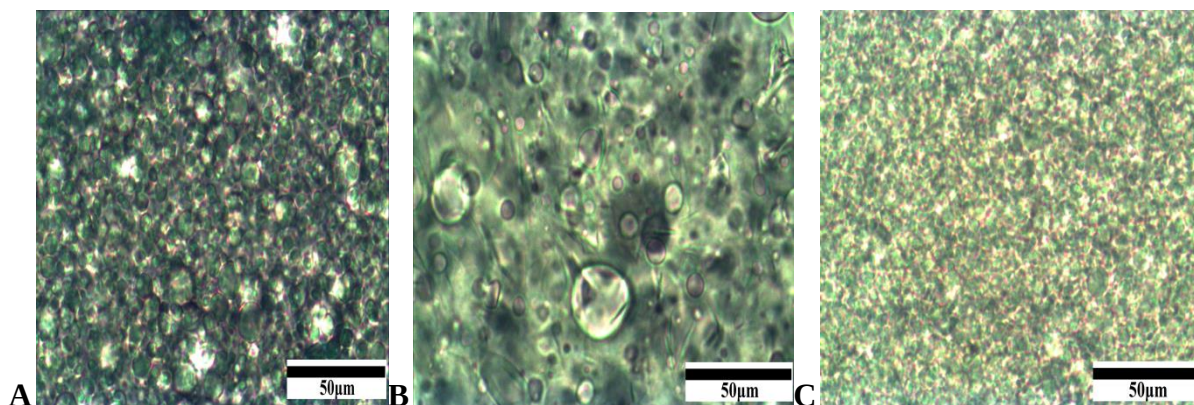


Rys. 38. Zdjęcia mikroskopowe trzech typów emulsji: A- O/W, B- W/O, C- O/W na zimno zawierających β -karoten. Powiększenie 400x.

W trakcie tej obserwacji nie zanotowano zmian natężenia światła przechodzącego, co wskazuje na dobrą stabilność emulsji. W szczególności uzyskana emulsja O/W przygotowana na zimno charakteryzowała się dobrą jednorodnością i wysokim rozdrobnieniem fazy rozproszonej, tj. olejowej. Emulsja typu O/W na zimno charakteryzowała się wielkościami cząstek nie większymi niż 7 μm . Ten sam typ emulsji, ale przygotowany na gorąco charakteryzował się mniejszym uporządkowaniem i jednorodnością wielkości cząstek. Dodatkowo wyraźnie zaznacza się większa nieciągłość fazy olejowej. Wielkość cząstek emulsji typu O/W nie przekraczała 93 mikrometrów. Natomiast wielkość cząstek emulsji typu W/O nie była większa niż 14 μm .

6.3.2. Kremy komercyjne zawierające karotenoidy

Badania mikroskopowe wykazały, że wszystkie kremy komercyjne są emulsjami typu O/W (rys. 39 przedstawia zdjęcia mikroskopowe dla wybranych preparatów). Emulsje typu O/W są najczęściej wykorzystywane przez producentów do produkcji kremów nawilżających, ponieważ szybciej wnikają w skórę oraz charakteryzują się mniej tłustą, lżejszą konsystencją.



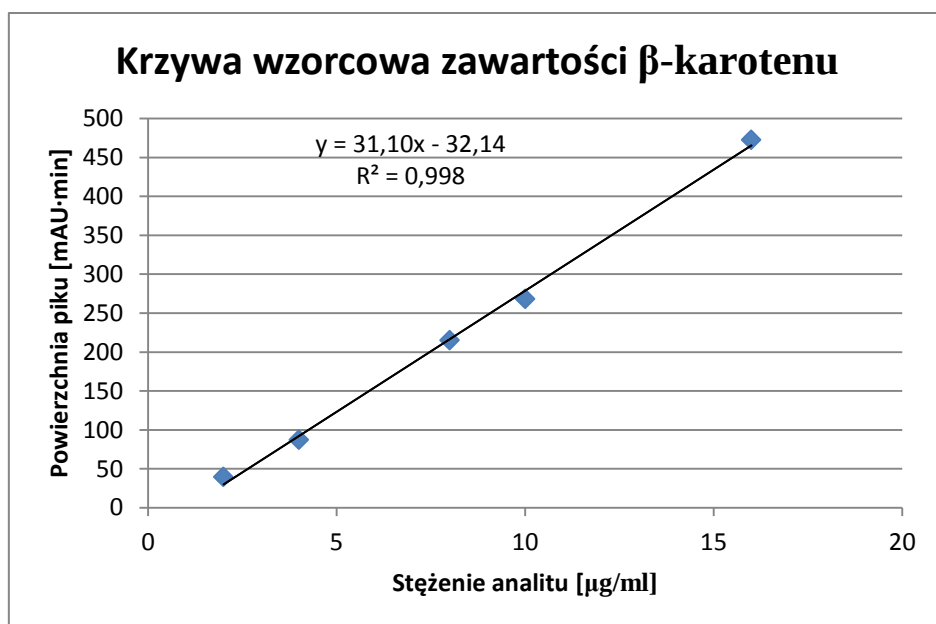
Rys. 39. Zdjęcia mikroskopowe kremów komercyjnych zawierających karotenoidy: A-Ziaja, B- Ava Laboratorium, C- Bielenda masło. Powiększenie 1000x.

Wszystkie przygotowane preparaty charakteryzowały się podobną jednorodnością i wielkością cząstek fazy zdyspergowanej. Wielkość cząstek kremu Ziaja nie przekraczała 16 μm , kremu Ava nie była większa niż 32 μm . Natomiast wielkość cząstek kremu Bielenda masło nie przekraczała 11 μm .

6.4. Oznaczanie zawartości karotenoidów w preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

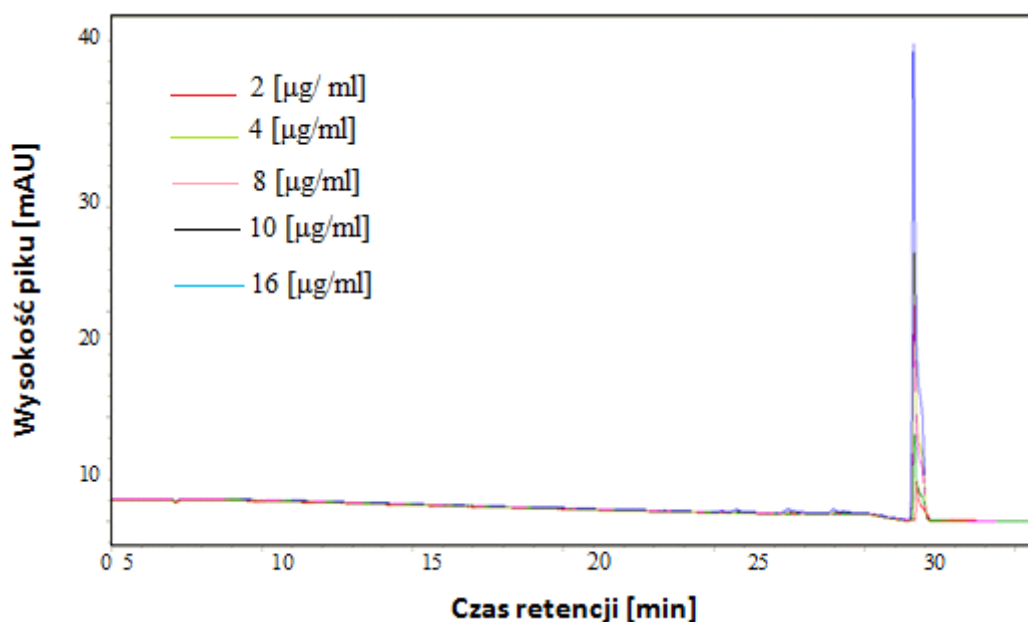
6.4.1. Oznaczanie β -karotenu

Metodologia oznaczania karotenoidów w kremach kosmetycznych została opracowana na podstawie dostępnych danych literaturowych dla produktów spożywczych (opis rozdział 5.3.1). Przetestowanych zostało wiele metod oznaczania zawartości karotenoidów w produktach spożywczych, niestety nie dawały one zadowalających rezultatów. Stosowano różne rozpuszczalniki wchodzące w skład fazy ruchomej oraz mieszano je w różnych stosunkach, modyfikowano parametry: prędkość przepływu fazy ruchomej, długość fali detektora UV-Vis, przy której prowadzono detekcję, objętość dozowanych próbek oraz czas analizy. Wypróbowana została elucja gradientowa oraz izokratyczna. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, iż wydajność przedstawionej w części eksperymentalnej (5.3.1) metody ekstrakcji wynosiła 90,56%. Granica oznaczalności (LOQ) wynosiła 1,04 $\mu\text{g/ml}$.



Rys. 40. Krzywa wzorcowa do oznaczania β -karotenu.

Na rys. 40 została przedstawiona krzywa wzorcowa zawartości β -karotenu rozpuszczonego w rozpuszczalniku (fazie ruchomej - A: metanol: woda (80:20 v/v), B: octan etylu). Metoda oznaczania tego związku charakteryzuje się szerokim zakresem liniowości przy zachowaniu dobrego współczynnika korelacji $R^2 = 0,998$.



Rys. 41. Chromatogramy przedstawiające roztwory wzorcowe β -karotenu o różnych stężeniach.

Na chromatogramach (rys. 41) można zaobserwować piki pochodzące od β -karotenu wprowadzonego do dozownika aparatu HPLC w różnych stężeniach, przy czasie retencji równym około 27 minut.

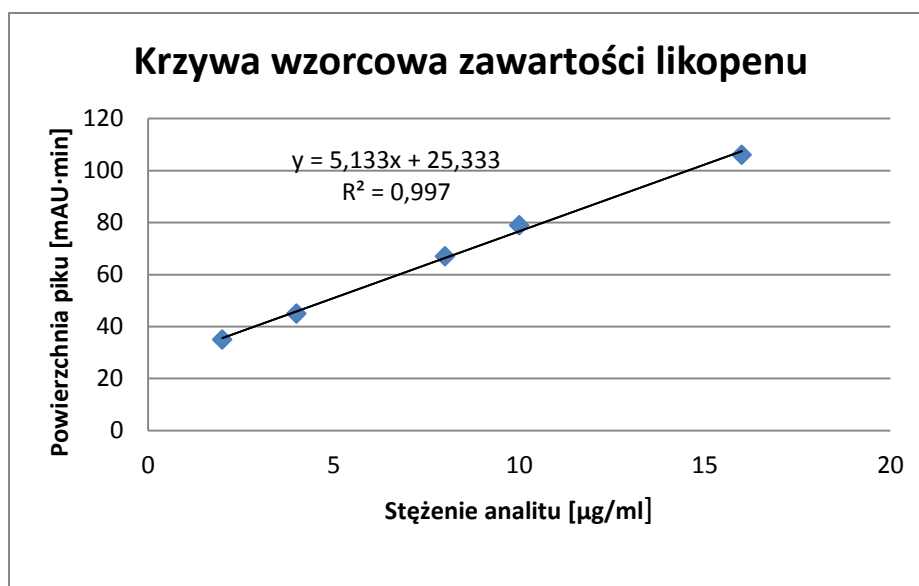
Tab. 27. Ułamek wagowy β -karotenu zawartego w kremach komercyjnych.

Nazwa kremu	Zawartość β -karotenu [mg] [$\pm 0,05$] w 100 g preparatu
Bielenda masło	3,10
Sylveco lekki krem	3,43
Cashmere	3,50
Bielenda krem	4,29
Ziaja	5,30
AA ECO Marchewka	5,58
Tołpa	6,30
Cerkobalm	7,80
Sylveco z betulina	9,24
Ava Laboratorium	10,45

Badaniami objęto emulsje zawierające karotenoidy. Identyfikację badanych związków prowadzono przez porównanie wartości ich czasów retencji (t_R) z odpowiednimi wzorcami oraz badanie widm absorpcji przy pomocy spektrofotometru. Analiza metodą HPLC kremów komercyjnych zawierających β -karoten potwierdziła obecność tego związku w ich składzie. W tabeli 27 przedstawiono ułamek wagowy stężenia β -karotenu zawartego w kremach komercyjnych o pojemności 100 mg. Zawartość β -karotenu oznaczanego w wyżej wymienionych kremach wahała się w granicach 3,10 - 10,45 mg/100 g formulacji. Największą zawartością karotenoidu charakteryzował się krem Bielenda masło, natomiast najmniejszą preparat Ava Laboratorium. Na podstawie przeprowadzonych analiz potwierdzono deklarowaną przez producentów w spisie INCI obecność β -karotenu. Koncerny kosmetyczne produkują kosmetyki z β -karotenem, ponieważ związek ten jest jednym z najsilniejszych antyoksydantów. Jego cząsteczki nie regenerują się jak w przypadku innych przeciwutleniaczy, lecz ulegają degradacji w procesie neutralizowania wolnych rodników, czyli reaktywnych form tlenu. Stąd też podwyższenie poziomu karotenoidów w skórze wzmacnia jej odbudowę oraz opóźnia procesy jej starzenia [126-128].

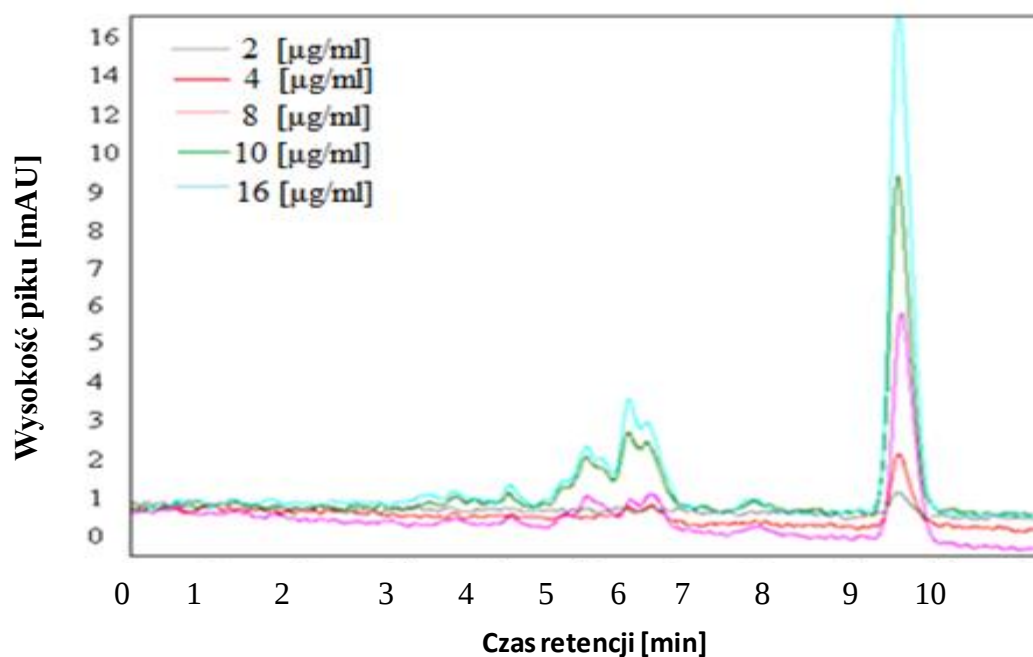
6.4.2. Oznaczanie likopenu

Na podstawie analizy wykonanej przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej sporządzono krzywą wzorcową likopenu (rys.42). Krzywa potwierdza szeroki zakres liniowości zastosowanej metody przy zachowaniu współczynnika korelacji równego 0,997. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, iż wydajność przedstawionej w części eksperymentalnej (5.3.1) metody ekstrakcji wynosiła 88,66%. Granica oznaczalności (LOQ) wynosiła 0,94 μ g/ml.



Rys. 42. Krzywa wzorcowa do oznaczania likopenu.

Na rys. 42 została przedstawiona krzywa wzorcowa zawartości likopenu rozpuszczonego w rozpuszczalniku (fazie ruchomej o składzie acetonitryl: dichlorometan: metanol (70:20:10 v/v)).



Rys. 43. Chromatogramy roztworów wzorcowych likopenu o różnych stężeniach.

Na chromatogramach zidentyfikowano piki pochodzące od likopenu (rys. 43), przy czasie retencji około 8,3 minut.

Tab. 28. Ułamek wagowy likopenu zawartego w badanych kremach komercyjnych.

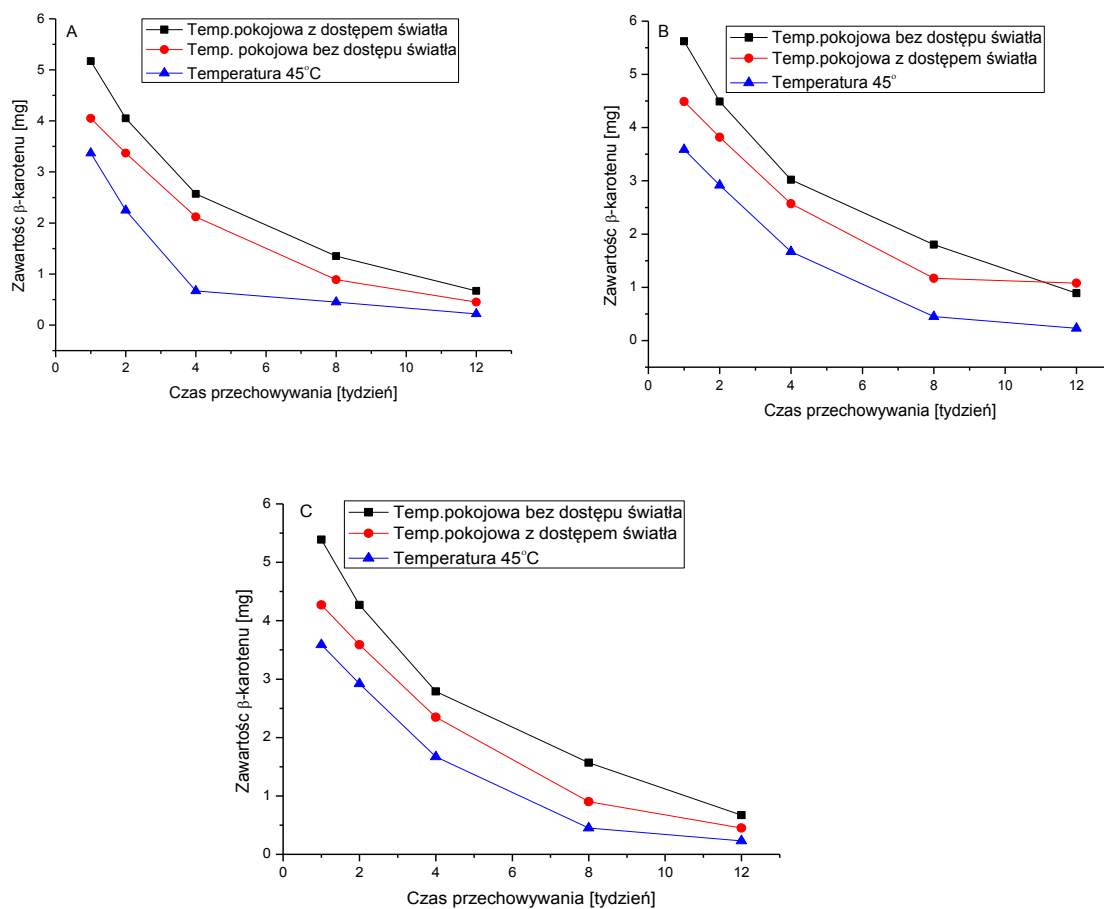
Nazwa kremu	Zawartość likopenu [mg] w 100g formulacji [±0,05]
AA ECO Pomidor	3,53
Eveline	4,04
Mincer	6,57

Za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej przeprowadzono badania mające na celu potwierdzenie zawartości likopenu w kremach komercyjnych. Analizy potwierdziły deklarowaną przez producentów obecność wyżej wymienionego karotenoidu w emulsjach. Porównano wartości czasów retencji (t_r) oraz widma absorpcji. Zawartość likopenu oznaczanego w kremach zestawionych w tabeli 28 wahała się w granicach 3,53 - 6,57 mg/100 g formulacji. Największą zawartością likopenu charakteryzował się krem Mincer, najmniejszą krem AA ECO Pomidor. Wszystkie kosmetyki zawierające likopen są emulsjami anti - aging. Formułacje te mają za zadanie opóźnienie procesów starzenia się skóry. Likopen dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym spełnia te wymagania i dlatego jest chętnie stosowany przez producentów w tego typu kosmetykach.

6.4.3. Oznaczanie stabilności β -karotenu oraz likopenu zawartych w samodzielnie przygotowanych formułacjach kosmetycznych

Badaniu stabilności poddano trzy typy emulsji: emulsję O/W przygotowaną na zimno, emulsję O/W sporządzoną na gorąco oraz emulsję typu W/O. Formułacje przechowywane były w różnych warunkach.

- formułacje kosmetyczne zawierające β -karoten



Rys. 44. Zmiany zawartości β -karotenu (na 100 g próbki) w zależności od czasu oraz od warunków przechowywania emulsji.

A: emulsja typu O/W przygotowana na zimno, **B:** emulsja typu O/W przygotowana na gorąco, **C:** emulsja typu W/O.

Tab. 29. Procentowy ubytek β -karotenu w różnych typach emulsji przechowywanych 100 dni w różnych warunkach. **A:** emulsja typu O/W przygotowana na zimno, **B:** emulsja typu O/W przygotowana na gorąco, **C:** emulsja typu W/O.

A

Procentowy ubytek β -karotenu [%] [$\pm 0,01$]			
Czas przechowywania [tydzień]	Temperatura pokojowa bez dostępu światła	Temperatura pokojowa z dostępem światła	Temperatura 45°C
0	0	0	0
1	7,26	25,91	36,96
2	25,91	36,96	44,39
4	50,17	57,60	65,02
8	70,30	80,69	99,56
12	82,18	85,31	99,77

B

Procentowy ubytek β -karotenu [%] [$\pm 0,01$]			
Czas przechowywania [tydzień]	Temperatura pokojowa bez dostępu światła	Temperatura pokojowa z dostępem światła	Temperatura 45°C
0	0	0	0
1	14,69	33,17	44,39
2	33,17	44,39	62,81
4	57,59	65,02	88,94
8	77,72	85,33	92,54
12	88,94	92,57	96,37

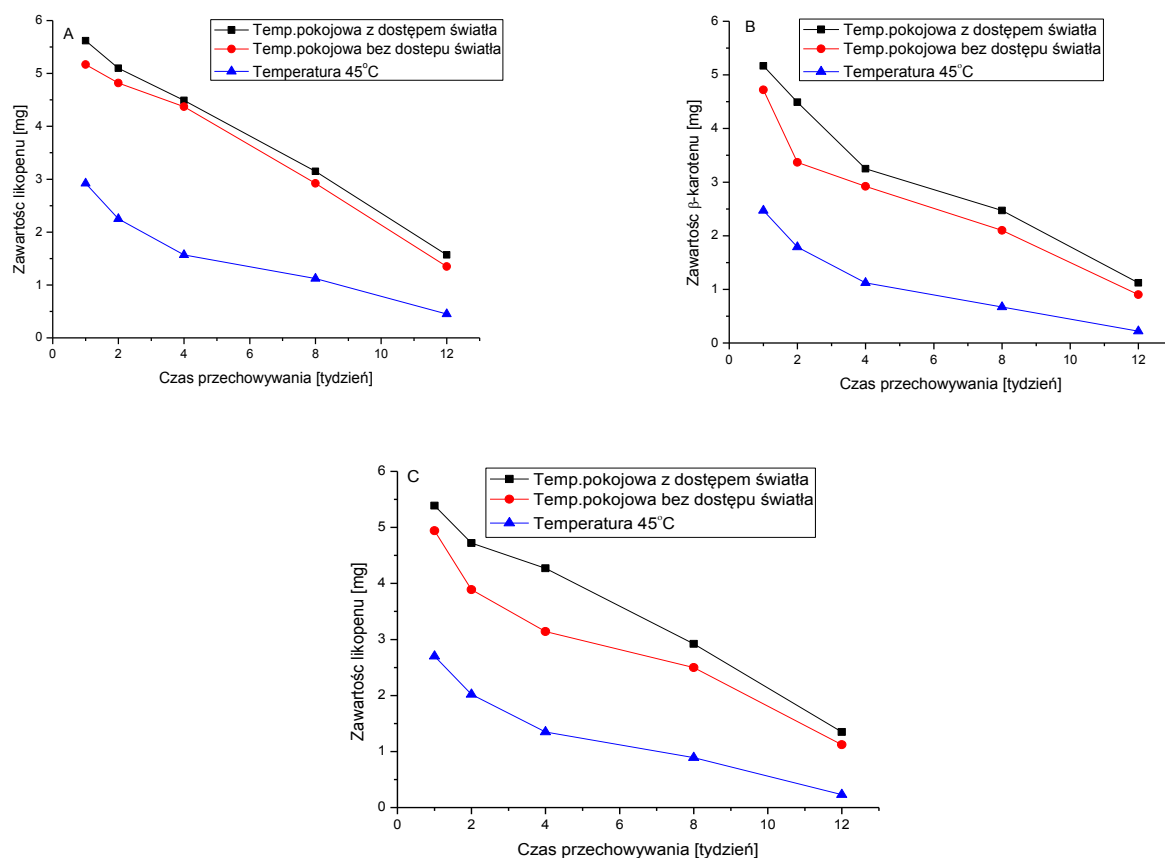
C

Procentowy ubytek β -karotenu [%] [$\pm 0,01$]			
Czas przechowywania [tydzień]	Temperatura pokojowa bez dostępu światła	Temperatura pokojowa z dostępem światła	Temperatura 45°C
0	0	0	0
1	11,06	29,54	40,76
2	29,54	40,76	51,86
4	53,97	61,21	72,44
8	74,09	85,15	92,58
12	88,94	92,58	96,21

Na podstawie przeprowadzonych badań można zaobserwować spadek ilości oznaczanego β -karotenu we wszystkich typach emulsji już po 1 tygodniu przechowywania w różnych warunkach (rys. 44, tab. 29). Związek ten najszybciej ulega destabilizacji w temperaturze 45°C, natomiast najwolniej w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. W tab. 27 przedstawiono procentowy ubytek β -karotenu w poszczególnych tygodniach. Karotenoidy łatwo ulegają utlenianiu ze względu na obecność wiązań podwójnych. W przypadku β -karotenu utlenianie pod wpływem tlenu molekularnego oraz wysokiej temperatury rozpoczyna się od nienasyconych wiązań w pierścieniu β -jononowym. Procesy te najpierw prowadzą do utraty właściwości prowitaminy A, następnie do izomeryzacji związku i zmiany zabarwienia. Końcowe produkty utlenienia β -karotenu charakteryzują się często

nieprzyjemnym zapachem. Reakcje utleniania karotenoidów mają charakter rodnikowy. Wyniki badań otrzymane w ramach pracy doktorskiej dotyczące nietrwałości β -karotenu, zawartego w formułacjach kosmetycznych, przechowywanych w wysokich temperaturach przy dostępie światła i obecności tlenu pozostają w zgodzie z obserwacjami przedstawionymi w dotychczas opublikowanych artykułach naukowych [331,332]. Wpływ na stabilność β -karotenu mają warunki przechowywania, zwłaszcza temperatura oraz dostęp światła. Im wyższa temperatura przechowywania preparatu tym spadek zawartości karotenoidu był większy. β -Karoten jest najbardziej stabilny w emulsji typu O/W przygotowanej na zimno. Większa trwałość karotenoidu w tej formułacji może wynikać również ze sposobu przygotowania emulsji. Jej preparatyka nie wymaga zastosowania wysokiej temperatury, dzięki czemu β -karoten jest bardziej stabilny.

- **formułacje kosmetyczne zawierające likopen**



Rys. 45. Zmiany zawartości likopenu w zależności od czasu oraz od warunków przechowywania emulsji. **A:** emulsja typu O/W przygotowana na zimno, **B:** emulsja typu O/W przygotowana na gorąco, **C:** emulsja typu W/O.

Tab. 30. Procentowa zawartość likopenu w różnych typach emulsji przechowywanych 100 dni w różnych warunkach. **A:** emulsja typu O/W przygotowana na zimno, **B:** emulsja typu O/W przygotowana na gorąco, **C:** emulsja typu W/O.

A

Procentowy ubytek likopenu [%] [±0,01]			
Czas przechowywania [tydzień]	Temperatura pokojowa bez dostępu światła	Temperatura pokojowa z dostępem światła	Temperatura 45°C
0	0	0	0
1	7,26	14,70	51,82
2	15,84	20,46	62,87
4	25,91	27,89	74,09
8	42,02	51,82	81,52
12	74,09	77,72	92,54

B

Procentowy ubytek likopenu [%] [±0,01]			
Czas przechowywania [tydzień]	Temperatura pokojowa bez dostępu światła	Temperatura pokojowa z dostępem światła	Temperatura 45°C
0	0	0	0
1	14,70	22,11	59,21
2	25,91	44,39	70,39
4	49,67	51,82	81,46
8	65,35	59,54	88,88
12	81,52	85,15	96,37

C

Procentowy ubytek likopenu [%] [±0,01]			
Czas przechowywania [tydzień]	Temperatura pokojowa bez dostępu światła	Temperatura pokojowa z dostępem światła	Temperatura 45°C
0	0	0	0
1	10,06	18,49	55,45
2	22,12	35,81	66,67
4	29,54	48,18	77,72
8	51,82	58,75	85,31
12	77,72	81,52	96,21

Stabilność likopenu zależy od jego struktury chemicznej, produktu kosmetycznego w jakim się znajduje, środowiska, głównie temperatury i czasu trwania procesu technologicznego, obecności światła, pH, tlenu oraz obecności metali ciężkich. Zrozumienie wpływu tych parametrów oraz dobór odpowiedniego procesu technologicznego gwarantują uzyskanie wysokiej jakości produktu finalnego o naturalnej barwie. Na podstawie badań stabilności likopenu można wysunąć wnioski, że ulega on degradacji w obecności tlenu oraz w podwyższonej temperaturze (rys. 45) [332]. Wnioski te zostały wcześniej sformułowane przez Lee i Chena [333], którzy określili wpływ ogrzewania i naświetlania likopenu na jego

stabilność. Wykazali, że degradacja karotenoidu miała charakter reakcji pierwszego rzędu zarówno w przypadku zastosowania podwyższonej temperatury, jak i naświetlania w temperaturze pokojowej. Likopen występuje w 95% w postaci formy trans, natomiast poddany ekspozycji na światło i podwyższonej temperatury lub w wyniku reakcji chemicznych może ulec izomeryzacji optycznej do formy cis. Na podstawie tab. 30 potwierdzono procentowy spadek zawartości likopenu we wszystkich typach emulsji pod wpływem działania tlenu oraz temperatury 45°C [334]. W znacznych ilościach powstaje apo-8'-likopenal, apo-6'-likopenal oraz apo-12'-likopenal, a w mniejszych apo-10'-likopenal oraz apo-14'-likopenal [335]. Rzadko dochodzi do rozpadu wiązania podwójnego C15-C15' [335]. Niesprężone wiązania podwójne znajdujące się przy końcach cząsteczki nie ulegają utlenianiu. Aby podwyższyć stabilność emulsji zawierających likopen zalecane jest przechowywanie produktów w ciemnych naczyniach lub zaciemnionych pomieszczeniach [335].

Likopen jest najbardziej stabilny, podobnie jak β -karoten w emulsji typu O/W przygotowanej na zimno. Karotenoidy charakteryzują się stałym spadkiem ilości w trakcie trwania badania.

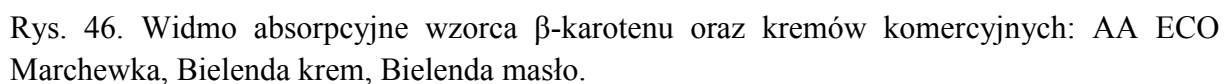
6.5. Analiza jakościowa karotenoidów zawartych w komercyjnych kremach metodą spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-IR)

Przy użyciu spektrometru FTIR wykonano widma kremów komercyjnych zawierających β -karoten, likopen oraz astaksantynę, jak również widma wzorców wybranych karotenoidów. Podjęto próbę identyfikacji badanych związków w kremach komercyjnych porównując ich widma z widmami odpowiednich wzorców. Widma ATR-IR są bardzo złożone i rzadko zdarza się, aby dwie różne próbki miały w całym zakresie długości fali identyczne pasma. Położenie pasm na widmie w podczerwieni określa się liczbami falowymi, których jednostką jest odwrotność centymetra (cm^{-1}). Intensywność pasm wyraża się natomiast jako absorbancję. Ze względu na to, że niektóre pasma pochodzące od związków organicznych mogą się nakładać, bardzo często interpretacja widm jest utrudniona. Dużą zaletą tej metody analitycznej jest szybkość wykonania badania, oszczędność czasu i zużycia materiału, a co za tym idzie obniżenie kosztów.

- **formulacje kosmetyczne zawierające β -karoten**

Widmo wzorca β -karotenu przedstawiono na rys. 46. Zaobserwowano obecność intensywnych pasm absorpcji w zakresie 1390-1367 oraz 1481-1453 cm^{-1} pochodzących od drgań zginających C-H (tab. 31). Na widmach można zauważyć również obecność intensywnych pasm absorpcji w zakresie 3034-3020 cm^{-1} , pochodzących od drgań rozciągających C-H [336-340]. Zaobserwowano intensywne pasma absorpcji w zakresie 1671-1618 cm^{-1} pochodzące od drgań rozciągających C=C. Pasma w zakresie 967-887 cm^{-1}

Widma kremów AA ECO Marchewka, Bielenda krem oraz Bielenda masło przedstawiono również na rysunku 46. W tabeli 31 B, C, D zestawiono liczby falowe przy jakich występują pasma pochodzące od związków znajdujących się w składzie kremów. Widma badanych kremów posiadają charakterystyczne dla β -karotenu pasma odpowiadające drganiom zginającym C=C, niestety inne związki wchodzące w skład powyższych kremów również charakteryzują się pasmami odpowiadającymi drganiom zginającym C=C. Do tych związków należą np. octan tokoferolu oraz palmitynian askorbylu. Dlatego jednoznaczna interpretacja jest niemożliwa. Zaobserwowano również obecność intensywnego pasma absorpcji w zakresie $1747-1752\text{ cm}^{-1}$ pochodzącego od drgań rozciągających C=O oraz pasma absorpcji w zakresie $2859-2863\text{ cm}^{-1}$, przypisywanego drganiom rozciągającym C-H [342,343].



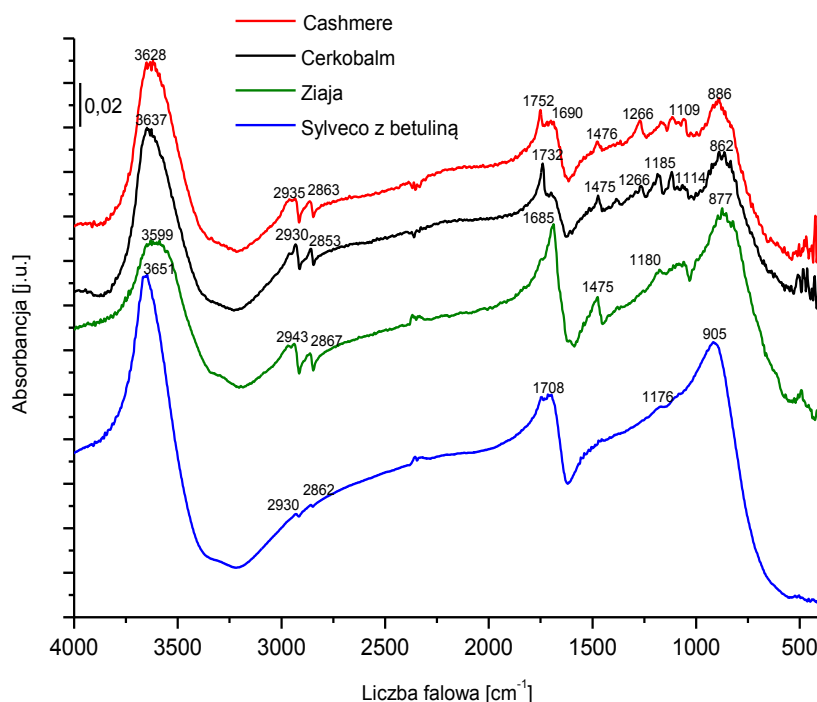
Tab. 31. Położenie pasm absorpcyjnych ATR-IR dla **A**: wzorca β -karotenu oraz **B**: kremów komercyjnych AA ECO Marchewka, **C**: Bielenda krem, **D**: Bielenda masło.

A

Liczba falowa [cm^{-1}]	Rodzaj wiązania	Typ drgania
3034	$=\text{Csp}^2\text{-H}$	Rozciągające
2948	$\text{Csp}^3\text{-H}(-\text{CH}_3)$	Rozciągające, asymetryczne
2915	$\text{Csp}^3\text{-H}(-\text{CH}_2-)$	Rozciągające, asymetryczne
2862	$\text{Csp}^3\text{-H}(-\text{CH}_3)$	Rozciągające, symetryczne
2821	$\text{Csp}^3\text{-H}(-\text{CH}_2-)$	Rozciągające, symetryczne
1671	$\text{Csp}^2=\text{C}$	Rozciągające
1618	$\text{Csp}^2=\text{C}$	Rozciągające
1481	$\text{Csp}^3\text{-H}$	Zginające
1453	$\text{Csp}^3\text{-H}$	Zginające
1390	$\text{Csp}^3\text{-H}$	Zginające
1367	$\text{Csp}^3\text{-H}$	Zginające
967	$\text{C}=\text{C}$	Zginające
901	$\text{C}=\text{CH}_2$	Zginające
887	$\text{C}=\text{C}$	Zginające

B, C, D

Liczba falowa [cm^{-1}]	Rodzaj wiązania	Typ drgania
3638-3652	O-H (grupa hydroksylowa)	Rozciągające
2930-2935	$\text{Csp}^3\text{-H}$	Rozciągające, asymetryczne
2859-2863	$\text{Csp}^3\text{-H}$	Rozciągające, symetryczne
1747-1752	$\text{C}=\text{O}$	Rozciągające
1685-1690	$\text{C sp}^2=\text{C}$	Rozciągające
1471-1476	$\text{Csp}^3\text{-H}$	Zginające
1253-1277	C-O (grupa acylowa)	Rozciągające
1058-1120	C-O (grupa alkoksy)	Rozciągające
863-887	$\text{C}=\text{C}$	Zginające

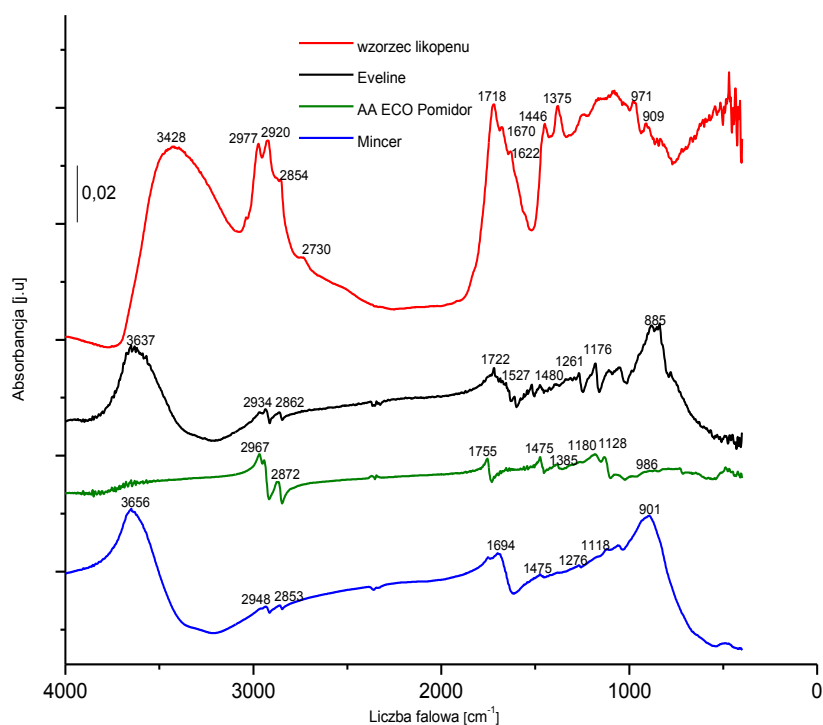


Rys. 47. Widmo absorpcyjne kremów komercyjnych: Cashmere, Cerkobalm, Ziaja, Sylveco z betuliną).

Widma kremów Cashmere, Cerkobalm, Ziaja, Sylveco z betuliną przedstawiono na rys.47. Posiadają one charakterystyczne dla β -karotenu oraz innych związków pasma odpowiadające drganiom zginającym C=C. Z tego powodu jednoznaczna interpretacja jest również niemożliwa. Kremy charakteryzują się podobną intensywnością pasm odpowiadającym drganiom zginającym C=C. W porównaniu do wzorca intensywność pasm odpowiadającym drganiom zginającym C=C jest zdecydowanie mniejsza.

- **formulacje kosmetyczne zawierające likopen**

Widmo wzorca likopenu przedstawiono na rys. 48. Zaobserwowano obecność intensywnych pasm absorpcji w zakresie liczby falowej 2977-2920, 2849-2730 cm^{-1} pochodzących od drgań rozciągających C-H, 1375-1332 oraz 1446-1442 cm^{-1} pochodzących od drgań zginających C-H. Pasma w zakresie 1670- 1622, 971-909 cm^{-1} świadczy o obecności drgań zginających C=C charakterystycznych dla związków takich jak karotenoidy[344]. Widma kremów: Eveline (Koenzymy Młodości Q10 plus R), AA ECO Pomidor, Mincer Pharma (Eco Innovation) przedstawiono na rys. 48. Posiadają one charakterystyczne dla likopenu pasma odpowiadające drganiom zginającym C=C, niestety w preparatach znajdują się również inne składniki, zawierające w swojej strukturze wiązania podwójne C=C. Z tego powodu jednoznaczna analiza jest niemożliwa [343].



Rys. 48. Widma absorpcyjne wzorca likopenu oraz kremów komercyjnych: Eveline, AA ECO Pomidor, Mincer.

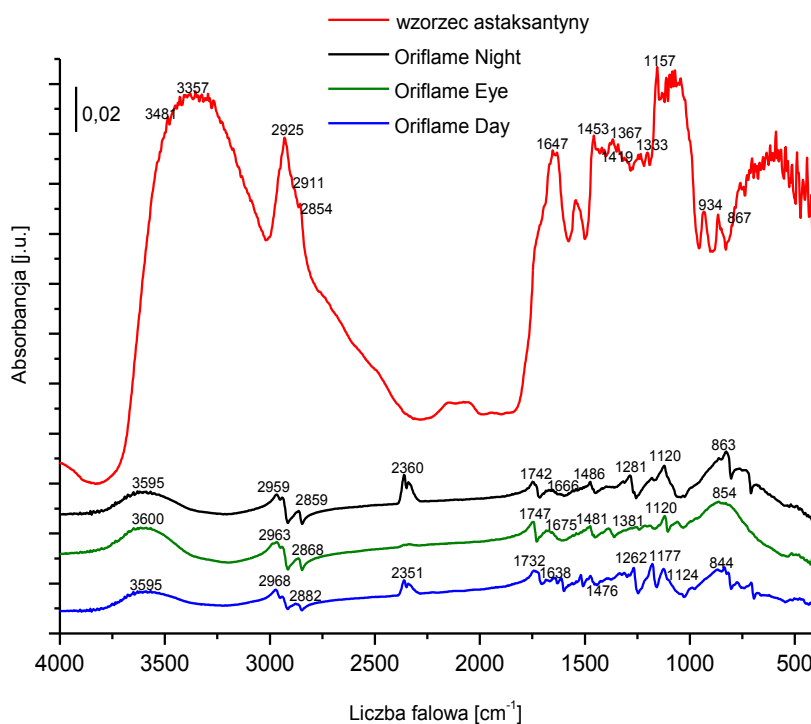
Tab. 32. Położenie pasm absorpcyjnych ATR-IR dla wzorca likopenu.

Liczba falowa [cm^{-1}]	Rodzaj wiązania	Typ drgania
2977	$\text{Csp}^3\text{-H}(-\text{CH}_3)$	Rozciągające, asymetryczne
2920	$\text{Csp}^3\text{-H}(-\text{CH}_2-)$	Rozciągające, asymetryczne
2854	$\text{Csp}^3\text{-H}(-\text{CH}_3)$	Rozciągające, symetryczne
2730	$\text{Csp}^3\text{-H}(-\text{CH})$	Rozciągające, symetryczne
1718	$\text{C sp}^2=\text{C}$	Rozciągające
1670	$\text{C sp}^2=\text{C}$	Rozciągające
1622	$\text{C sp}^2=\text{C}$	Rozciągające
1446	$\text{Csp}^3\text{-H}$	Zginające
1375	$\text{Csp}^3\text{-H}$	Zginające
971	$\text{C}=\text{C}$	Zginające
909	$\text{C}=\text{C}$	Zginające

- formulacje kosmetyczne zawierające astaksantynę**

Wzorzec astaksantyny przedstawiony został na rys. 49. Zaobserwowano pasmo absorpcyjne w zakresie $3481\text{-}3357\text{ cm}^{-1}$ pochodzące od drgań rozciągających O-H. W zakresie liczby falowej $2911\text{-}2854\text{ cm}^{-1}$ zaobserwowano pasmo absorpcji świadczące o występowaniu drgań rozciągających C-H. Stwierdzono obecność intensywnych pasm absorpcji w zakresie $1367\text{-}1333$ oraz $1453\text{-}1419\text{ cm}^{-1}$ pochodzących od drgań zginających C-H. Pasma w zakresie $934\text{-}867\text{ cm}^{-1}$ świadczą o obecności drgań zginających $\text{C}=\text{C}$ [336-343]. Widma kremów Oriflame Day, Oriflame Eye, Oriflame Night zostały przedstawione na rys. 49. Zaobserwowano pasmo absorpcji w zakresie $3595\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ pochodzące od drgań

rozciągających O-H. W zakresie 1732-1747 cm^{-1} występują pasma pochodzące od drgań rozciągających C=O. Kremy te posiadają charakterystyczne dla astaksantyny oraz innych składników wchodzących w skład tych preparatów pasma odpowiadające drganiom zginającym C=C. Z tego powodu jednoznaczna analiza jest niemożliwa [342].



Rys. 49. Widmo absorpcyjne wzorca astaksantyny oraz kremów komercyjnych: Oriflame Day, Oriflame Eye, Oriflame Night.

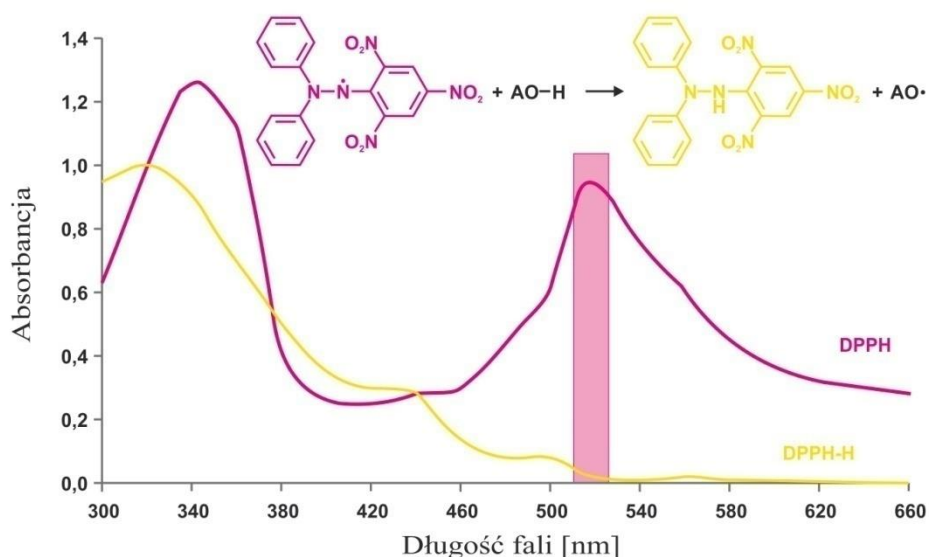
Tab. 33. Położenie pasm absorpcyjnych ATR-IR dla wzorca astaksantyny.

Liczba falowa [cm^{-1}]	Rodzaj wiązania	Typ drgania
3481	O-H (grupa hydroksylowa)	Rozciągające
3357	O-H (grupa hydroksylowa)	Rozciągające
2925	Csp ³ -H(-CH ₃)	Rozciągające, asymetryczne
2911	Csp ³ -H (-CH ₂ -)	Rozciągające, asymetryczne
2854	Csp ³ -H (-CH ₃)	Rozciągające, symetryczne
1647	C sp ² =C	Rozciągające
1453	Csp ³ -H	Zginające
1419	Csp ³ -H	Zginające
1367	Csp ³ -H	Zginające
1333	Csp ³ -H	Zginające
1157	C=O	Rozciągające
934	C=C	Zginające
867	C=C	Zginające

6.6. Pomiar zdolności wygaszania wolnego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu przez karotenoidy zawarte w kremach komercyjnych oraz samodzielnie przygotowanych

6.6.1. Pomiar zdolności wygaszania wolnego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu przez karotenoidy zawarte w samodzielnie przygotowanych emulsjach kosmetycznych typu O/W, W/O oraz O/W na zimno

Aktywność antyoksydacyjną β -karotenu zawartego w kremach komercyjnych oznaczano według zmodyfikowanej metody Branda-Williamsa i wsp. [304] zużyciem syntetycznego rodnika DPPH $\cdot$ (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu - rys. 50).



Rys. 50. Struktura chemiczna rodnika DPPH $\cdot$ oraz widma UV-Vis przed i po reakcji z substancją przeciwutleniającą [344].

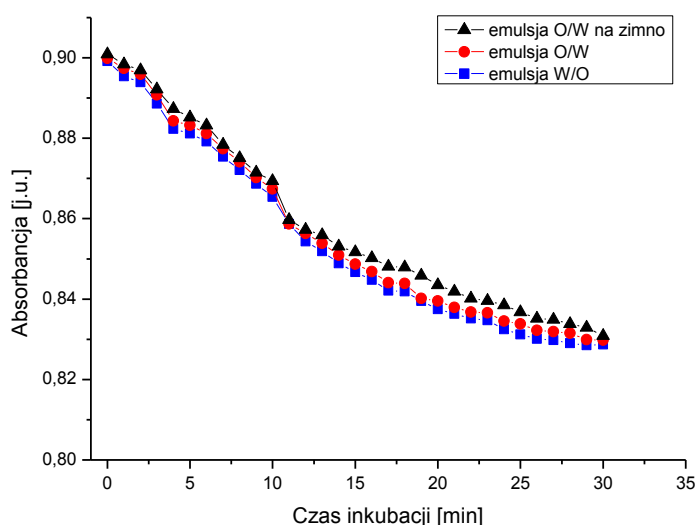
Redukcja przeprowadzona została za pomocą stabilnego rodnika azotowego powodującego spadek absorbancji karotenoidów, które wchodziły w skład badanej próbki. Rodnik DPPH $\cdot$ w roztworach przybrał barwę purpurową, która uległa zmianie w wyniku jego reakcji z karotenoidami. Stopień zmiany barwy roztworu DPPH $\cdot$ po dodaniu do niego roztworu zawierającego karotenoidy jest miarą ich zdolności do zmiatania wolnych rodników. Absorbancję roztworu mierzono przy długości fali $\lambda=517$ nm. Rodnik DPPH $\cdot$ w reakcji z substancją, która może oddać wodór tworzy formę zredukowaną DPPH-H, jaka powstaje w roztworze i jest miarą zdolności przeciwutleniaczy do neutralizacji wolnych rodników.

- **formulacje zawierające β -karoten**

Wyniki testu z zastosowaniem rodnika DPPH[•] dla próbek zawierających β -karoten, który został z nich wyekstrahowany przedstawione zostały za pomocą procentu wygaszania wolnych rodników obliczonego zgodnie ze wzorem przedstawionym w rozdziale 6.5. Najwyższym % inhibicji (tab. 34) charakteryzowała się emulsja typu O/W na zimno - 55,33%, najniższym emulsja typu O/W przygotowana na gorąco - 55,28%. Wyniki te są zbliżone, ponieważ kremy zawierały taką samą ilość β -karotenu - 6 mg/100 g formulacji. Nie zaobserwowano wpływu rodzaju formulacji na aktywność antyoksydacyjną β -karotenu.

Tab. 34. Aktywność antyoksydacyjna β -karotenu wyekstrahowanego z samodzielnie przygotowanych kremów.

Rodzaj emulsji	% Inhibicji [$\pm 0,01$]
Emulsja O/W na zimno	55,33
Emulsja O/W	55,20
Emulsja W/O	55,28



Rys. 51. Pomiar zdolności antyoksydacyjnej β -karotenu wyekstrahowanego z samodzielnie przygotowanych kremów.

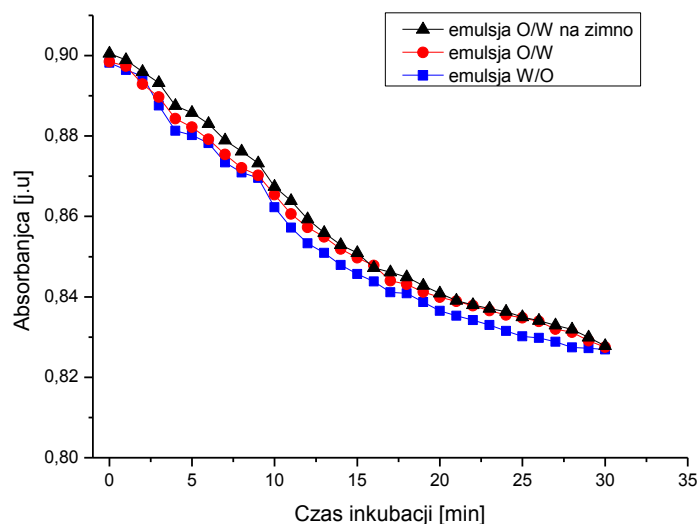
Im silniejsze są właściwości przeciwutleniające danej próbki, tym spadek absorbancji odzwierciedlający redukcję rodnika DPPH[•] jest większy (rys. 51).

- **formulacje kosmetyczne zawierające likopen**

Na podstawie tab. 35 wysunięto wniosek, że niezależnie od typu emulsji, do której został wprowadzony likopen, % inhibicji jest porównywalny. Wynika to z takich samych ilości likopenu dodanych do samodzielnie przygotowanych formulacji kosmetycznych różnego typu.

Tab. 35. Aktywność antyoksydacyjna likopenu wyekstrahowanego z samodzielnie przygotowanych kremów.

Rodzaj emulsji	% Inhibicji [$\pm 0,01$]
Emulsja O/W na zimno	55,42
Emulsja O/W	55,38
Emulsja WO	55,39



Rys. 52. Pomiar zdolności antyoksydacyjnej likopenu wyekstrahowanego z samodzielnie przygotowanych kremów.

Likopen, przejawia wyższe właściwości przeciwutleniające aniżeli β -karoten, co związane jest z jego budową. Karotenoid ten jest nienasyconym węglowodorem polienowym, zbudowanym z 40 atomów węgla, zawiera 11 sprzężonych i 2 niesprężone podwójne wiązania. Oba pierścienie jononowe są otwarte, przez co likopen nie ma właściwości prowitaminy A, czym różni się od β -karotenu. Im silniejsze są właściwości przeciwutleniające badanej próbki, tym spadek absorbancji przedstawiający redukcję rodnika DPPH $^{\bullet}$ jest większy (rys. 52).

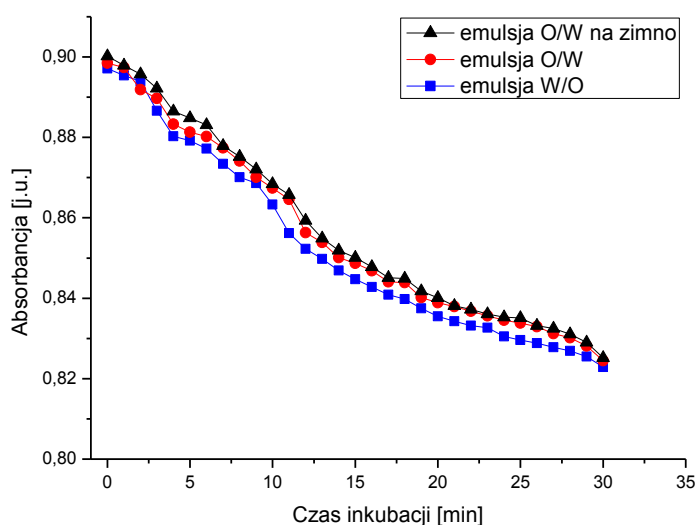
- formulacje kosmetyczne zawierające astaksantynę**

Na podstawie tab. 36 potwierdzono, że typ emulsji nie wpływa na % inhibicji. Procent ten jest porównywalny dla wszystkich zbadanych próbek. Wynika to z faktu, że do wszystkich samodzielnie przygotowanych emulsji różnego typu dodano tę samą ilość astaksantyny. Zauważono zależność, że im silniejszymi właściwościami przeciwutleniającymi charakteryzuje się analizowany karotenoid, tym spadek absorbancji potwierdzający redukcję rodnika DPPH $^{\bullet}$ jest większy (rys. 53).

Najwyższym % inhibicji charakteryzowała się emulsja typu O/W przygotowana na zimno - 55,58%. Natomiast najniższym % inhibicji charakteryzuje się emulsja typu O/W - 55,51%.

Tab. 36. Aktywność antyoksydacyjna astaksantyny wyekstrahowanej z samodzielnie przygotowanych kremów.

Rodzaj emulsji	% Inhibicji [$\pm 0,01$]
Emulsja O/W na zimno	55,58
Emulsja O/W	55,51
Emulsja W/O	55,52



Rys. 53. Aktywność antyoksydacyjna astaksantyny wyekstrahowanej z samodzielnie przygotowanych kremów.

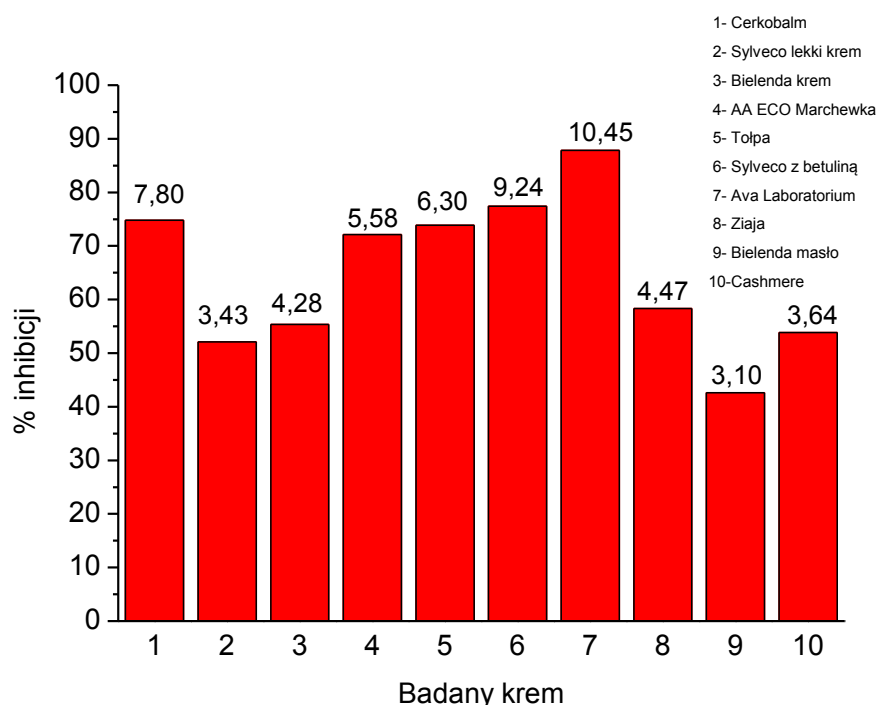
Roztwory alkoholowe zawierające badane karotenoidy podczas trwania reakcji z roztworem zawierającym rodnik DPPH[•] powodują zmianę jego barwy z purpurowej na żółtą, co świadczy o zdolności karotenoidów do zmiatania wolnych rodników.

Loft i wsp. [345] stwierdzili, że astaksantyna jest silniejszym przeciwutleniaczem niż inne karotenoidy w tym β -karoten oraz likopen. W swojej strukturze chemicznej posiada dwie grupy hydroksylowe oraz dwie grupy karbonylowe przy każdym z pierścieni w cząsteczce. Budowa taka nadaje jej polarność i związane z tym unikatowe właściwości takie jak zdolność do estryfikacji, powinowactwo do fosfolipidów oraz wyższą aktywność antyoksydacyjną. Jej wyższa od innych związków skuteczność wynika również z faktu, że wbudowuje się ona w poprzek błony komórkowej chroniąc jej strukturę z obydwu stron. Wysokość % inhibicji może być związana ze sposobem i temperaturą przygotowania emulsji zawierającej karotenoidy, którą następnie poddaje się ekstrakcji w celu wyodrębnienia badanych związków. Lepszą zdolnością antyoksydacyjną charakteryzują się karotenoidy, wyodrębnione z kosmetyków przygotowanych w niższej temperaturze [346].

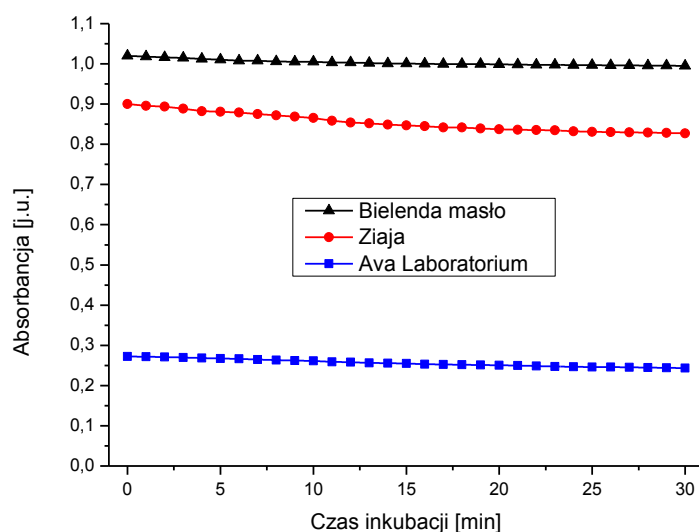
6.6.2. Pomiar zdolności wygaszania wolnego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu przez karotenoidy zawarte w komercyjnych kremach

- kremy zawierające β -karoten

Na poniższym wykresie zaobserwowano wzrost % inhibicji wraz ze wzrostem zawartości β -karotenu w oznaczanych kremach komercyjnych (rys. 54). Dla kremu Ava Laboratorium % inhibicji wynosił 86% i była to najwyższa wartość ze wszystkich badanych kremów komercyjnych. Preparat ten zawiera 10,45 mg β -karotenu. Dla kremu Bielenda masło % inhibicji wyniósł 46% i jest to najniższa wartość spośród wszystkich badanych kremów komercyjnych. Równocześnie zawartość β -karotenu w tym kremie wynosi 3,10 mg/100 g formulacji. Podsumowując najsilniejszymi właściwościami przeciwutleniającymi charakteryzował się krem Ava Laboratorium, natomiast najniższymi krem Bielenda masło.



Rys. 54. Aktywność antyoksydacyjna β -karotenu wyekstrahowanego z kremów komercyjnych. Nad słupkami podano zawartość β -karotenu w mg/100 g produktu.

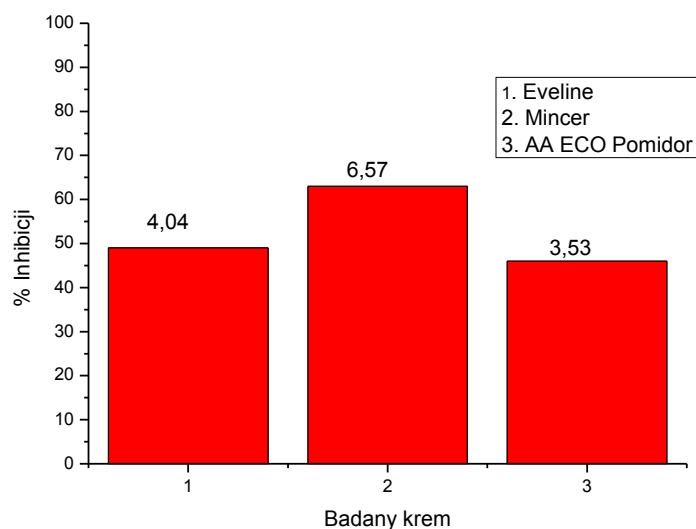


Rys. 55. Pomiar zdolności antyoksydacyjnej β -karotenu wyekstrahowanego z kremów komercyjnych.

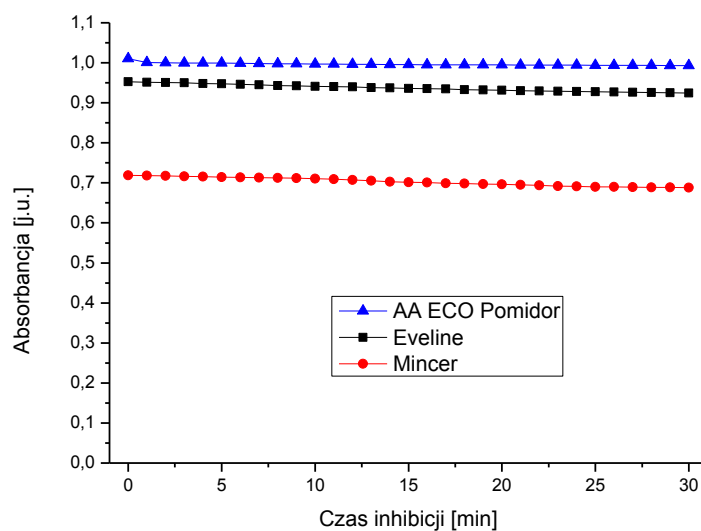
Do próbek, w których znajdował się alkoholowy roztwór DPPH dodano ekstrakt zawierający β -karoten. Po dokonaniu pomiaru absorbancji zauważono niewielki spadek tej wielkości dla badanych próbek. Wynika to z faktu, że β -karoten, który pełni rolę silnego antyoksydantu przerywa reakcję rodnikową przez przekazanie rodników atomów wodoru lub elektronów, co prowadzi do powstania związków o większej stabilności (rys. 55) [88].

- **kremy zawierające likopen**

Zaobserwowano zależność zdolności eliminowania rodnika DPPH $\bullet$ od zawartości likopenu w oznaczanych kremach komercyjnych (rys.56). Najwyższą zdolnością wygaszania wolnego rodnika charakteryzował się likopen wyekstrahowany z kremu Mincer (63%). Z kolei najniższą zdolnością antyoksydacyjną charakteryzuje się likopen wyekstrahowany z kremu AA ECO Pomidor (46%).



Rys. 56. Aktywność antyoksydacyjna likopenu wyekstrahowanego z kremów komercyjnych. Nad słupkami podano zawartość likopenu w mg/100 g produktu.



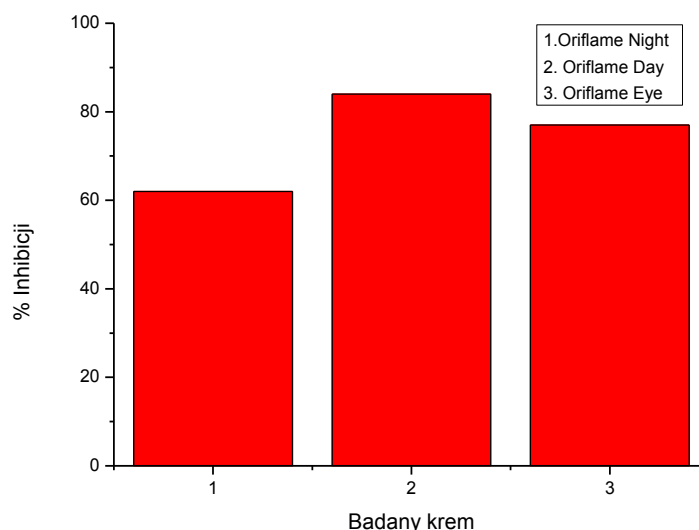
Rys. 57. Pomiar zdolności antyoksydacyjnej likopenu wyekstrahowanego z kremów komercyjnych.

Użycie rodnika DPPH[•] spowodowało spadek absorbancji badanych próbek (rys. 57).

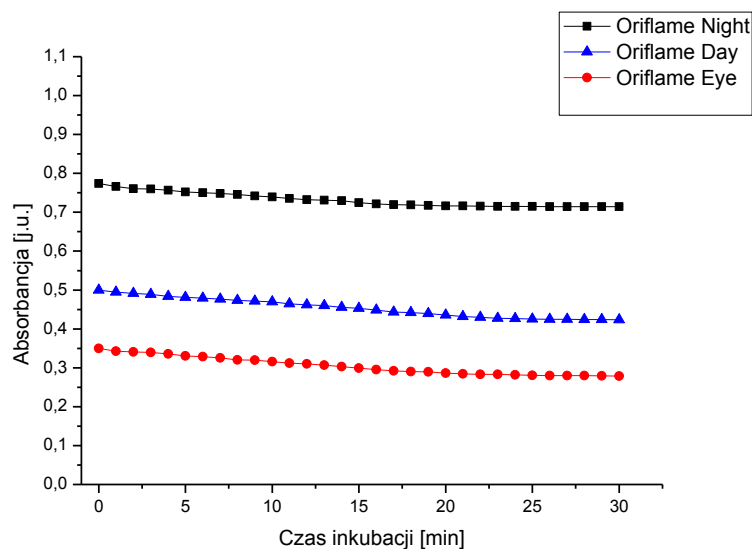
Zdolność wygaszania rodnika DPPH[•] przez badane karotenoidy może być związana z reakcjami do jakich dochodzi między tymi związkami, a innymi biologicznie czynnymi składnikami charakteryzującymi się właściwościami antyoksydacyjnymi. Do reakcji tych może dojść przed przystąpieniem do ekstrakcji karotenoidów. Może również zależeć od sposobu i temperatury przygotowania próbki oraz od sposobu ekstrakcji [347].

- kremy zawierające astaksantynę

Na rys. 58 oraz 59 potwierdzono wcześniejszą tendencję, udowadniającą wysoką zdolność antyoksydacyjną karotenoidów w tym astaksantyny zawartej w różnych formułacjach kosmetycznych. Zdolność ta może zależeć od zawartości składników tłuszczowych w badanych emulsjach, w których znajdują się karotenoidy przed przeprowadzeniem ekstrakcji [347].



Rys. 58. Aktywność antyoksydacyjna astaksantyny wyekstrahowanej z kremów komercyjnych.



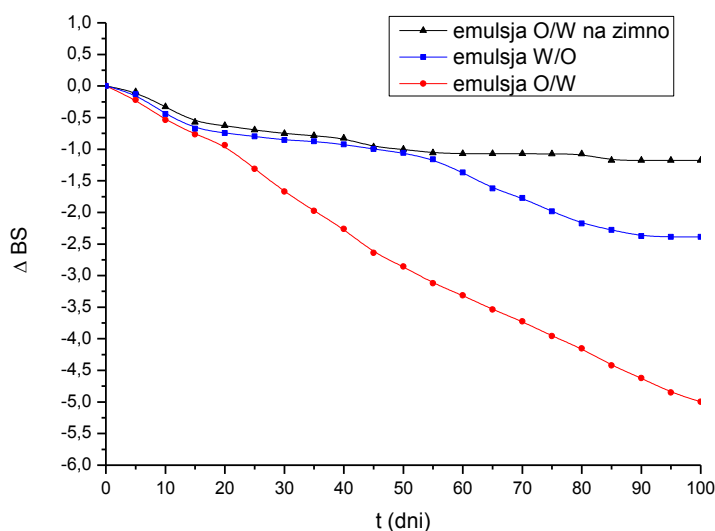
Rys. 59. Pomiar zdolności antyoksydacyjnej astaksantyny wyekstrahowanej z kremów komercyjnych.

6.7. Pomiar stabilności emulsji kosmetycznych zawierających karotenoidy metodą wielokrotnego rozpraszania światła

Pomiary intensywności wstecznie rozpraszanego światła pozwalają śledzić stabilność emulsji w takiej formie jakiej została ona przygotowana bez jej rozcieńczania. Intensywność światła wstecznie rozpraszanego zależy od wielkości cząstek, objętości frakcji rozproszonej oraz różnicy współczynnika załamania światła fazy ciągłej i rozproszonej.

- **formulacje kosmetyczne zawierające β -karoten**

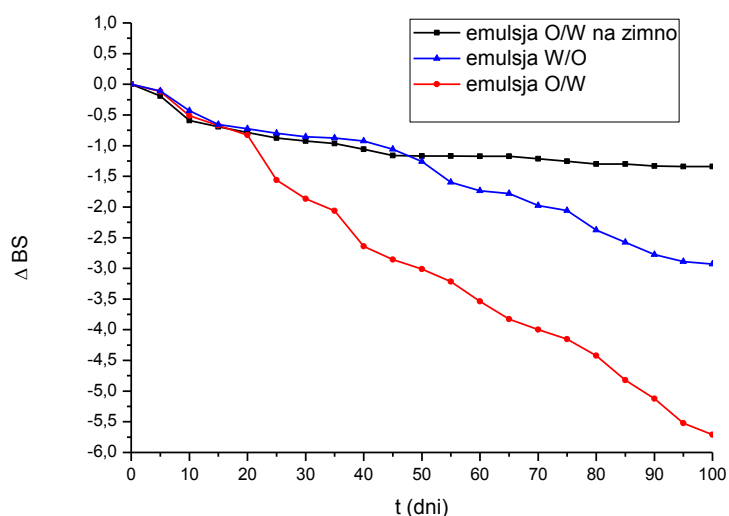
Badane próbki są emulsjami nieprzezroczystymi, dlatego też na całej wysokości fiolki zachodzi zjawisko rozproszenia wstecznego (BS). Aby móc porównać wyniki otrzymane dla badanych preparatów kosmetycznych wprowadzono parametr ΔBS , który określa różnice rozproszenia światła pomiędzy pomiarem odniesienia a pomiarem charakteryzującym się największymi zmianami w czasie.



Rys. 60. Profile ΔBS emulsji zawierających β -karoten przechowywanych w temperaturze pokojowej bez dostępu światła.

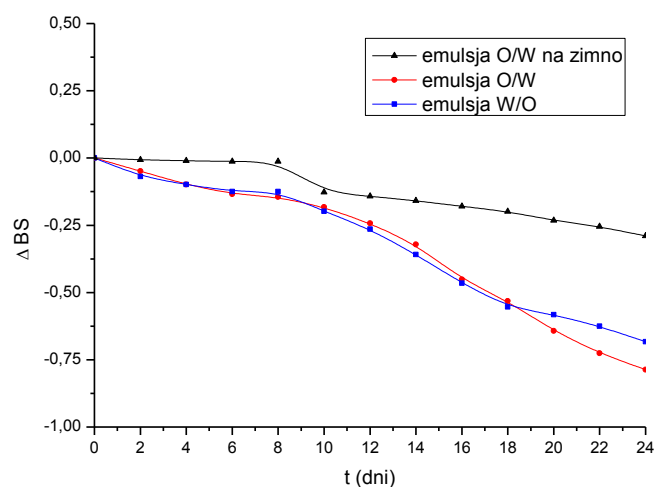
Na rys. 60 można zaobserwować, że wraz z upływem czasu przechowywania emulsji postępuje zjawisko flokulacji, czyli agregacji cząstek. Zmiany wstecznego rozproszenia osiągnęły następujące wartości dla emulsji O/W na zimno -1,00%, dla emulsji O/W -5,00% oraz dla emulsji W/O -2,5 % i nie uległy dalszemu pogłębieniu. Zmiany wartości wstecznego rozproszenia świadczą o niewielkiej niestabilności emulsji (występuje zjawisko flokulacji), mieści się ona w granicach normy (-10%). Emulsja O/W przygotowana na zimno wykazała się najmniejszymi zmianami wartości wstecznego rozproszenia -1,00%. Jest to spowodowane składem i sposobem przygotowania emulsji. Emulsja przygotowana na zimno z udziałem koemulgatora, utrzymującego możliwie najniższe napięcie międzyfazowe charakteryzuje się największą stabilnością. Badania wykazały, że najmniej stabilnym typem emulsji jest emulsja

typu O/W przygotowana na gorąco, ponieważ wykazuje największe odchylenia od pomiaru referencyjnego (ΔBS).



Rys. 61. Profile ΔBS emulsji zawierających β -karoten przechowywanych w temperaturze pokojowej z dostępem światła.

Na rys. 61 zaobserwowano, że zmiany wartości wstecznego rozproszenia światła osiągnęły wartości dla emulsji O/W na zimno -1,25%, dla emulsji O/W -5,5% oraz dla emulsji W/O -2,75 %. Badania wykazały, że najmniej stabilnym typem emulsji jest emulsja typu O/W, ponieważ również cechuje się największym odchyleniem od pomiaru referencyjnego (ΔBS). Wszystkie typy emulsji są bardziej stabilne w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Na stabilność preparatów z β -karotenem negatywnie wpływa wysoka temperatura, dostęp światła i obecność tlenu [331].

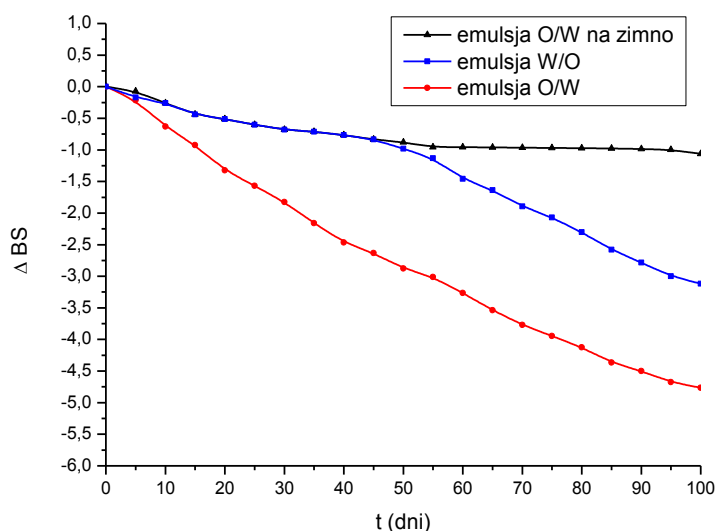


Rys. 62. Profile ΔBS , emulsji zawierających β -karoten przechowywanych w temperaturze 45°C.

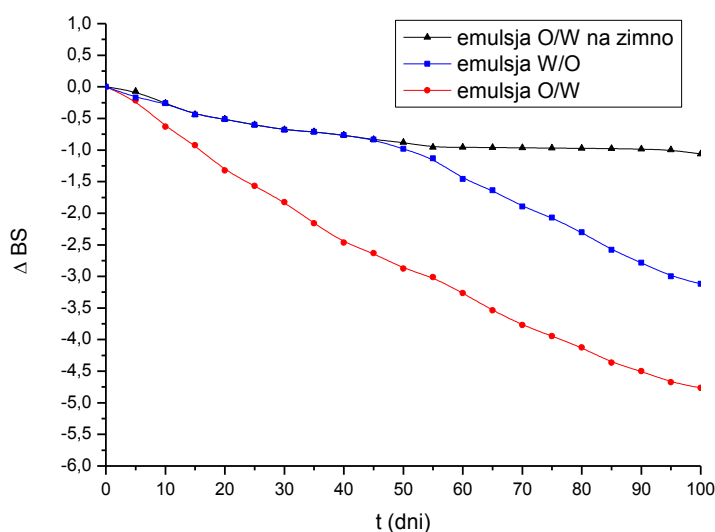
Przeprowadzono przyspieszony test starzeniowy. Test przeprowadzony w podwyższonej temperaturze (45°C) przez 24h wykazał (rys. 62), że najbardziej stabilną spośród przygotowanych formułacji jest emulsja O/W sporządzona na zimno, ponieważ wykazuje najmniejsze odchylenie od wyników pomiaru odniesienia, czyli charakteryzuje się najmniejszą wartością ΔBS (-0,25%). Dla wszystkich trzech rodzajów emulsji ΔBS jest niższe w temperaturze pokojowej niż w temperaturze 45°C. Wynika to z faktu, że pomiary przyspieszonego testu starzenia przeprowadzono po upływie 100 dni od wykonania preparatów, które w tym czasie osiągnęły stan stabilny. Może to również wynikać ze zmiany siły oddziaływań van der Waalsa w wysokiej temperaturze. Temperatura ta jest główną przyczyną powstawania zjawiska flokulacji w emulsjach.

- **formulacje kosmetyczne zawierające likopen**

Na rys. 63 możemy zaobserwować, że wraz z upływem czasu przechowywania emulsji postępuje zjawisko flokulacji. Zmiana wstecznego rozproszenia światła dla emulsji O/W przygotowanej na zimno wyniosła -1,00%, dla emulsji O/W -4,75%, natomiast dla emulsji W/O -3,5 % i nie uległa dalszemu pogłębieniu. Emulsja O/W na zimno jest najbardziej stabilną z badanych emulsji.

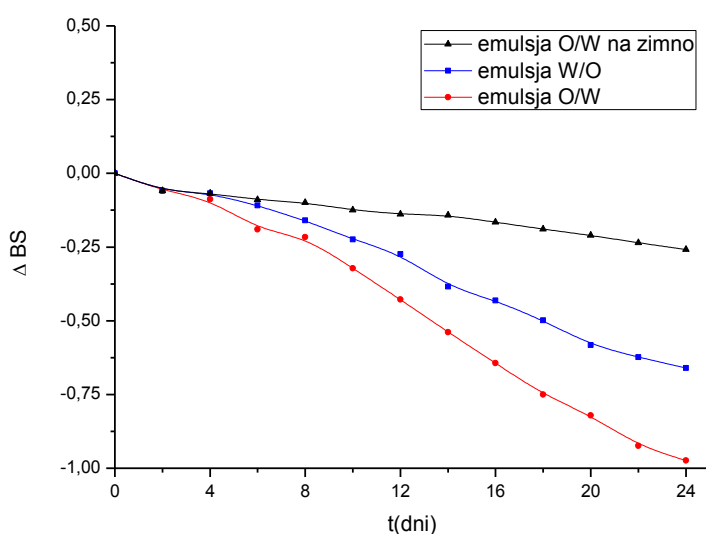


Rys. 63. Profile ΔBS emulsji zawierających likopen przechowywanych w temperaturze pokojowej bez dostępu światła.



Rys. 64. Profile ΔBS emulsji zawierających likopen przechowywanych w temperaturze pokojowej z dostępem światła.

Zmiany wartości wstecznego rozproszenia światła dla próbek przechowywanych 100 dni w temperaturze pokojowej z dostępem światła osiągnęły następujące wartości: dla emulsji O/W na zimno -1,00%, dla emulsji O/W -4,75 % oraz dla emulsji W/O -3,0 % i nie uległy dalszemu pogłębieniu (rys. 64). Można zaobserwować, że najbardziej niestabilnym typem emulsji jest emulsja typu O/W przygotowana na gorąco. Dostęp światła miał wpływ na zwiększenie się niestabilności. Wszystkie typy emulsji są bardziej stabilne w temperaturze pokojowej bez dostępu światła, ponieważ likopen rozkłada się w wysokich temperaturach, w obecności światła oraz tlenu.

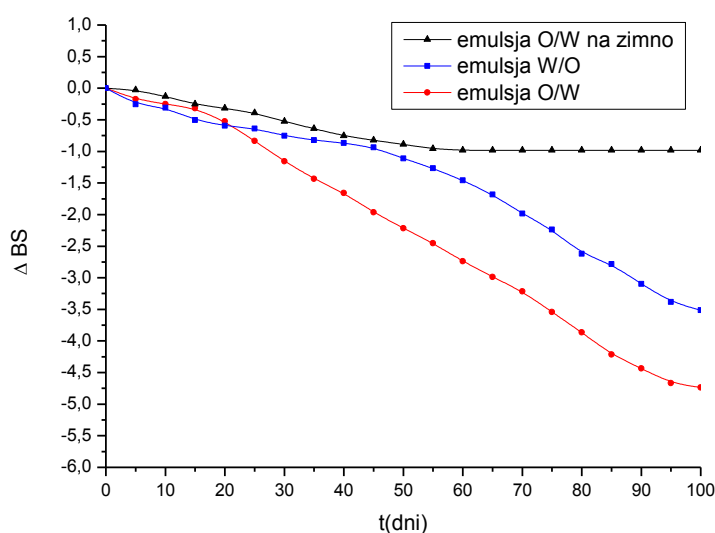


Rys. 65. Profile ΔBS emulsji zawierających likopen przechowywanych w temperaturze 45°C.

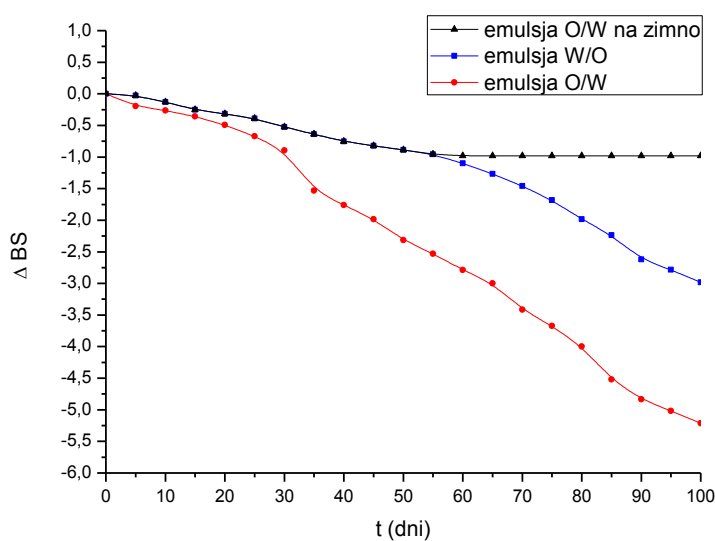
Przyspieszony test starzeniowy, który został przeprowadzony w temperaturze 45°C udowodnił, tak jak w poprzednich analizach, że emulsją zachowującą największą stabilność jest emulsja typu O/W przygotowana na zimno ($\Delta BS = -0,25\%$) (rys. 65).

- **formulacje kosmetyczne zawierające astaksantynę**

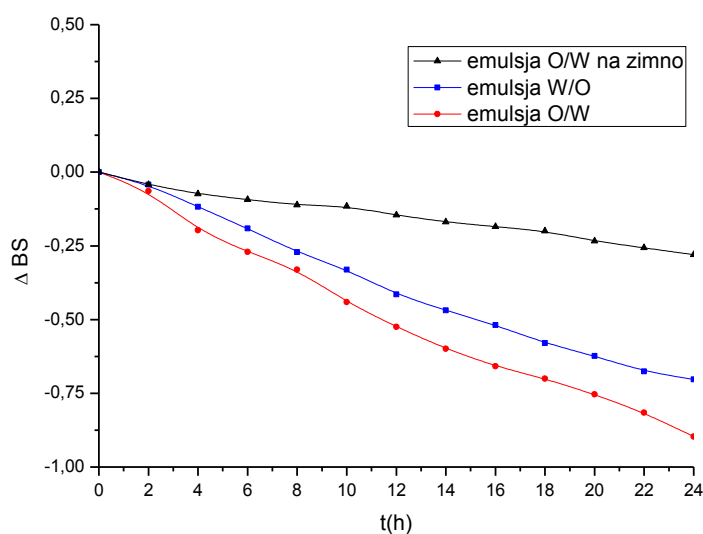
Na podstawie badań stwierdzono, że we wszystkich warunkach przechowywania: temperaturze pokojowej bez dostępu światła, z dostępem światła oraz w 45°C (rys. 66-68), najbardziej stabilną formacją tak jak w kosmetykach zawierających β -karoten oraz likopen okazała się emulsja typu O/W przygotowana na zimno. Emulsja ta wykazuje wysoką stabilność, niezmienną w różnych warunkach przechowywania zawdzięcza zarówno swojemu składowi, jak i sposobowi przygotowania. Najmniej stabilną emulsją okazała się emulsja typu O/W sporządzona na gorąco, która charakteryzuje się we wszystkich warunkach najwyższymi odchyleniami od wartości ΔBS .



Rys. 66. Profile ΔBS emulsji zawierających astaksantynę przechowywanych w temperaturze pokojowej bez dostępu światła.



Rys. 67. Profile ΔBS emulsji zawierających astaksantynę przechowywanych w temperaturze pokojowej z dostępem światła.



Rys. 68. Profile ΔBS emulsji zawierających astaksantynę przechowywanych w temperaturze 45°C.

Temperatura oraz dostęp światła wpływają negatywnie na stabilność badanych kosmetyków, powodują pogłębienie się zjawiska flokulacji. Zawartość β -karotenu, likopenu czy astaksantyny we wszystkich typach emulsji nie wpłynęła istotnie na zmiany stabilności tych emulsji przechowywanych w różnych warunkach. Związki te pełnią w badanych emulsjach rolę antyoksydantów, mają za zadanie zwiększyć skuteczność działania kosmetyku.

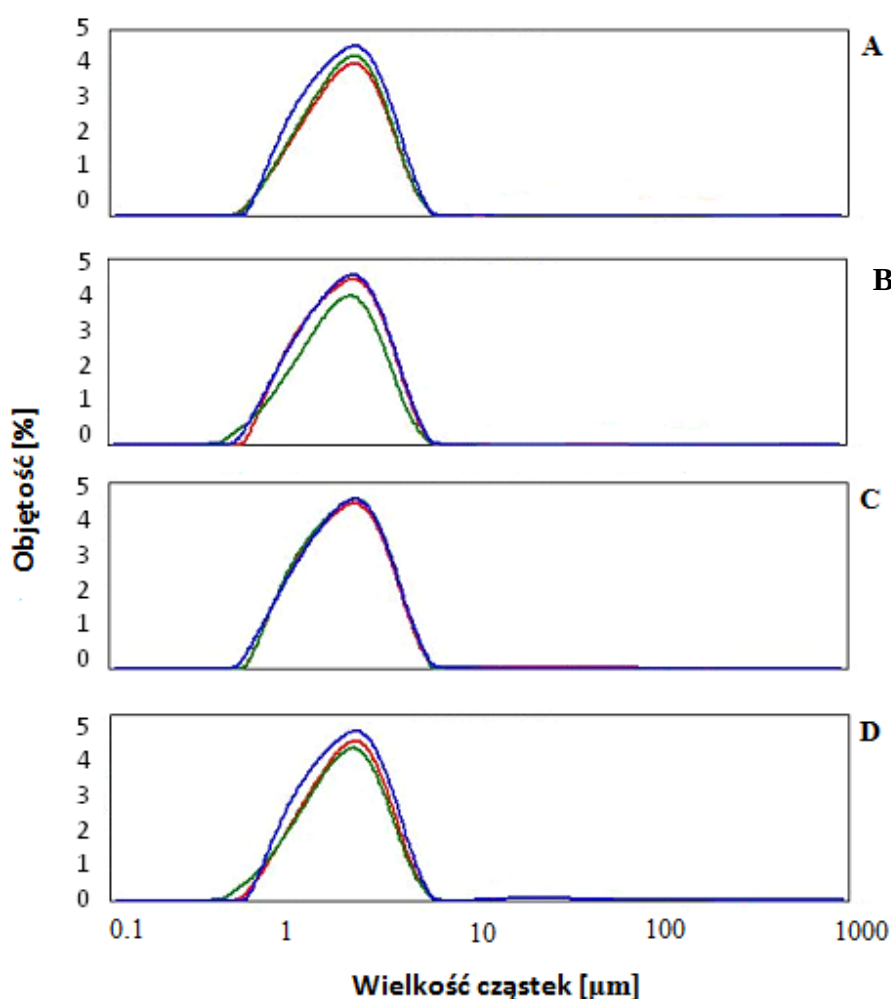
6.8. Badanie rozkładu wielkości cząstek emulsji kosmetycznych techniką dyfrakcji laserowej

6.8.1. Samodzielnie przygotowane emulsje kosmetyczne zawierające różne karotenoidy

Badaniom rozkładu wielkości cząstek poddano wszystkie trzy typy emulsji. Formulacje przechowywane były różnych warunkach.

- **formulacje kosmetyczne zawierające β -karoten**

Emulsja typu O/W przygotowana na zimno, zawierająca β -karoten i przechowywana w różnych warunkach.



- | | |
|---|--|
| — | emulsja od razu po przygotowaniu |
| — | emulsja po 100 dniach od przygotowania |
| — | emulsja po 100 dniach od przygotowania poddana działaniu |
| — | ultradźwięków o częstotliwości 20 kHz |

Rys. 69. Porównanie rozkładów wielkości cząstek badanych formulacji kosmetycznych przechowywanych w A: temperaturze pokojowej z dostępem światła, B: temperaturze pokojowej bez dostępu światła, C: temperaturze 4°C, D: temperaturze 45°C po 100 dniach.

W przypadku emulsji typu O/W przygotowanej na zimno zawierającej β -karoten, badanie rozkładu wielkości cząstek potwierdziło stabilność tej emulsji. Wnioski te zostały już wysunięte przy użyciu metody wielokrotnego rozpraszania światła (rozdział 6.7). Emulsja przygotowana na zimno z udziałem koemulgatora, który utrzymuje możliwie najniższe napięcie międzyfazowe, największą stabilność zawdzięcza właśnie swojemu składowi. Na rys. 69 można zaobserwować wielkości cząstek w zakresie 0,7 - 11 μm . Warunki przechowywania emulsji O/W na zimno nie miały znacznego wpływu na zmianę tego zakresu, co świadczy o stabilności tej emulsji. Rozkład wielkości cząstek emulsji nie zmienia się po użyciu ultradźwięków, które mają za zadanie rozbicie potencjalnych aglomeratów, będących oznaką postępującego procesu destabilizacji emulsji (rys. 69).

Tab. 37. Parametry rozkładów wielkości cząstek dla emulsji O/W przygotowanej na zimno zawierającej β -karoten i przechowywanej w różnych warunkach.

Rozkład wielkości cząstek	$D_{(4,3)}[\mu\text{m}]$	$D_{(3,2)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,1)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,5)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,9)}[\mu\text{m}]$
Temperatura pokojowa z dostępem światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	2,80±0,02	1,75±0,01	0,18±0,02	0,40±0,05	1,73±0,04
z ultradźwiękami	2,70±0,02	1,66±0,01	2,28±0,02	2,50±0,05	2,83±0,04
Temperatura pokojowa bez dostępu światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	2,89±0,04	1,78±0,08	0,18±0,01	0,41±0,01	1,71±0,04
z ultradźwiękami	2,72±0,06	1,68±0,02	2,26±0,01	2,50±0,01	2,80±0,04
Temperatura 4°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	2,73±0,02	1,65±0,02	0,17±0,01	0,41±0,01	1,72±0,04
z ultradźwiękami	2,73±0,02	1,52±0,02	2,25±0,01	2,50±0,01	2,80±0,04
Temperatura 45°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	2,96±1,15	1,67±0,02	0,18±0,02	0,42±0,05	1,74±0,04
z ultradźwiękami	3,45±0,19	1,52±0,02	2,26±0,02	2,50±0,05	2,82±0,04

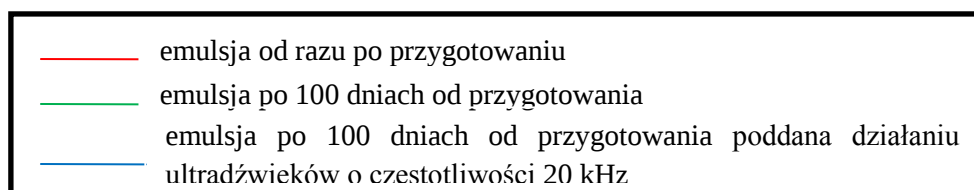
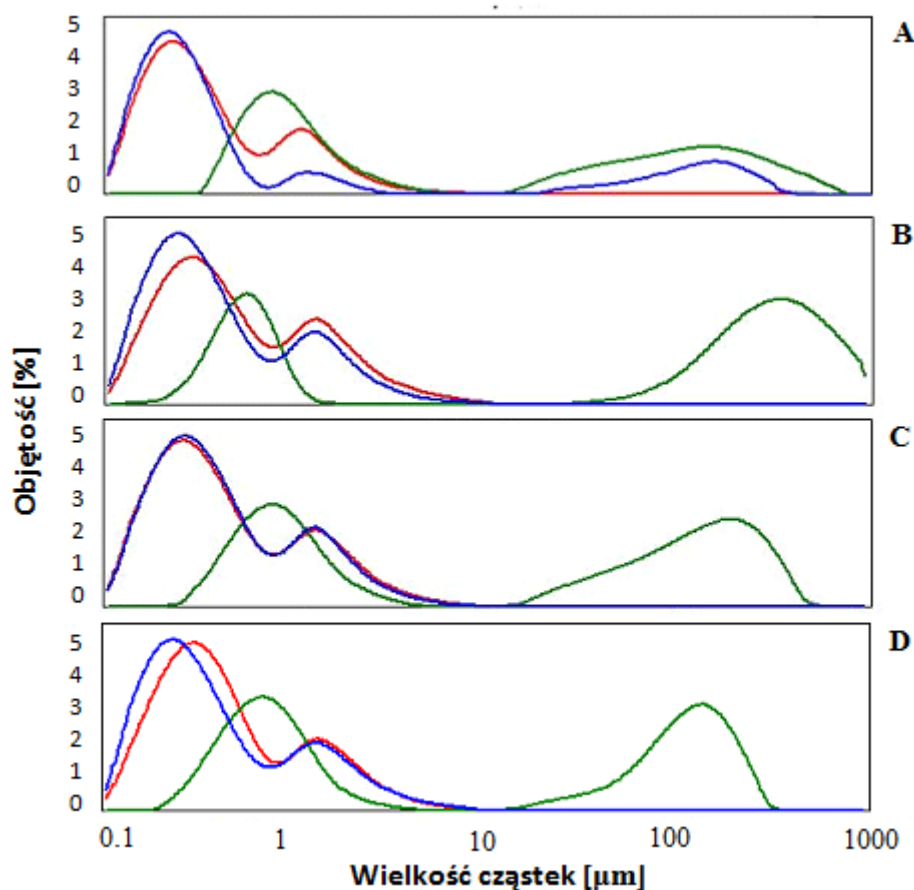
$D_{(4,3)}$ - średnia średnica cząstek, $D_{(3,2)}$ - miara powierzchni czynnej cząstek, $d_{(0,1)}$ - 10% z rozkładu cząstek znajduje się poniżej tej wartości, $d_{(0,5)}$ - mediana rozkładu cząstek, $d_{(0,9)}$ - 90% z rozkładu cząstek znajduje się poniżej tej wartości. Dokładny opis wyżej wymienionych wartości znajduje się w rozdziale 5.7.

Badania wykazały, że 90% ($d_{(0,9)}$) cząstek emulsji O/W ma średnicę mniejszą niż 1,71±0,04 - 2,83±0,04 μm , natomiast 10% cząstek ($d_{(0,1)}$) ma średnicę mniejszą niż 0,17±0,01 - 2,28±0,02 μm . 50% cząstek emulsji ($d_{(0,5)}$) ma średnicę większą lub mniejszą niż 0,40±0,05 - 2,50±0,05 μm .

Średnia średnica cząstek dla emulsji O/W przygotowywanej na zimno zmieniła się z 2,80±0,02 - 2,96±1,15 μm do 2,70±0,02 - 3,45±0,19 μm , natomiast miara powierzchni czynnej cząstek zmniejszyła się z 1,65±0,02 - 1,78±0,08 μm do 1,52±0,02 - 1,68±0,02 μm .

Zmiana wartości średnic $D_{(3,2)}$ oraz $D_{(4,3)}$ miała miejsce pod wpływem ultradźwięków (20 kHz) (tab.37). Świadczy to o stabilności badanych próbek.

Emulsja typu O/W zawierająca β -karoten i przechowywana w różnych warunkach.



Rys. 70. Porównanie rozkładów wielkości cząstek badanych formułacji kosmetycznych przechowywanych w: A: temperaturze pokojowej z dostępem światła, B: temperaturze pokojowej bez dostępu światła, C: temperaturze 4°C, D: temperaturze 45°C.

Wielkość cząstek fazy zdyspergowanej zależy od wielu czynników, m.in. od czasu i prędkości homogenizacji, rodzaju i dodatku emulgatora oraz ilości i rodzaju zagęstnika. Właściwy dobór tych parametrów gwarantuje „ustabilizowanie cząstek” fazy zdyspergowanej, które pod względem termodynamicznym ciągle pozostają w ruchu, dążąc do zmian w strukturze układu dyspersyjnego [167].

W emulsji typu O/W we wszystkich warunkach przechowywania od razu po sporządzeniu zaobserwowano pojawienie się cząstek w zakresie 0,1 - 10 μm , które po użyciu ultradźwięków nie ulegają rozbiciu (rys. 70). Przechowywanie emulsji w temperaturach: 4°C oraz RT bez dostępu światła nie spowodowało zmian w rozkładzie wielkości cząstek emulsji, co świadczy o ich stabilności. Karotenoidy są związkami charakteryzującymi się wysoką niestabilnością pod wpływem podwyższonej temperatury. Po 100 dniach przechowywania emulsji zaobserwowano wzrost wielkości cząstek do 0,3 - 500 μm we wszystkich warunkach przechowywania.

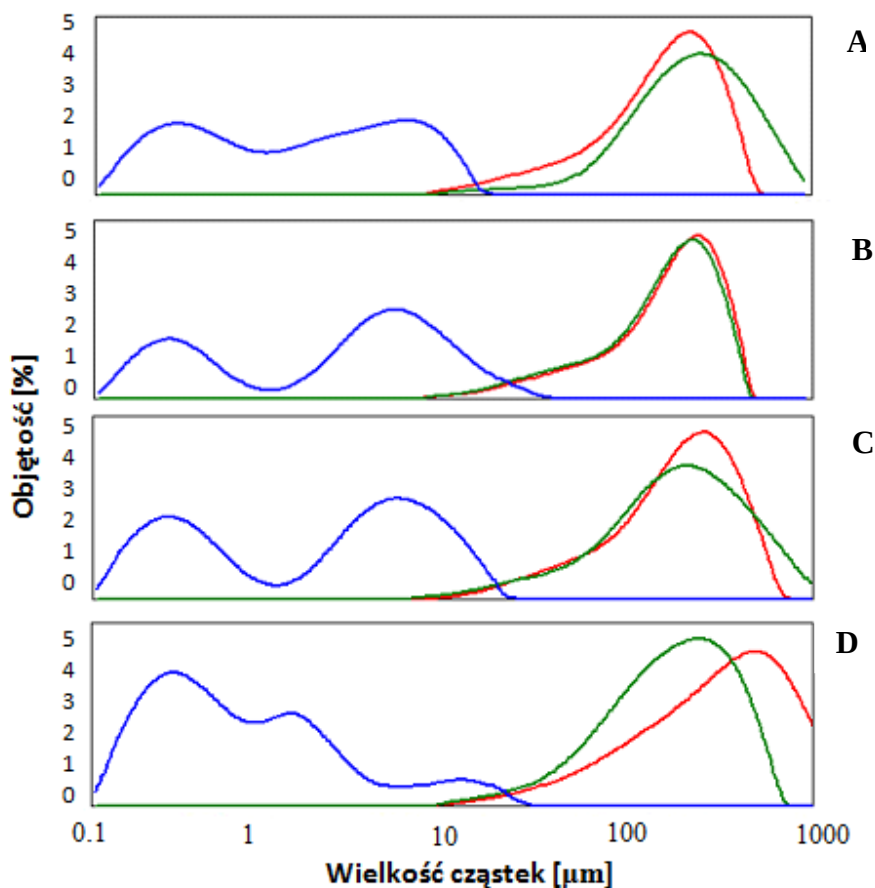
Tab. 38. Parametry rozkładów wielkości cząstek dla emulsji O/W zawierającej β -karoten przechowywanej w różnych warunkach.

Rozkład wielkości cząstek	$D_{(4,3)}[\mu\text{m}]$	$D_{(3,2)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,1)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,5)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,9)}[\mu\text{m}]$
Temperatura pokojowa z dostępem światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	0,70±0,02	2,01±0,01	0,17±0,01	0,38±0,01	1,77±0,01
z ultradźwiękami	0,73±0,01	0,31±0,01	0,28±0,01	0,50±0,02	1,88±0,01
Temperatura pokojowa bez dostępu światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	0,70±0,04	2,07±0,04	0,17±0,01	0,36±0,02	1,75±0,11
z ultradźwiękami	0,73±0,01	0,34±0,01	0,26±0,01	0,49±0,02	1,86±0,11
Temperatura 4°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	0,72±0,02	2,09±0,04	0,16±0,01	0,36±0,01	1,74±0,11
z ultradźwiękami	0,74±0,04	0,35±0,01	0,29±0,01	0,49±0,02	1,85±0,11
Temperatura 45°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	0,70±0,04	2,09±0,03	0,17±0,01	0,38±0,02	1,88±0,01
z ultradźwiękami	0,75±0,01	0,37±0,01	0,25±0,01	0,50±0,02	1,81±0,01

Na podstawie tab. 38 zauważono, że średnica $D_{(4,3)}$ dla emulsji O/W przechowywanej w temperaturze pokojowej bez dostępu światła zmieniła się z 0,70±0,04 μm do 0,73±0,01 μm , natomiast średnica $D_{(3,2)}$ zmniejszyła się z 2,07±0,01 μm do 0,34±0,01 μm po zastosowaniu ultradźwięków (20 kHz). Ten sam efekt zaobserwowano dla emulsji O/W przechowywanej w temperaturze pokojowej z dostępem światła, 4°C oraz 45°C. 90% cząstek tej emulsji ma średnicę mniejszą niż 1,74±0,11 - 1,88±0,01 μm , natomiast 10% cząstek ma średnicę mniejszą niż 0,16±0,01 - 0,29±0,01 μm . 50% emulsji ma średnicę większą lub mniejszą niż 0,36±0,01 - 0,50±0,02 μm . Wyniki wykazały, że emulsja O/W charakteryzowała się najmniejszą średnicą cząstek spośród wszystkich otrzymanych preparatów. Po 100 dniach przechowywania emulsji zaobserwowano pojawienie się dodatkowej frakcji w stosunku do pomiarów wykonanych od razu po sporządzeniu emulsji. Mniejsze krople emulsji, ściśle upakowane z większymi mogą tworzyć strukturę siatki przestrzennej stabilizującej układ

emulsyjny [167]. Obecność takich dwóch wyraźnie zarysowanych frakcji w emulsji może świadczyć o zaistnieniu tego zjawiska.

Emulsja typu W/O zawierająca β -karoten, przechowywana w różnych warunkach.



—	emulsja od razu po przygotowaniu
—	emulsja po 100 dniach od przygotowania
—	emulsja po 100 dniach od przygotowania poddana działaniu ultradźwięków o częstotliwości 20kHz

Rys. 71. Porównanie rozkładów wielkości cząstek badanych formułacji kosmetycznych przechowywanych w: A: temperaturze pokojowej z dostępem światła, B: temperaturze pokojowej bez dostępu światła, C: temperaturze 4°C, D: temperaturze 45°C.

Wpływ ultradźwięków jest również wyraźnie widoczny w przypadku emulsji typu W/O. Przed użyciem ultradźwięków zauważono jeden szeroki pik w zakresie wielkości cząstek od 7 do 1000 μm. Po zastosowaniu ultradźwięków, pik przesunął się w stronę niższych wartości rozmiaru cząstek (0,1 - 20 μm) (rys. 71). Utworzone aglomeraty, które powodowały niestabilność emulsji, zostały rozbite za pomocą ultradźwięków. Gruczyńska i

wsp. [348] wykazali, że na rozkład oraz średnią wielkość cząstek rozproszonej fazy emulsji wpływ mają warunki przechowywania.

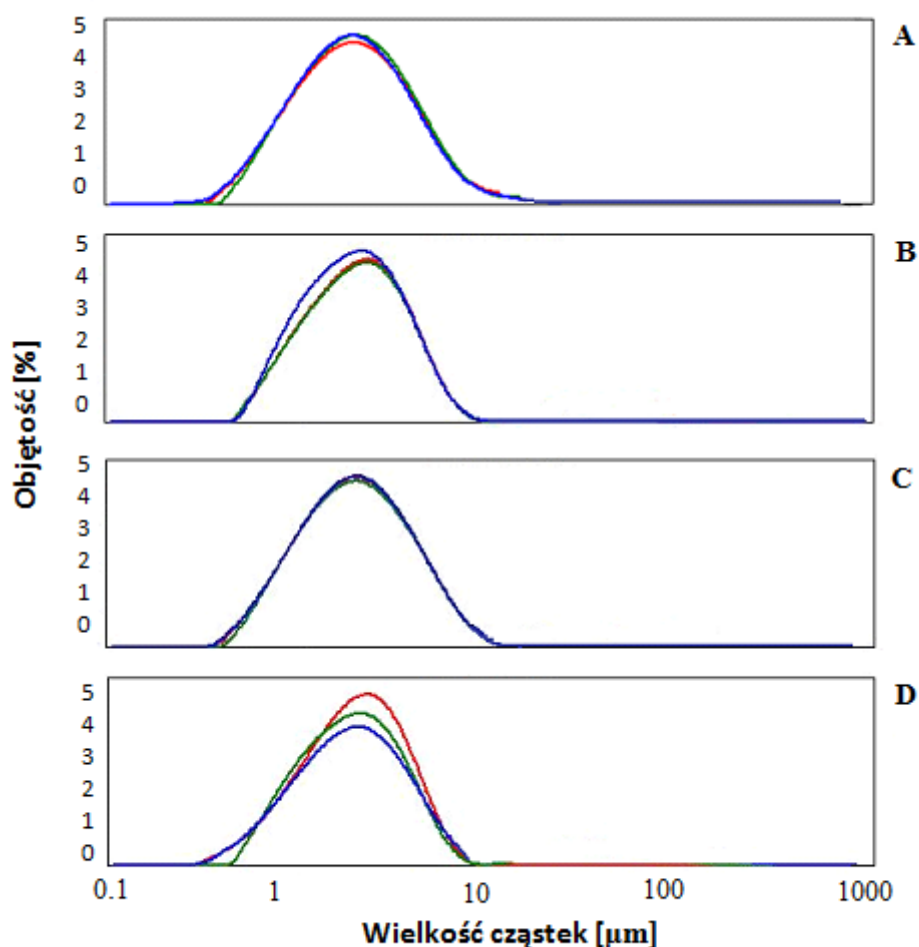
Tab. 39. Parametry rozkładów wielkości cząstek dla emulsji W/O zawierającej β -karoten, przechowywanej w różnych warunkach.

Rozkład wielkości cząstek	$D_{(4,3)}[\mu\text{m}]$	$D_{(3,2)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,1)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,5)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,9)}[\mu\text{m}]$
Temperatura pokojowa z dostępem światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	210,34±15,00	83,04±3,34	0,24±0,01	2,85±0,01	9,76±0,32
z ultradźwiękami	3,86±0,22	0,58±0,05	0,45±0,01	4,86±0,01	11,78±0,32
Temperatura pokojowa bez dostępu światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	219,63±15,00	87,05±3,65	0,20±0,01	2,82±0,43	9,72±0,32
z ultradźwiękami	3,91±0,26	0,60±0,05	0,32±0,01	3,84±0,43	10,74±0,32
Temperatura 4°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	222,69±19,00	88,02±3,70	0,22±0,01	2,83±0,46	9,73±0,32
z ultradźwiękami	3,92±0,25	0,62±0,05	0,34±0,01	3,85±0,47	10,76±0,32
Temperatura 45°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	225,78±23,00	89,07±4,50	0,24±0,01	2,86±0,01	9,77±0,32
z ultradźwiękami	3,95±0,25	0,64±0,06	0,45±0,01	4,88±0,01	11,78±0,32

Na podstawie przeprowadzonych badań zauważono, że średnica $D_{(4,3)}$ emulsji W/O przechowywanej w temperaturze pokojowej bez dostępu światła pod wpływem ultradźwięków zmieniła się z 219,63±15,00 μm do 3,91±0,26 μm . Natomiast średnica $D_{(3,2)}$ uległa zmianie z 87,05±3,65 μm do 0,60±0,05 μm po zastosowaniu ultradźwięków (tab. 39). Podobne zależności zaobserwowano dla emulsji W/O przechowywanej w temperaturze pokojowej z dostępem światła, 4°C oraz 45°C. Emulsja ta ma w swoim składzie najwięcej składników tłuszczowych, dlatego też charakteryzuje się najwyższą medianą rozkładu cząstek oraz parametrami $d_{(0,1)}$ i $d_{(0,9)}$ spośród wszystkich badanych emulsji. 90% cząstek tej emulsji ma średnicę mniejszą niż 9,72±0,32 - 11,78±0,32 μm . 50% cząstek tej emulsji ma średnicę większą lub mniejszą niż 2,82±0,43 - 4,88±0,01 μm . Natomiast 10% cząstek ma średnicę mniejszą niż 0,20±0,01 - 0,45±0,01 μm . W trakcie przechowywania emulsji przez 100 dni, niezależnie od temperatury, zaobserwowano wzrost średniej wielkości cząstek.

- formułacje kosmetyczne zawierające likopen

Emulsja typu O/W przygotowana na zimno, zawierająca likopen i przechowywana w różnych warunkach



- | | |
|--------------------------------------|--|
| — | emulsja od razu po przygotowaniu |
| — | emulsja po 100 dniach od przygotowania |
| — | emulsja po 100 dniach od przygotowania poddana działaniu ultradźwięków o częstotliwości 20 kHz |

Rys. 72. Porównanie rozkładów wielkości cząstek badanych formułacji kosmetycznych przechowywanych w: A: temperaturze pokojowej z dostępem światła, B: temperaturze pokojowej bez dostępu światła, C: temperaturze 4°C, D: temperaturze 45°C.

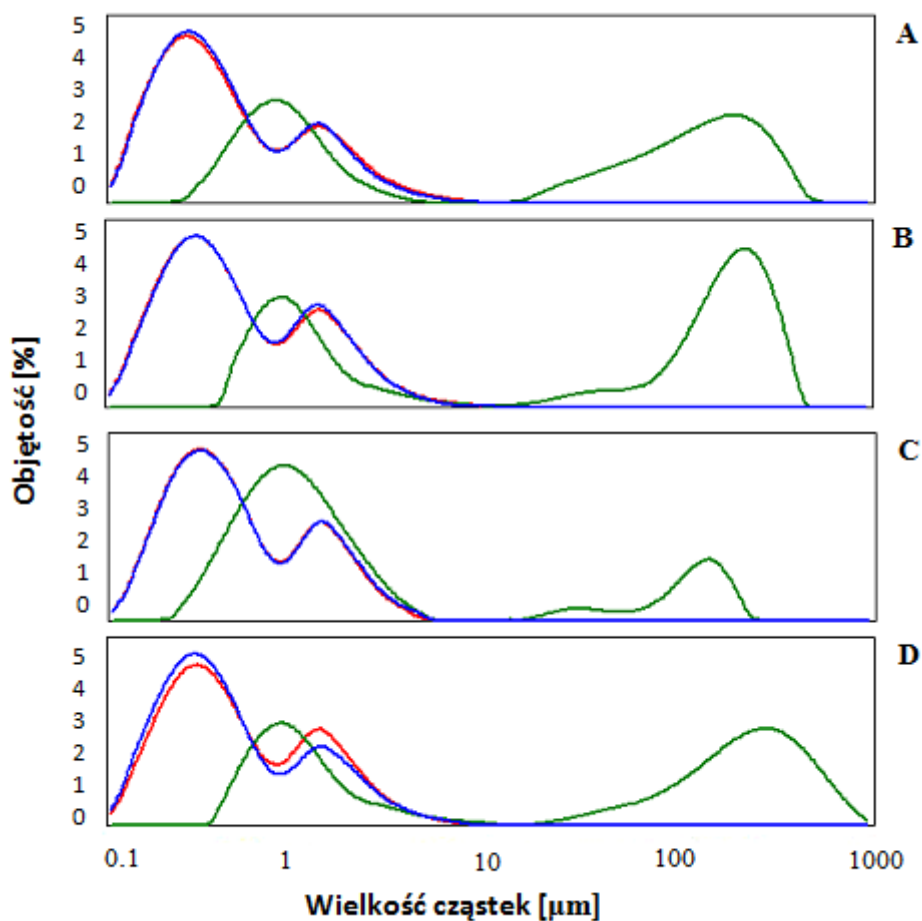
Emulsja typu O/W przygotowana na zimno nie ulega destabilizacji wraz z czasem jej przechowywania. Zaobserwowano pik w niższym zakresie wielkości cząstek (0,7-11 μm). Można wyciągnąć wniosek, że warunki przechowywania nie wpłynęły na rozkład wielkości cząstek tej emulsji (rys. 72).

Tab. 40. Parametry rozkładów wielkości cząstek dla emulsji O/W zawierającej likopen, przechowywanej w różnych warunkach.

Rozkład wielkości cząstek	$D_{(4,3)}[\mu\text{m}]$	$D_{(3,2)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,1)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,5)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,9)}[\mu\text{m}]$
Temperatura pokojowa z dostępem światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	$2,80\pm 0,02$	$1,75\pm 0,01$	$0,18\pm 0,02$	$0,40\pm 0,05$	$1,73\pm 0,04$
z ultradźwiękami	$2,70\pm 0,02$	$1,66\pm 0,01$	$0,28\pm 0,02$	$0,50\pm 0,05$	$1,83\pm 0,04$
Temperatura pokojowa bez dostępu światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	$2,89\pm 0,04$	$1,78\pm 0,08$	$0,18\pm 0,01$	$0,41\pm 0,01$	$1,71\pm 0,04$
z ultradźwiękami	$2,72\pm 0,06$	$1,68\pm 0,02$	$0,26\pm 0,01$	$0,50\pm 0,01$	$1,80\pm 0,04$
Temperatura 4°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	$2,73\pm 0,02$	$1,65\pm 0,02$	$0,17\pm 0,01$	$0,41\pm 0,01$	$1,72\pm 0,04$
z ultradźwiękami	$2,73\pm 0,02$	$1,52\pm 0,02$	$0,25\pm 0,01$	$0,50\pm 0,01$	$1,80\pm 0,04$
Temperatura 45°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	$2,96\pm 1,15$	$1,67\pm 0,02$	$0,18\pm 0,02$	$0,42\pm 0,05$	$1,74\pm 0,04$
z ultradźwiękami	$3,45\pm 0,19$	$1,52\pm 0,02$	$0,26\pm 0,02$	$0,50\pm 0,05$	$1,82\pm 0,04$

Zauważono, że emulsja tego typu nie wykazuje tendencji do tworzenia się aglomeratów, dlatego też nie zaobserwowano znaczących zmian w wielkości cząstek pod wpływem działania ultradźwięków (tab. 40). 90% cząstek tej emulsji ma średnicę mniejszą niż $1,71\pm 0,04$ - $1,83\pm 0,04$ μm , natomiast 10% cząstek ma średnicę mniejszą niż $0,17\pm 0,01$ - $0,28\pm 0,02$ μm . 50% emulsji ma średnicę większą lub mniejszą niż $0,40\pm 0,05$ - $0,50\pm 0,05$ μm . Wartość zmierzonej średnicy $D_{(4,3)}$ dla zbadanej emulsji zmieniła się z $2,80\pm 0,02$ - $2,96\pm 1,15\mu\text{m}$ do $2,70\pm 0,02$ - $3,45\pm 0,19\mu\text{m}$, natomiast średnica $D_{(3,2)}$ zmniejszyła się z $1,75\pm 0,01$ - $1,78\pm 0,08$ do $1,68\pm 0,02$ - $1,52\pm 0,02$ μm . Zmiana wartości wyżej wymienionych średnic nastąpiła po zastosowaniu ultradźwięków (20 kHz).

Emulsja typu O/W zawierająca likopen, przechowywana w różnych warunkach



- | | |
|--------------------------------------|--|
| — | emulsja od razu po przygotowaniu |
| — | emulsja po 100 dniach od przygotowania |
| — | emulsja po 100 dniach od przygotowania poddana działaniu ultradźwięków o częstotliwości 20 kHz |

Rys. 73. Porównanie rozkładów wielkości cząstek badanych formułacji kosmetycznych przechowywanych w: A: temperaturze pokojowej z dostępem światła, B: temperaturze pokojowej bez dostępu światła, C: temperaturze 4°C, D: temperaturze 45°C.

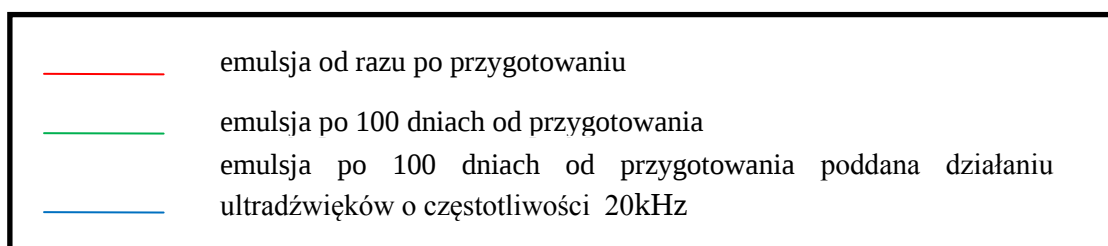
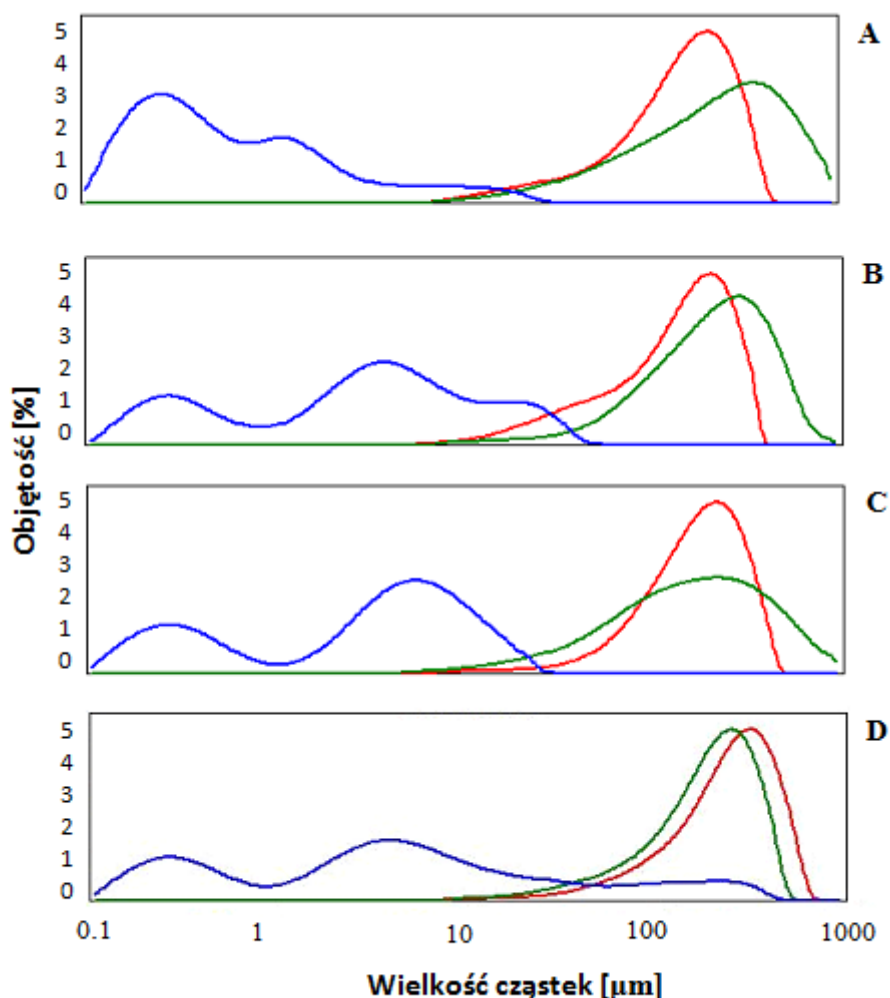
W emulsji typu O/W zawierającej likopen od razu po przygotowaniu można zaobserwować pik o dwóch maksimach, pierwsze maksimum przy 0,4 μm oraz drugie maksimum przy 2 μm . Po 100 dniach przechowywania rozkłady wielkości cząstek są zupełnie inne niż rozkłady wykonane od razu po przygotowaniu emulsji (rys. 73). Dodatkowy, szeroki pik pojawia się przy bardzo dużych wielkościach cząstek w zakresie 10 - 1000 μm . Przechowywanie emulsji w temperaturach: 4°C oraz pokojowej bez dostępu światła nie spowodowały zmiany rozkładu wielkości cząstek emulsji, co świadczy o ich stabilności.

Tab. 41. Parametry rozkładów wielkości cząstek dla emulsji O/W zawierającej likopen przechowywanej w różnych warunkach.

Rozkład wielkości cząstek	$D_{(4,3)}[\mu\text{m}]$	$D_{(3,2)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,1)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,5)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,9)}[\mu\text{m}]$
Temperatura pokojowa z dostępem światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	70,54±0,02	2,07±0,01	0,18±0,02	0,43±0,05	1,75±0,04
z ultradźwiękami	0,75±0,02	0,46±0,01	0,25±0,02	0,50±0,05	1,83±0,03
Temperatura pokojowa bez dostępu światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	70,24±0,04	2,06±0,01	0,16±0,01	0,41±0,01	1,71±0,04
z ultradźwiękami	0,74±0,02	0,36±0,01	0,23±0,01	0,50±0,01	1,80±0,04
Temperatura 4°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	69,45±0,01	2,01±0,01	0,15±0,01	0,41±0,01	1,72±0,04
z ultradźwiękami	0,73±0,02	0,43±0,02	0,24±0,01	0,40±0,01	1,80±0,03
Temperatura 45°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	70,65±0,02	2,08±0,02	0,18±0,02	0,42±0,05	1,74±0,04
z ultradźwiękami	0,76±0,02	0,54±0,02	0,26±0,02	0,50±0,05	1,82±0,04

Średnia wielkość cząstek dla emulsji typu O/W, która była przechowywana w temperaturze pokojowej bez dostępu światła zmieniła się pod wpływem ultradźwięków z 70,24±0,36 μm do 0,74±0,02 μm . Miara powierzchni czynnej cząstek uległa zmniejszeniu z 2,06±0,01 do 0,36±0,01 μm po zastosowaniu ultradźwięków. 90% cząstek tej emulsji ma średnicę mniejszą niż 1,71±0,04 - 1,82±0,04 μm , natomiast 10% cząstek ma średnicę mniejszą niż 0,15±0,01 - 0,26±0,02 μm . 50% cząstek emulsji ma średnicę większą lub mniejszą niż 0,43±0,05 - 0,50±0,01 μm (tab. 41). Zaobserwowano wyraźny zarys dwóch frakcji, spowodowany większą trudnością w zdyspergowaniu fazy olejowej w fazie wodnej (rys. 73).

Emulsja typu W/O zawierająca likopen, przechowywana w różnych warunkach.



Rys. 74. Porównanie rozkładów wielkości cząstek badanych formułacji kosmetycznych przechowywanych w: A: temperaturze pokojowej z dostępem światła, B: temperaturze pokojowej bez dostępu światła, C: temperaturze 4°C, D: temperaturze 45°C.

Na rys. 74 można zaobserwować zmiany rozkładów wielkości cząstek po użyciu ultradźwięków w stosunku do rozkładów wielkości cząstek zbadanych dla preparatów od razu po ich przygotowaniu. Można zauważyć szeroki pik w zakresie 7 - 990 μm dla emulsji poddanej badaniu od razu po sporządzeniu oraz pik w zakresie 10 - 1000 μm dla emulsji badanej po 100 dniach przechowywania. Wpływ ultradźwięków jest widoczny, ponieważ po

ich zastosowaniu aglomeraty obecne w emulsji zostają rozbite na cząstki o zdecydowanie mniejszych rozmiarach.

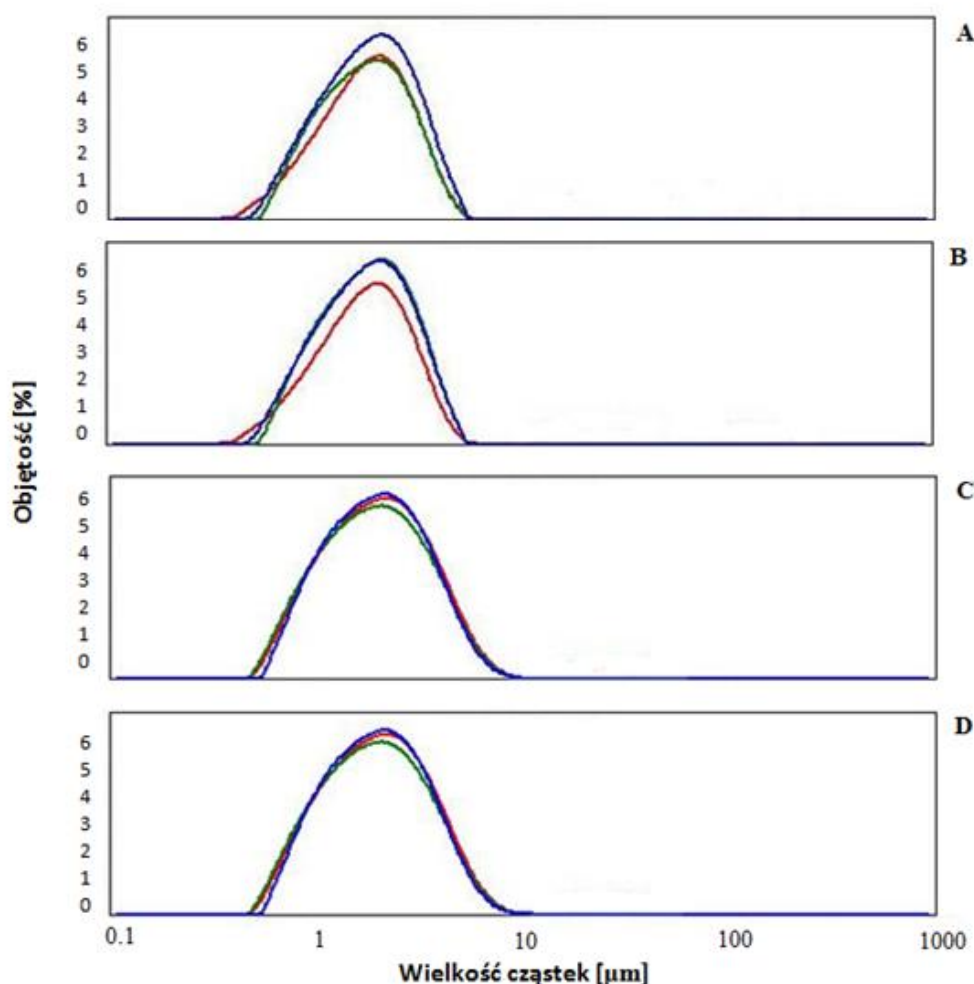
Tab. 42. Parametry rozkładów wielkości cząstek dla emulsji W/O zawierającej likopen, przechowywanej w różnych warunkach.

Rozkład wielkości cząstek	$D_{(4,3)}[\mu\text{m}]$	$D_{(3,2)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,1)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,5)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,9)}[\mu\text{m}]$
Temperatura pokojowa z dostępem światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	$238,78 \pm 8,50$	$95,54 \pm 4,56$	$0,21 \pm 0,01$	$3,17 \pm 0,15$	$8,75 \pm 0,20$
z ultradźwiękami	$3,81 \pm 0,09$	$0,61 \pm 0,06$	$0,43 \pm 0,01$	$5,19 \pm 0,15$	$9,77 \pm 0,20$
Temperatura pokojowa bez dostępu światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	$236,58 \pm 8,40$	$94,97 \pm 4,45$	$0,21 \pm 0,01$	$3,16 \pm 0,18$	$8,78 \pm 0,22$
z ultradźwiękami	$3,80 \pm 0,06$	$0,60 \pm 0,05$	$0,34 \pm 0,01$	$5,16 \pm 0,18$	$9,72 \pm 0,22$
Temperatura 4°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	$237,76 \pm 8,50$	$95,78 \pm 4,48$	$0,20 \pm 0,01$	$3,16 \pm 0,10$	$8,79 \pm 0,20$
z ultradźwiękami	$3,80 \pm 0,02$	$0,63 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$5,16 \pm 0,10$	$9,76 \pm 0,20$
Temperatura 45°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	$239,82 \pm 8,70$	$95,64 \pm 4,76$	$0,22 \pm 0,01$	$3,18 \pm 0,10$	$8,74 \pm 0,10$
z ultradźwiękami	$3,82 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,06$	$0,42 \pm 0,01$	$5,18 \pm 0,10$	$9,74 \pm 0,10$

Zbadano średnicę $D_{(4,3)}$ dla emulsji typu W/O, która była przechowywana w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Zaobserwowano zmiany tego parametru z $236,58 \pm 8,40 \mu\text{m}$ do $3,80 \pm 0,06 \mu\text{m}$, natomiast średnica $D_{(3,2)}$ zmniejszyła się z $94,97 \pm 4,45$ do $0,60 \pm 0,05 \mu\text{m}$. Zmiana wartości średnic nastąpiła po zastosowaniu ultradźwięków. Ten sam efekt zaobserwowano dla emulsji O/W przechowywanej w temperaturze pokojowej z dostępem światła, 4°C oraz 45°C. 90% cząstek tej emulsji charakteryzuje się średnicą mniejszą niż $8,74 \pm 0,10 - 9,74 \pm 0,10 \mu\text{m}$. Natomiast 50% cząstek badanej emulsji charakteryzuje się średnicą większą lub mniejszą niż $3,16 \pm 0,10 - 5,19 \pm 0,15 \mu\text{m}$. 10% cząstek ma średnicę mniejszą niż $0,20 \pm 0,01 - 0,43 \pm 0,01 \mu\text{m}$ (tab. 42).

- formułacje kosmetyczne zawierające astaksantynę

Emulsja typu O/W przygotowana na zimno zawierająca astaksantynę, przechowywana w różnych warunkach.



- | | |
|--------------------------------------|--|
| — | emulsja od razu po przygotowaniu |
| — | emulsja po 100 dniach od przygotowania |
| — | emulsja po 100 dniach od przygotowania poddana działaniu ultradźwięków o częstotliwości 20 kHz |

Rys. 75. Porównanie rozkładów wielkości cząstek badanych formułacji kosmetycznych przechowywanych w: A: temperaturze pokojowej z dostępem światła, B: temperaturze pokojowej bez dostępu światła, C: temperaturze 4°C, D: temperaturze 45°C.

Emulsja typu O/W przygotowana na zimno zawierająca astaksantynę jest najbardziej trwałym typem formułacji. Wniosek taki wyciągnięto na podstawie rys. 75. Zauważono

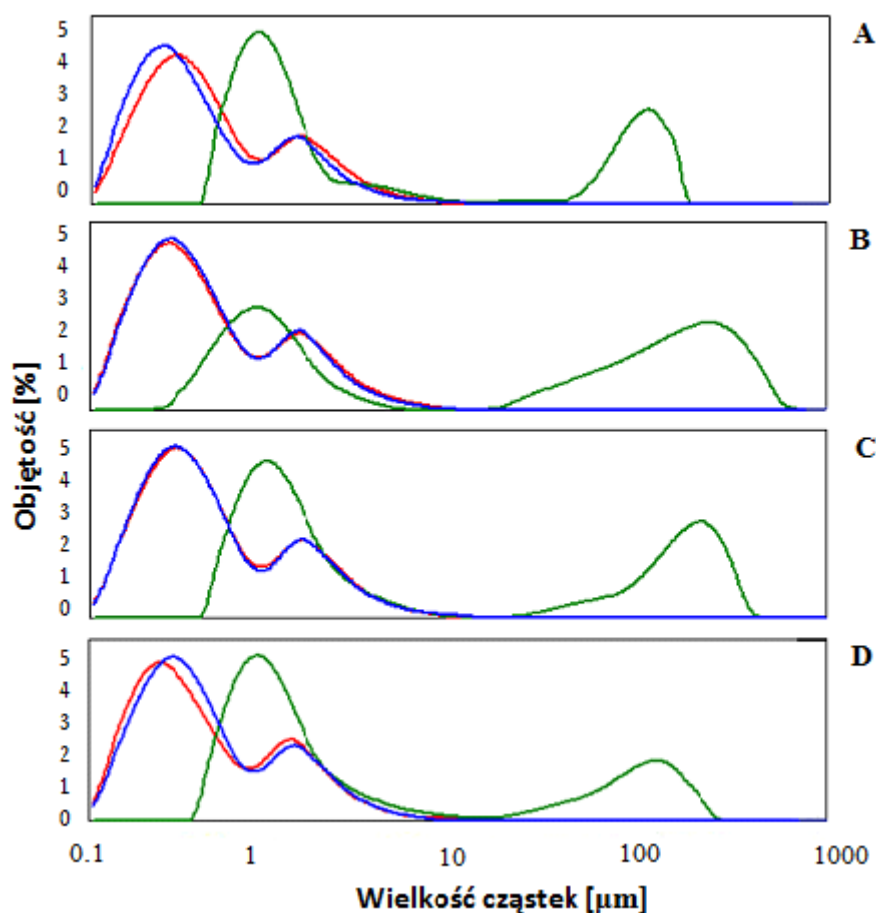
obecność szerokiego piksu w zakresie 0,7 -11 μm . Można stwierdzić, że rodzaj dodanego karotenoidu nie wpływa na zmiany stabilności tego typu emulsji.

Tab. 43. Parametry rozkładów wielkości cząstek dla emulsji O/W zawierającej astaksantynę przechowywanej w różnych warunkach.

Rozkład wielkości cząstek	$D_{(4,3)}[\mu\text{m}]$	$D_{(3,2)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,1)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,5)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,9)}[\mu\text{m}]$
Temperatura pokojowa z dostępem światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	2,92±1,12	1,71±0,06	1,18±0,02	1,40±0,05	2,73±0,04
z ultradźwiękami	3,43±0,16	1,59±0,01	2,28±0,02	2,50±0,05	3,83±0,04
Temperatura pokojowa bez dostępu światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	2,76±0,04	1,60±0,01	1,18±0,01	1,41±0,01	2,71±0,04
z ultradźwiękami	2,62±0,05	1,50±0,01	2,26±0,01	2,50±0,01	3,80±0,04
Temperatura 4°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	2,74±0,02	1,62±0,02	1,17±0,01	1,41±0,01	2,72±0,04
z ultradźwiękami	2,74±0,03	1,52±0,02	2,25±0,01	2,50±0,01	3,80±0,04
Temperatura 45°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	2,91±1,15	1,70±0,05	1,18±0,02	1,42±0,05	2,74±0,04
z ultradźwiękami	3,41±0,17	1,56±0,02	2,26±0,02	2,50±0,05	3,82±0,04

Zauważono, że 90% cząstek tej emulsji ma średnicę mniejszą niż 2,71±0,04 - 3,82±0,04 μm , 10% cząstek charakteryzuje się średnicą mniejszą niż 1,18±0,02 - 2,28±0,02 μm . Stwierdzono, że 50% emulsji ma średnicę większą lub mniejszą niż 1,40±0,05 - 2,50±0,05 μm (tabela 43). Zbadano również średnicę $D_{(4,3)}$ dla badanej emulsji. Średnica ta zmieniła się z 2,76±0,04 - 2,92±1,12 μm do 2,62±0,05 - 3,43±0,16 μm . Natomiast średnica $D_{(3,2)}$ uległa pomniejszeniu z 1,71±0,06 - 1,60±0,01 do 1,59±0,01 - 1,50±0,01 μm po zastosowaniu ultradźwięków (20 kHz) (tab. 43).

Emulsja typu O/W zawierająca astaksantynę, przechowywana w różnych warunkach.



- emulsja od razu po przygotowaniu
- emulsja po 100 dniach od przygotowania
- emulsja po 100 dniach od przygotowania poddana działaniu ultradźwięków o częstotliwości 20kHz

Rys. 76. Porównanie rozkładów wielkości cząstek badanych formułacji kosmetycznych przechowywanych w: A: temperaturze pokojowej z dostępem światła, B; temperaturze pokojowej bez dostępu światła, C: temperaturze 4°C, D: temperaturze 45°C.

W emulsji typu O/W zawierającej astaksantynę od razu po przygotowaniu można zaobserwować pik o dwóch maksimach. Pierwszy przy wartości 0,4 μm , natomiast drugi przy wartości 2 μm . Po 100 dniach przechowywania na rozkładzie pojawiają się dwa piki w zakresie 0,8 - 10 μm oraz 10 - 800 μm (rys. 76). Pik położony w zakresie 10 - 800 μm został rozbitý działaniem ultradźwięków. Przechowywanie emulsji w temperaturach: 4°C oraz

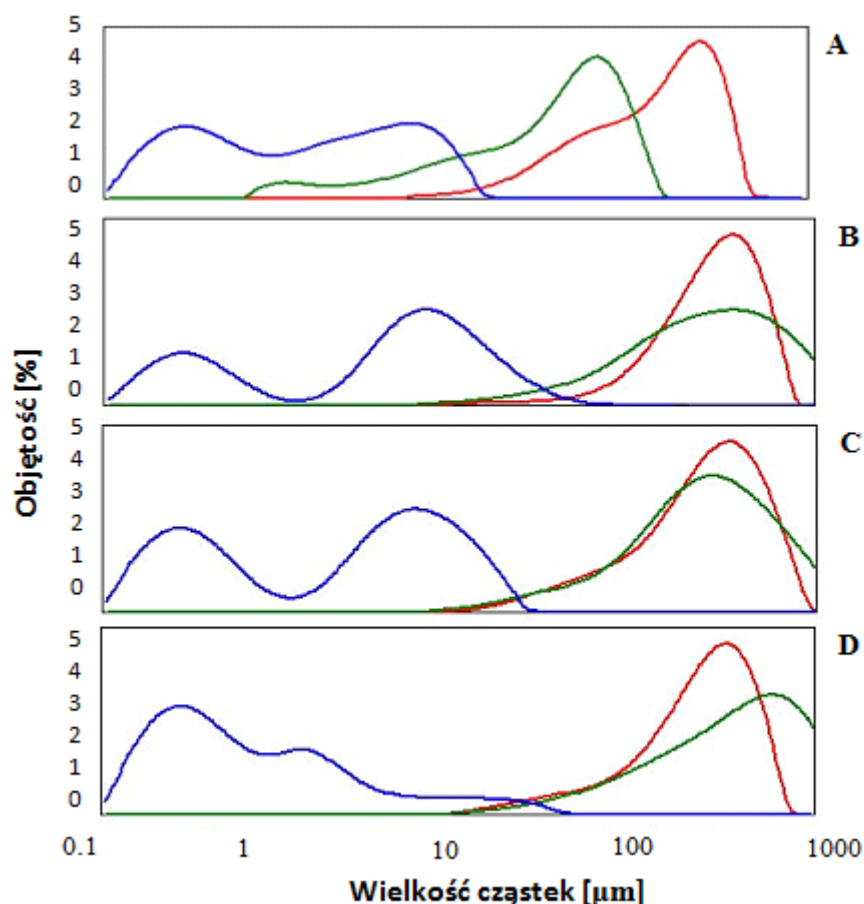
pokojoyej bez dostępu światła nie spowodowało zmiany rozkładu wielkości cząstek emulsji, co świadczy o ich stabilności.

Tab. 44. Parametry rozkładów wielkości cząstek dla emulsji O/W zawierającej astaksantynę, przechowywanej w różnych warunkach.

Rozkład wielkości cząstek	$D_{(4,3)}[\mu\text{m}]$	$D_{(3,2)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,1)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,5)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,9)}[\mu\text{m}]$
Temperatura pokojowa z dostępem światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	71,50±0,35	1,48±0,08	1,17±0,02	1,40±0,01	1,81±0,04
z ultradźwiękami	0,78±0,02	0,37±0,07	2,17±0,02	1,40±0,01	2,81±0,04
Temperatura pokojowa bez dostępu światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	70,45±0,30	1,46±0,05	1,17±0,02	1,40±0,01	1,81±0,04
z ultradźwiękami	0,77±0,02	0,36±0,01	2,19±0,03	2,42±0,02	2,71±0,03
Temperatura 4°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	70,40±0,25	1,45±0,04	1,19±0,03	1,42±0,02	1,71±0,03
z ultradźwiękami	0,76±0,01	0,36±0,01	2,18±0,02	2,43±0,02	2,73±0,02
Temperatura 45°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	71,25±0,32	1,48±0,07	1,18±0,02	1,43±0,02	1,73±0,02
z ultradźwiękami	0,78±0,02	0,38±0,08	2,16±0,02	2,41±0,01	2,82±0,04

Średnia wielkość cząstek dla analizowanej emulsji O/W przechowywanej w temperaturze pokojowej bez światła zmieniła się z 70,45±0,30 μm do 0,77± 0,02 μm . Średnica $D_{(3,2)}$ zmniejszyła się z 1,46±0,05 do 0,36±0,01 μm . Zmiana wartości średnicy nastąpiła po zastosowaniu ultradźwięków. Ten sam efekt zaobserwowano dla emulsji O/W przechowywanej w pozostałych warunkach. Zbadano następujące parametry: $d_{(0,9)}$, który wynosi 1,81±0,04 - 2,82±0,04 μm , $d_{(0,1)}$ wynosi 1,17±0,02 - 2.19±0,03 μm . Natomiast mediana zbadanej emulsji przyjmuje wartości w zakresie 1.40±0,01 - 2,43±0,02 μm (tab. 44). Również zaobserwowano pojawienie się dwóch frakcji (rys. 76) po 100 dniach przechowywania. Dlatego też stwierdzono, że czas przechowywania badanej emulsji ma duży wpływ na wielkość cząstek emulsji typu O/W.

Emulsja typu W/O, zawierająca astaksantynę i przechowywana w różnych warunkach



- emulsja od razu po przygotowaniu
- emulsja po 100 dniach od przygotowania
- emulsja po 100 dniach od przygotowania poddana działaniu ultradźwięków o częstotliwości 20 kHz

Rys. 77. Porównanie rozkładów wielkości cząstek badanych formułacji kosmetycznych przechowywanych w: A: temperaturze pokojowej z dostępem światła, B: temperaturze pokojowej bez dostępu światła, C: temperaturze 4°C, D: temperaturze 45°C.

Analizowaną emulsję zbadano od razu po jej sporządzeniu. W badanej emulsji zaobserwowano szeroki pik w zakresie 9 - 1000 μm . Po zastosowaniu ultradźwięków pik przesunięty został w stronę niższych wartości wielkości cząstek (0,1 – 70 μm), co świadczy o rozbiciu aglomeratów (rys. 77).

Tab. 45. Parametry rozkładów wielkości cząstek dla emulsji W/O zawierającej astaksantynę, przechowywanej w różnych warunkach.

Rozkład wielkości cząstek	$D_{(4,3)}[\mu\text{m}]$	$D_{(3,2)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,1)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,5)}[\mu\text{m}]$	$d_{(0,9)}[\mu\text{m}]$
Temperatura pokojowa z dostępem światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	214,30±6,50	96,85±4,30	1,21±0,01	2,83±0,10	9,10±0,10
z ultradźwiękami	3,74±0,10	0,69±0,03	2,21±0,01	3,83±0,10	10,10±0,10
Temperatura pokojowa bez dostępu światła, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	212,23±5,50	95,24±4,15	1,22±0,01	2,84±0,14	9,08±0,15
z ultradźwiękami	3,74±0,11	0,69±0,03	2,22±0,01	3,84±0,14	10,08±0,15
Temperatura 4°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	211,35±5,50	94,67±4,00	1,20±0,01	2,82±0,10	9,07±0,10
z ultradźwiękami	3,72±0,01	0,67±0,02	2,20±0,01	3,82±0,15	10,07±0,10
Temperatura 45°C, po 100 dniach					
bez użycia ultradźwięków	215,565±6,51	96,98±4,30	1,23±0,01	2,85±0,10	9,11±0,10
z ultradźwiękami	3,75±0,01	0,69±0,03	2,23±0,01	3,85±0,15	10,11±0,10

Wartość średnicy $D_{(4,3)}$ dla emulsji W/O przechowywanej w temperaturze pokojowej bez dostępu światła zmieniła się pod wpływem zastosowania ultradźwięków z 212,23±5,50 μm do 3,74±0,11 μm . Kolejny badany parametr, średnica $D_{(3,2)}$ zmniejszyła się z 95,24±4,15 do 0,69±0,03 μm po zastosowaniu ultradźwięków. Ten sam efekt zaobserwowano dla pozostałych warunków przechowywania. Badana emulsja charakteryzuje się najwyższą medianą rozkładu wielkości cząstek spośród wszystkich badanych emulsji 2,82±0,10 - 3,85±0,15 μm . 90% cząstek analizowanej emulsji, ma średnicę mniejszą niż 9,10±0,10 - 10,11±0,10 μm . Natomiast 10% cząstek charakteryzuje się średnicą mniejszą niż 1,21±0,01-2,23±0,01 μm (tab. 45).

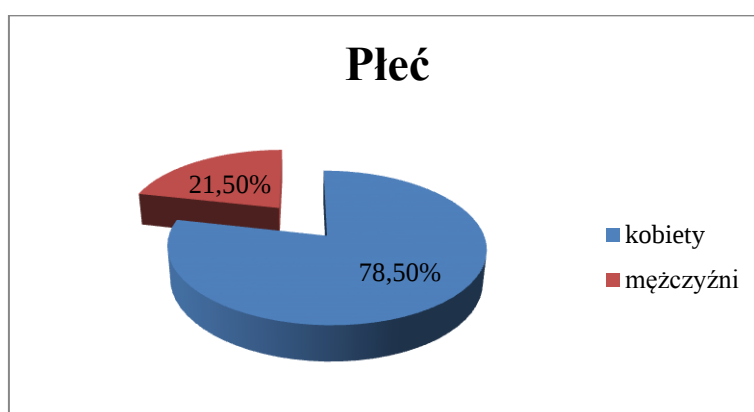
Na podstawie dokonanych badań rozkładu wielkości cząstek emulsji kosmetycznych zawierających β -karoten, likopen oraz astaksantynę techniką dyfrakcji laserowej. Stwierdzono, że najbardziej stabilnym typem formułacja jest emulsja typu O/W sporządzona na zimno, fakt ten zawdzięcza swojemu składowi, jak i sposobowi przygotowania. Warunki przechowywania emulsji O/W na zimno nie miały znacznego wpływu na zmianę stabilności tej formułacji. Rozkład wielkości cząstek emulsji nie zmienia się po użyciu ultradźwięków, które mają za zadanie rozbicie aglomeratów, będących oznaką postępującego procesu destabilizacji emulsji. Na stabilność emulsji typu O/W oraz W/O miały wpływ warunki przechowywania. Przechowywanie emulsji w temperaturach: 4°C oraz w temperaturze pokojowej bez dostępu światła nie spowodowało zmian w rozkładzie wielkości cząstek emulsji, co świadczy o ich stabilności. Karotenoidy są związkami, które charakteryzują się wysoką niestabilnością pod wpływem podwyższonej temperatury dlatego w temperaturach

pokojuowej z dostępem światła oraz w 45°C zaobserwowano proces destabilizacji badanych emulsji.

6.9. Badania *in vivo* przeprowadzone na probantach z wykorzystaniem samodzielnie przygotowanych emulsji kosmetycznych zawierających β -karoten

Na podstawie badań stabilności przeprowadzonych przy użyciu metod: wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz metody wielokrotnego rozpraszania światła zaobserwowano, że najbardziej stabilnym typem jest emulsja O/W sporządzona na zimno, dlatego też została ona wykorzystana w badaniach *in vivo* przeprowadzanych na probantach oraz badaniach biodostępności za pomocą metody strippingu. Wpływu rodzaju karotenoidu na stabilność formulacji nie zaobserwowano, dlatego też wybrałam β -karoten, który jest najbardziej popularnym oraz wydajnym karotenoidem.

W badaniu brało udział 28 probantów, 22 kobiety (78,5%) oraz 6 mężczyzn (21,5%) w wieku od 21 do 27 lat (rys. 78). Na rysunku 79 przedstawiono samodzielnie przygotowane kremy zawierające β -karoten oraz kremy placebo wykorzystywane w doświadczeniu.

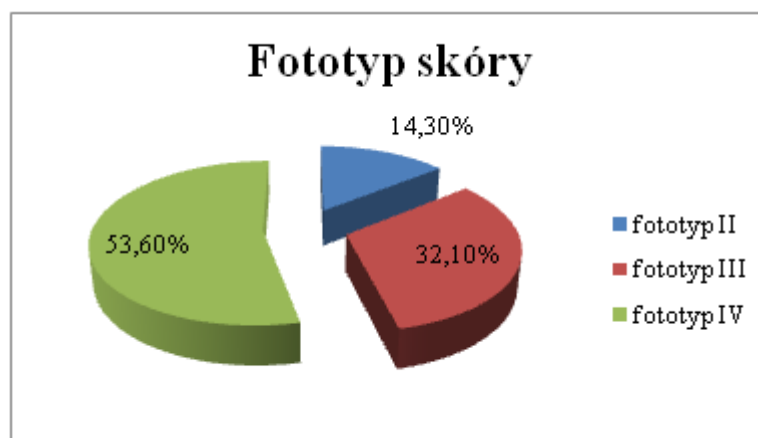


Rys. 78. Podział probantów ze względu na płeć.



Rys. 79. Zdjęcie przedstawiające samodzielnie przygotowane kremy zawierające β -karoten (lewa część) oraz kremy placebo (bez substancji aktywnej) wykorzystywane w doświadczeniu.

Na podstawie ankiety (zał. 7.) stwierdzono, że probanci posiadają fototyp skóry II - IV, wg klasyfikacji Fitzpatricka (tab.46): fototyp II - 4 osoby (14,3%), fototyp III - 9 osób (32,1%), fototyp IV - 15 osób (53,6%) (rys. 80) [349].



Rys. 80. Podział probantów ze względu na fototyp skóry wg klasyfikacji Fitzpatricka.

Tab. 46. Fototyp skóry wg klasyfikacji Fitzpatricka [350].

Fototyp	Oparzenia słoneczne, występowanie opalenizny	Opalenizna po ekspozycji na promieniowanie nadfioletowe (efekt natychmiastowy)	Opalenizna po ekspozycji na promieniowanie nadfioletowe (efekt opóźniony)	Kolor skóry
I	skóra łatwo ulegająca poparzeniom, nigdy nie opalająca się	brak	brak	kość słoniowa
II	skóra łatwo ulegająca poparzeniom, minimalnie i trudno opalająca się	słaba	minimalna do słabej	biały
III	skóra umiarkowanie ulegająca poparzeniom, umiarkowanie i równomiernie opalająca się	umiarkowana	umiarkowana	biały
IV	skóra minimalnie ulegająca poparzeniom, łatwo opalająca się	średnio	średnia	jasnobrązowy, oliwkowy
V	skóra rzadko ulegająca poparzeniom, mocno opalająca się	mocna (brąz)	mocna, intensywny brąz	umiarkowany brąz
VI	skóra nie ulegająca poparzeniom, mocno opalająca się	mocna (ciemny brąz)	mocna, intensywny brąz	ciemny brąz lub czarny

Probandzi stwierdzili, że największym przesuszeniem ciała dotknięte były okolice twarzy, kończyn górnych i dolnych (tab. 47), które trwają od wielu lat (n=14), bądź też od paru miesięcy (n=14).

Tab. 47. Lokalizacja przesuszenia ciała.

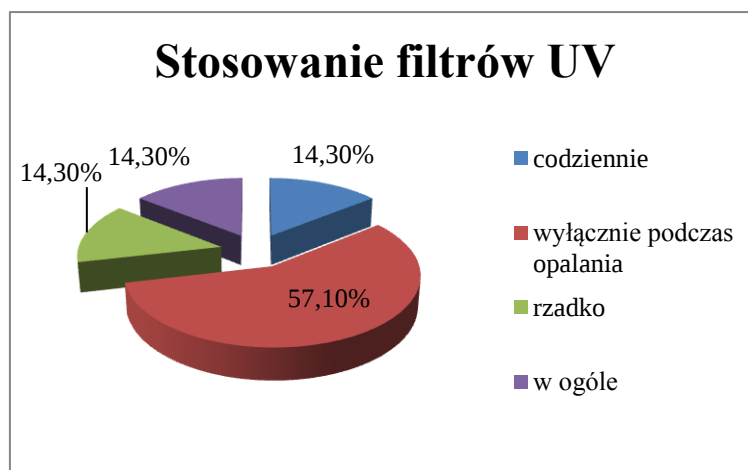
Lokalizacja	Liczba badanych (n)	%
twarz	22	78,6
plecy	3	10,7
kończyna górna	15	53,6
kończyna dolna	11	39,3

Przyczyna przesuszenia skóry jest wrodzona (n=6), natomiast wg pozostałej części uczestników jest ona nabyta (n=22), spowodowana czynnikami przedstawionymi w tab.48.

Tab. 48. Czynniki będące przyczyną przesuszenia skóry.

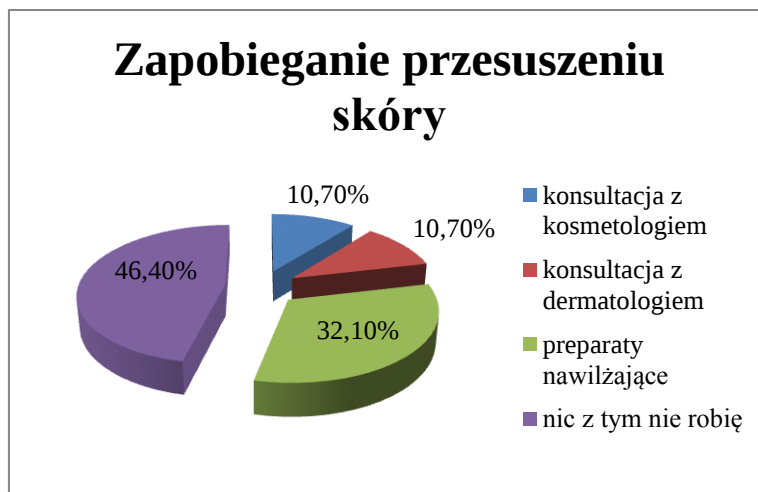
Czynnik przesuszenia skóry	Liczba badanych (n)	%
promieniowanie UV	9	32,1
lecniczne	2	7,1
kosmetyczne	8	28,6
zmiany hormonalne	2	7,1
inne zaburzenia endokrynologiczne	7	25
leki	1	3,6
urazy mechaniczne	1	3,6

Na podstawie ankiety 3, aż 35,7% badanych (n=10) uległo poparzeniu słonecznemu w przeszłości. Wśród probantów, 85,7% (n=24) stosuje ochronę przeciwsłoneczną, codziennie stosuje ją 14,3% (n=4), 57,1% (n=16) wyłącznie podczas opalania, natomiast 28,6% (n=8) ochotników nie stosuje jej wcale lub rzadko (rys. 81).



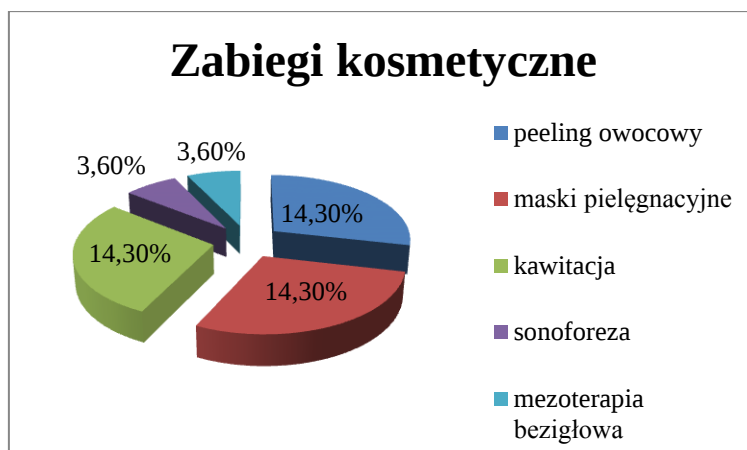
Rys. 81. Częstotliwość stosowania ochrony przeciwsłonecznej probantów.

Przed rozpoczęciem badania ankietowani konsultowali się z kosmetologiem (n=3) i dermatologiem (n=3) w celu rozwiązania problemu przesuszonej skóry, 9 osób stosowało preparaty pielęgnacyjne oraz nawilżające, natomiast 13 probantów nie stosowało żadnych preparatów poprawiających kondycję skóry (rys. 82).



Rys. 82. Podjęte działania w celu poradzenia sobie z problemem przesuszonej skóry.

Tylko 14,3% (n=4) uczestników korzystało wcześniej z zabiegów nawilżających, natłuszczających i uelastyczniających skórę. Poddali się m.in.: peelingom owocowym (chemicznym) (n=4), kawitacji (n=3), sonoforezie (n=1), mezoterapii bezigłowej (n=1) oraz stosowali maski nawilżające, natłuszczające i uelastyczniające (n=4) (rys. 83).



Rys. 83. Zabiegi kosmetyczne wykonywane w celu poprawienia kondycji skóry.

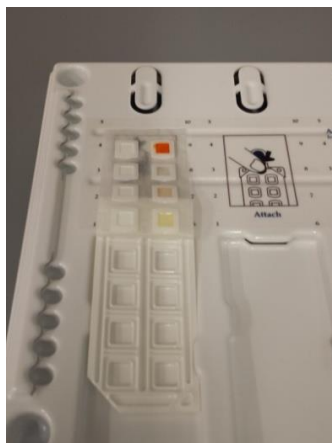
Żaden z probantów nie stosował wcześniej kosmetyków bądź też suplementów diety z β -karotenem.

6.9.1. Aplikacja TRUE testów

Wyniki przeprowadzonych testów służą ocenie działania drażniącego. Wyniki te zostały zinterpretowane za pomocą tabeli 49.

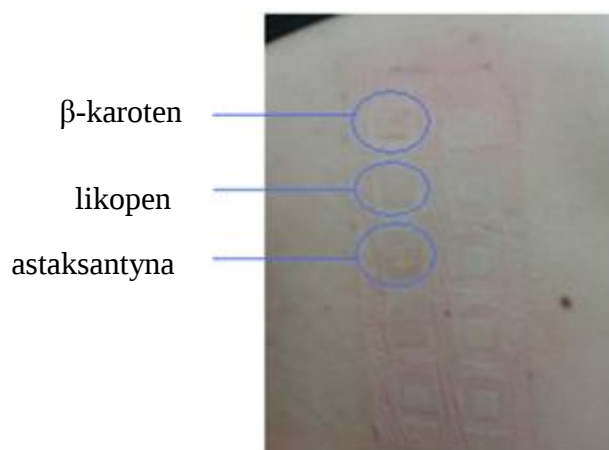
Tab. 49. Interpretacja i zapis wyników TRUE testu, wg ICDRG [200].

Zapis	Interpretacja	Opis – wygląd
-	negatywny	brak reakcji
? ⁺	odczyn wątpliwy	subtelny rumień
+	słaby odczyn	rumień, naciek, ewentualne grudki
++	silny odczyn	rumień, naciek, grudki, pęcherzyki
+++	odczyn skrajnie nasilony	pęcherze lub owrzodzenia
IR	podrażnienie	odczyn odgraniczony od miejsca przylegania substancji, wygasający od momentu usunięcia testu, możliwe wybroczyny, krostki, brak grudek, pęcherzyków

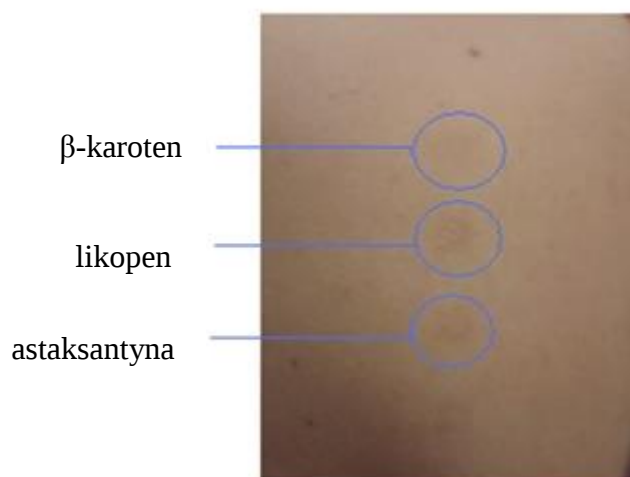


Rys. 84. TRUE test przygotowany do aplikacji.

Na rys. 84 przedstawiono gotowe do aplikacji TRUE testy. Po zdjęciu plastrów zauważalne były odciski komory, w której znajdowały się β -karoten, likopen oraz astaksantyna. 27 probantów otrzymało wynik negatywny (-) (rys. 85,86). Oznacza to, że nie reagują alergicznie na badane związki. Natomiast 1 osoby pojawił się odczyn wątpliwy (?⁺) (rys.87), na skórze widoczny był subtelny rumień.

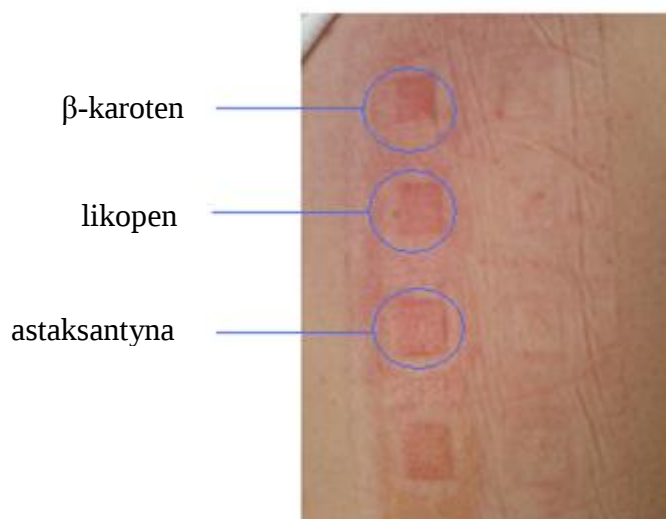


Rys. 85. Zdjęcie skóry probanta nr 5 zaraz po zdjęciu TRUE testu, u którego wynik testu był negatywny (-).



Rys. 86. Zdjęcie kontrolne pleców probanta nr 16 po 96 godzinach od nałożenia TRUE testu.

Po upływie 96 godzin od nałożenia TRUE testu, sprawdzono kontrolnie poddaną badaniu skórę probantów. Widoczny był delikatny odcisk komory testowej (rys. 87).

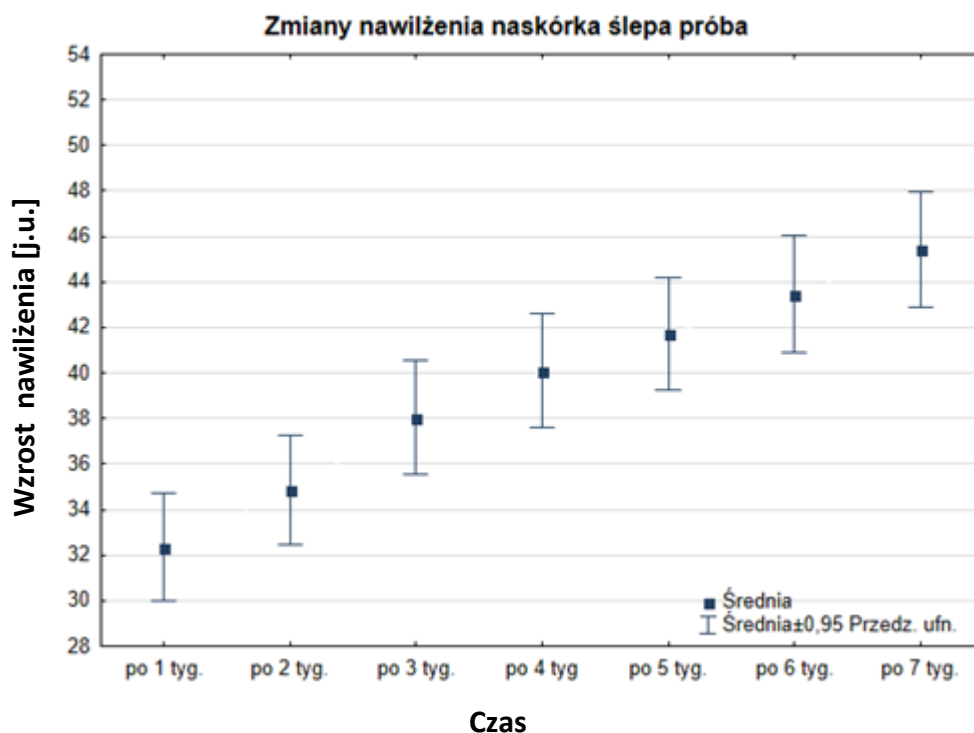


Rys. 87. Zdjęcie skóry probanta nr 10 zaraz po zdjęciu TRUE testu, u którego wynik testu był wątpliwy (?⁺).

Po aplikacji TRUE testów wszystkim probantom, stwierdzono, że osoby te nie posiadają odczynu pozytywnego na badane związki, czyli nie są na nie uczulone. Nie było żadnych przeciwwskazań do ich uczestnictwa w dalszych badaniach. Należy nadmienić, że plastry zostały opracowane tak, aby zapewnić najwyższą biodostępność substancji. TRUE test uznawany jest jako jedyny naskórkowy test płatkowy posiadający akceptację FDA oraz jedyny zgodny z prawem Unii Europejskiej dotyczącym produktów leczniczych, a więc wszystkie przygotowane formułacje mogły zostać przebadane pod kątem badań aplikacyjnych (zgodą Komisji Bioetycznej w zał. 1).

6.9.2. Wpływ testowanego preparatu na poziom nawilżenia naskórka probantów

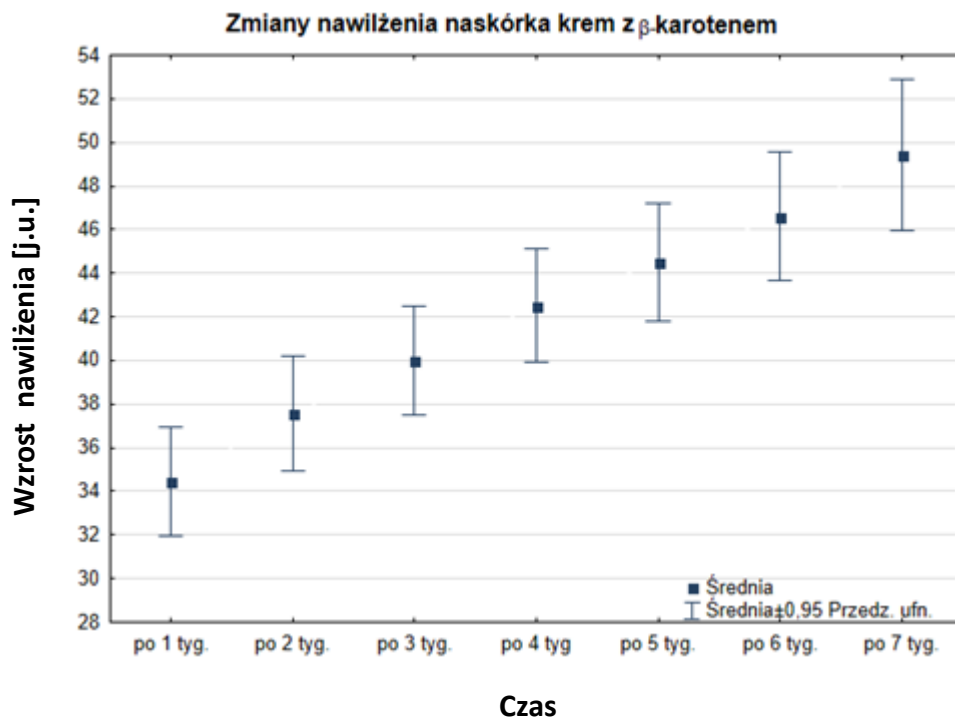
Zadaniem preparatów nawilżających nie jest wprowadzanie w skórę wody, lecz ograniczanie jej ucieczki ze skóry właściwej. Najbardziej efektywną metodą nawilżania skóry jest wzmacnianie barier hamujących utratę wody. Zmniejszenie parowania wody z naskórka jest bezpośrednio związane ze wzrostem jego nawilżenia.



Rys. 88. Wzrost nawilżenia naskórka od momentu nałożenia preparatu oraz po kolejnych tygodniach stosowania preparatu nie zawierającego β -karotenu.

Wyniki badań wykazały, że emulsja niezawierająca β -karotenu istotnie zwiększyła nawilżenie *stratum corneum*. Jest to związane z obecnością w składzie emulsji lipidów, które uzupełniają lub modyfikują naturalny płaszcz wodno - lipidowy oraz cement międzykomórkowy. W związku z tym hamują TEWL poprzez tworzenie okluzji oraz zwiększają nawilżenie naskórka wbudowując się w lipidy cementu. Średnia wartość nawilżenia, która została zmierzona probantom przed rozpoczęciem stosowania emulsji wynosiła 31,88 j.u. Po pierwszym tygodniu stwierdzono zmianę o 1,5%. Natomiast statystycznie istotną różnicę w stopniu nawilżenia naskórka zaobserwowano już po drugim tygodniu stosowania emulsji, gdzie nawilżenie wzrosło o 8%. Po 3-tygodniowym okresie stosowania formulacji nawilżenie wzrosło o 16% w porównaniu ze stanem wyjściowym, co świadczy o bardzo dobrych właściwościach nawilżających emulsji (rys. 88). Do czwartego tygodnia wzrost nawilżenia miał charakter liniowy. Po czterech tygodniach zauważono wzrost nawilżenia o 23%, co świadczy o skuteczności przygotowanej emulsji oraz trafności w doborze jej składu. Po pięciu tygodniach również uzyskujemy wzrostu badanego parametru o 29%. W 6 tygodniu badań, potwierdzono oczekiwane założenia. Samodzielnie przygotowana

emulsja spowodowała wzrost nawilżenia skóry probantów aż o 34%. Największy wzrost nawilżenia zaobserwowano po 7 tygodniach badania. Nawilżenie probantów w krótkim czasie wzrosło o 42%. Można wyciągnąć wniosek, że analizowana emulsja, jest kosmetykiem poprawiającym nawilżenie skóry.



Rys. 89. Wzrost nawilżenia naskórka od nałożenia preparatu oraz po kolejnych tygodniach stosowania preparatu z β -karotenem.

Z analizy wyników dla emulsji z β -karotenem wynika, że w istotny sposób wpływała ona na wzrost stopnia nawilżenia naskórka. Podczas regularnego stosowania preparatu nawilżenie wzrastało o 9% po pierwszym tygodniu stosowania. W kolejnym tygodniu zauważono u badanych probantów wzrost nawilżenia o 18%. Po badaniu, które zostało przeprowadzone w trzecim tygodniu zanotowano wzrost nawilżenia o 24%. Można zauważyć liniowy wzrost parametru względem czasu. Po 4 tygodniach zaobserwowano wzrost parametru o 33%. Można wysunąć wniosek, że składnik aktywny emulsji to składnik hydrofobowy. Tworzy on na powierzchni naskórka nieprzepuszczalny dla parującej wody filtr. Substancja aktywna o charakterze hydrofobowym wnika do naskórka uzupełniając tym samym lipidy ochronnej warstwy naskórka, dzięki czemu w trakcie stosowania takiej emulsji parametr nawilżenia wzrasta. Po pięciu tygodniach stosowania emulsji stwierdzono wzrost o 39%. Po 6 tygodniu badań zaobserwowano zmianę nawilżenia o 46%. Po 7 tygodniach stosowania kremu z β -karotenem zauważalny jest wzrost stopnia nawilżenia naskórka probantów średnio o 55% (rys. 89), natomiast po aplikacji kremu bez substancji aktywnej wzrost ten wyniósł 42% (rys. 88). Zaobserwowano, że już po pierwszym tygodniu poziom nawilżenia wzrasta i cały czas rośnie, aż do zakończenia badania.

Na podstawie ankiety (zał.7.), którą probanci mieli za zadanie wypełnić, określono ich stopień zadowolenia z efektów nawilżenia naskórka po aplikacji kremów. W ankiecie ustalono 4 - stopniową skalę satysfakcji, przedstawioną w tab. 50.

Tab. 50. Skala satysfakcji wynikająca z aplikowanych kremów.

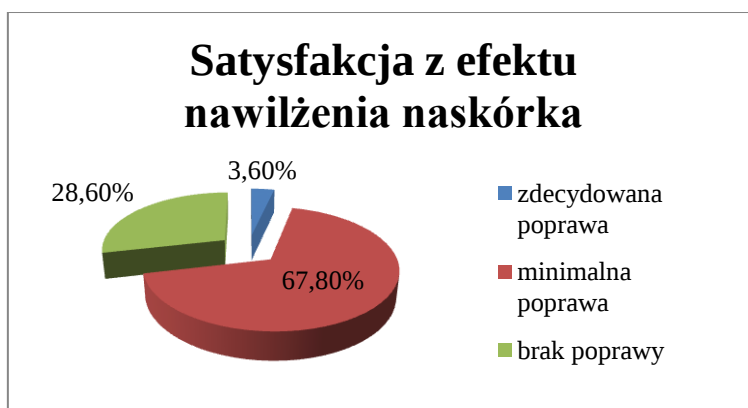
Nota	Poziom satysfakcji
0	pogorszenie
1	brak poprawy
2	minimalna poprawa
3	zdecydowana poprawa

Po analizie wyników obydwóch kremów stwierdzono, że po aplikacji kremu z β -karotenem 20 ochotników (71,4%) zauważyło zdecydowaną poprawę nawilżenia, a 8 (28,6%) twierdzi, że odczuło minimalną poprawę nawilżenia naskórka (rys. 90).



Rys.90.Poziom satysfakcji z efektu nawilżenia naskórka po aplikacji kremu z β -karotenem.

Po zastosowaniu kremu bez substancji aktywnej, 8 ankietowanych (28,6%) nie zauważyło poprawy w nawilżeniu, 19 (67,8%) stwierdziło minimalną poprawę, zaś 1 osoba (3,6%) dostrzegła zdecydowaną poprawę (rys. 91).



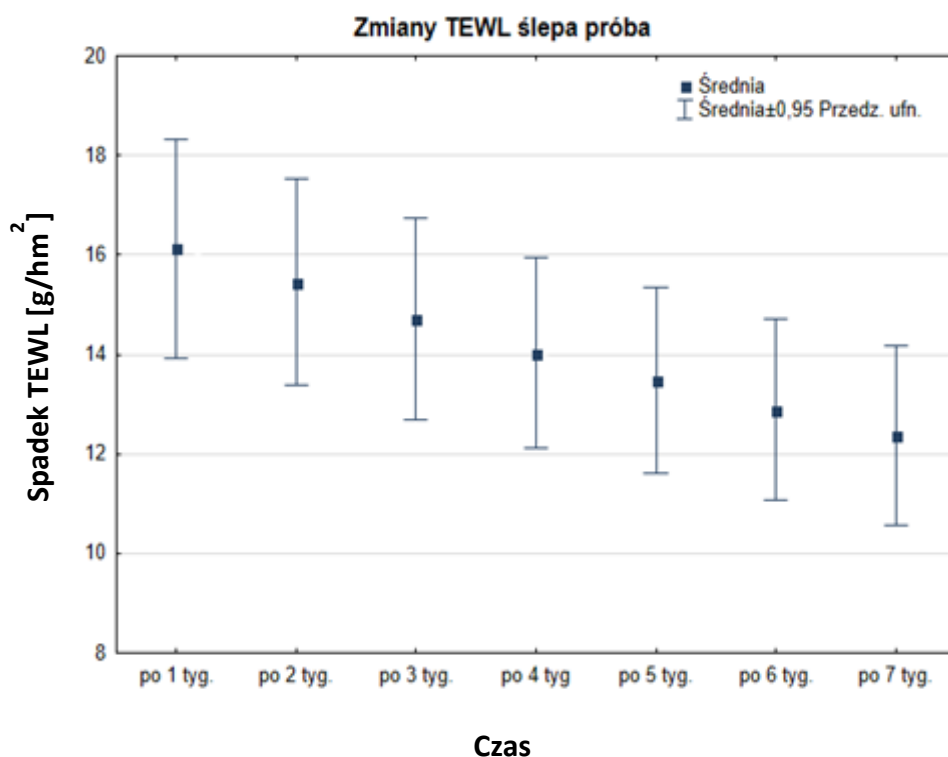
Rys. 91. Poziom satysfakcji z efektu nawilżenia po aplikacji kremu bez substancji aktywnej.

Wyniki ankietowanych są zgodne z pomiarami wykonanymi przy użyciu korneometru. Nawilżenie naskórka probantów widocznie poprawia się już po 4 tygodniu stosowania

kremów. Uzyskane wyniki wskazują na korzystny wpływ dodatku β -karotenu na właściwości nawilżające używanej emulsji. Karotenoid ten jest substancją rozpuszczalną w tłuszczach, co stanowi podstawę do stwierdzenia, że może on pełnić rolę hydrofobowej substancji błonotwórczej. Składnik ten zmniejsza odparowanie wody przez efekt okluzyjny, tworząc ciekłą warstwę na powierzchni skóry.

6.9.3. Wpływ testowanego preparatu na wartość TEWL

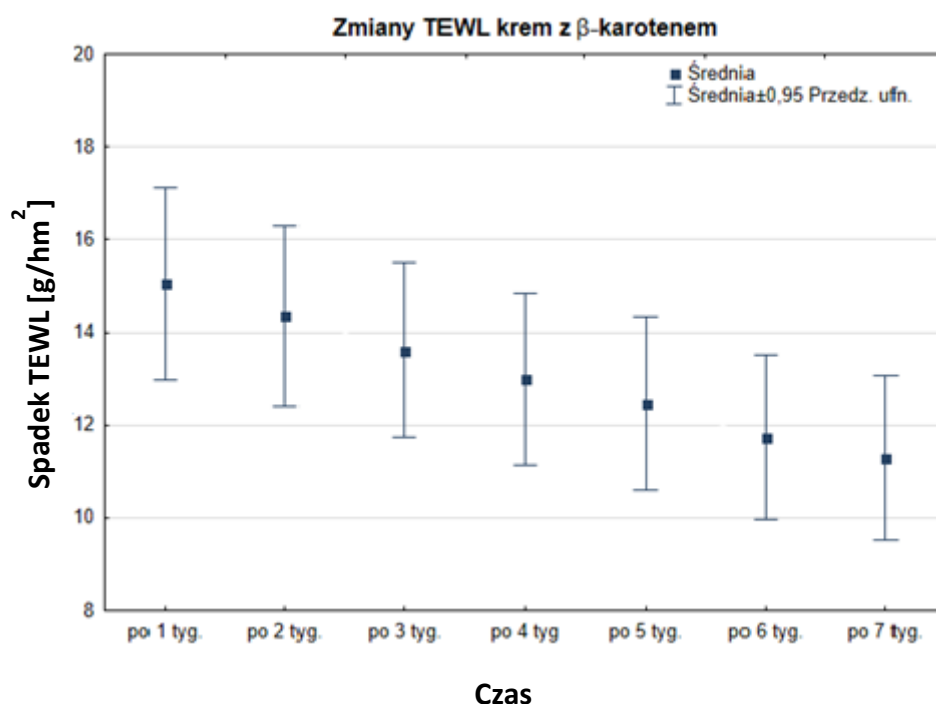
Zdolność zatrzymywania wody przez *stratum corneum* jest ważnym parametrem regulującym nawilżanie skóry. Skóra właściwa zawiera 80% wody, natomiast warstwa rogowa naskórka tylko 13%. Wygląd skóry związany jest z zatrzymywaniem wody w naskórku.



Rys. 92. Spadek TEWL od nałożenia preparatu oraz po kolejnych tygodniach stosowania preparatu bez β -karotenu.

Na podstawie analizy badań dla ślepej próby można stwierdzić, że TEWL się zmniejszył. Średnia wartość TEWL, która została zmierzona probantom przed rozpoczęciem stosowania emulsji wynosiła 17,2 [g/hm²]. Spowodowane jest to utworzeniem lipofilowego filmu okluzyjnego na powierzchni naskórka, który utrzymuje się do momentu użycia środków myjących. W wyniku regularnego stosowania preparatów następuje działanie okluzyjne surowców tłuszczowych oraz działanie fizykochemiczne na cement międzykomórkowy. Lipidy wbudowują się w struktury cementu, przez co możliwa jest zmiana właściwości bariery naskórkowej. Szczelność filmu okluzyjnego zależy od ilości składników lipidowych w recepturze kremu, oraz od ich budowy chemicznej. Kiedy z lipidami cementu miesza się

określony surowiec obserwujemy bezpośredni wpływ na barierę naskórkową, natomiast wpływ pośredni ma miejsce, gdy surowiec zmienia właściwości bariery dopiero wtedy, kiedy ulegnie przemianie chemicznej. Obecny w recepturze uwodorniony polideken, to czynnik filmotwórczy, chroniący przed parowaniem wody z naskórka. Po pierwszym tygodniu zauważono spadek TEWL o 6%. Po dwóch tygodniach stosowania kremu obserwujemy spadek TEWL o 10 %, co może świadczyć o utworzeniu się lipofilowego filmu okluzyjnego na powierzchni naskórka, dzięki składnikom badanej emulsji, który spowalnia proces niekorzystnej przeznaskórkowej utraty wody. Po trzech tygodniach zauważono liniowy spadek TEWL o 14%. Natomiast po czterech tygodniach wartość analizowanego parametru zmalała o 18%. Można stwierdzić, że zawarty w recepturze uwodorniony polideken spełnia swoją rolę czynnika filmotwórczego, który ma chronić przed parowaniem wody z naskórka, powodując spadek mierzonej wartości. Po kolejnym tygodniu, tendencja liniowego spadku została utrzymana. Zaobserwowano spadek TEWL o 22%. Natomiast po sześciu tygodniach zauważono zmianę analizowanego parametru o 25%. Po 7 tygodniach TEWL spada o 28%. Można wysunąć wniosek, że przygotowana emulsja spełnia oczekiwane zadanie. W wyniku regularnego stosowania preparatów następuje działanie okluzyjne surowców tłuszczowych, co powoduje ochronę skóry probantów przed nadmierną przeznaskórkową utratą wody. Na podstawie przeprowadzonych badań można wysunąć wniosek, że TEWL zmniejszał się wraz z czasem stosowania kremu (rys. 92). Wartość TEWL maleje, ponieważ zachodzi scalanie/sklejanie nieregularnych komórek na skutek aplikacji kremu placebo (rośnie bariera ochronna).



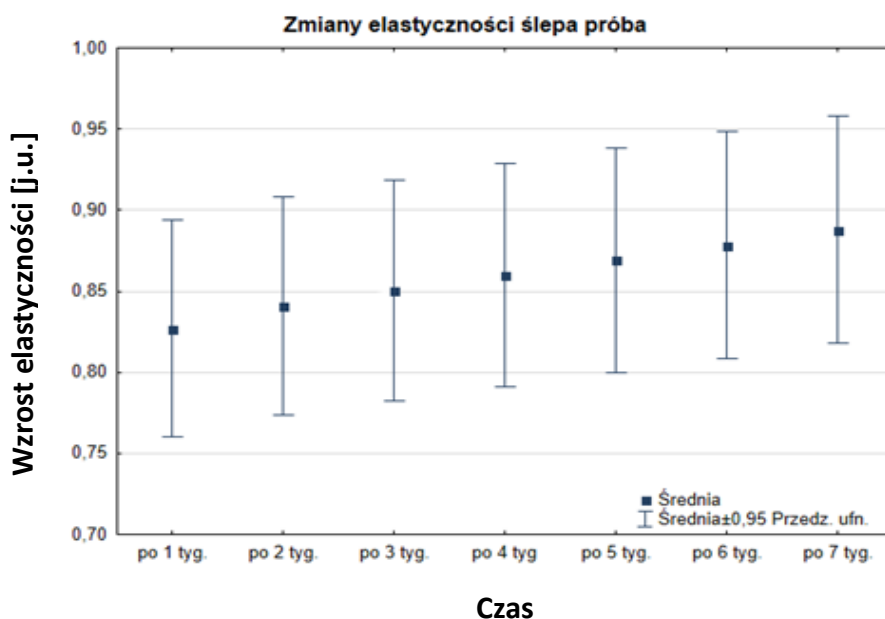
Rys. 93. Spadek TEWL od nałożenia preparatu oraz po kolejnych tygodniach stosowania preparatu z β -karotenem.

Spadek wartości TEWL po pierwszym tygodniu badań wyniósł 12,5%. Spadek wartości TEWL po drugim tygodniu stosowania kremu z substancją aktywną zmieniła się o 16%. Po trzech tygodniach stwierdzono niewielki spadek TEWL o 21%. W kolejnych tygodniach analogicznie do zmiany TEWL ślepej próby można zaobserwować spadek liniowy, który zmienił się o 25% po czwartym tygodniu oraz o 28% po piątym tygodniu doświadczeń. W dwóch ostatnich tygodniach badań można zauważyć największy spadek wartości TEWL o 32% w 6 tygodniu oraz o 34% w 7 tygodniu badań (rys. 93). Stwierdzono, że już po pierwszym tygodniu używania kremów, poziom TEWL maleje i cały czas spada w trakcie trwania eksperymentu.

Regularne stosowanie preparatu z β -karotenem poprawia bilans wodny skóry, co jest spowodowane dobrym działaniem filmotwórczym oraz wysokim powinowactwem do powierzchni skóry. Stale wilgotna warstwa substancji na powierzchni skóry zmniejsza gradient stężeń wody w skórze obniżając tym samym TEWL. Wartość TEWL maleje, ponieważ tak jak w przypadku kremu placebo zachodzi scalanie/sklejanie nieregularnych komórek na skutek aplikacji kremu z β -karotenem (rośnie bariera ochronna).

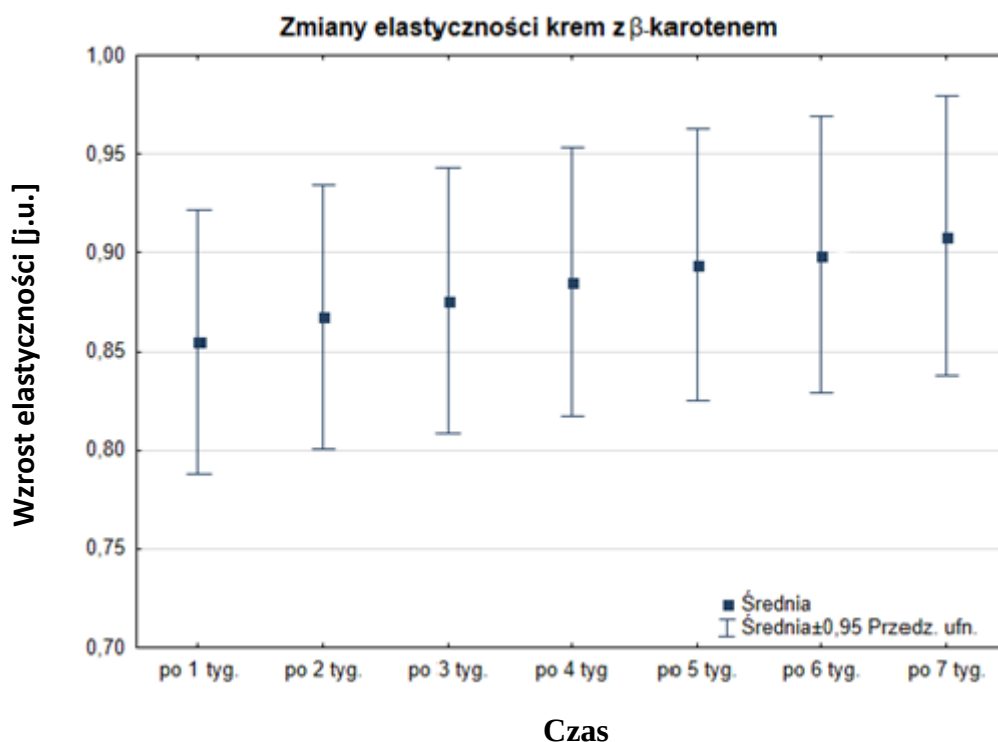
6.9.4. Wpływ testowanego preparatu na poziom elastyczności naskórka probantów

Elastyczność skóry jest to biomechaniczna cecha skóry właściwej, która składa się z tkanki łącznej zwartej. Tkanka ta zawiera włókna kolagenowe i elastynowe, które są odpowiedzialne za omawianą właściwość skóry. Wraz z upływem czasu naturalny proces produkcji włókien kolagenowych i elastynowych ulega zahamowaniu. Upośledzona zostaje synteza oraz aktywność fibroblastów, które nie spełniają już swojej funkcji. Powoduje to spadek elastyczności skóry, która staje się zwiotczała, wysuszona, cieńsza oraz pozbawiona blasku i witalności. Wtedy właśnie pojawiają się pierwsze zmarszczki, a kondycja skóry znacznie spada.



Rys. 94. Wzrost elastyczności naskórka od momentu nałożenia preparatu oraz po kolejnych tygodniach stosowania preparatu bez β -karotenu.

Średnia wartość parametru elastyczności, która została zmierzona probantom przed rozpoczęciem stosowania emulsji wynosiła 0,7588 j.u. Po pierwszym tygodniu zaobserwowano wzrost badanego parametru o 10%. Po dwóch tygodniach stosowania emulsji bez β -karotenu zauważono wzrost elastyczności o 12%, po kolejnym tygodniu stwierdzono wzrost parametru o 13%. Po czwartym tygodniu wartość elastyczności wzrosła o 14%. Dostrzeżono kolejny raz tendencję liniowego wzrostu badanego parametru. Po kolejnym tygodniu badań zauważono zwiększenie wartości elastyczności o 15%. Liniowy wzrost wartości elastyczności zanotowano również po 6 tygodniach. Badana wartość zmieniła się o 16%. Zaobserwowano poprawę vitalności, zmniejszenie wysuszenia oraz ogólną poprawę kondycję skóry. Najbardziej istotny wzrost wartości elastyczności stwierdzono w tygodniu 7. Wartość ta wzrosła o 17%. Można stwierdzić zależność wzrostu elastyczności od czasu trwania badań. Im dłużej stosowany był kosmetyk tym bardziej zauważalny był wzrost parametru elastyczności badanych probantów.



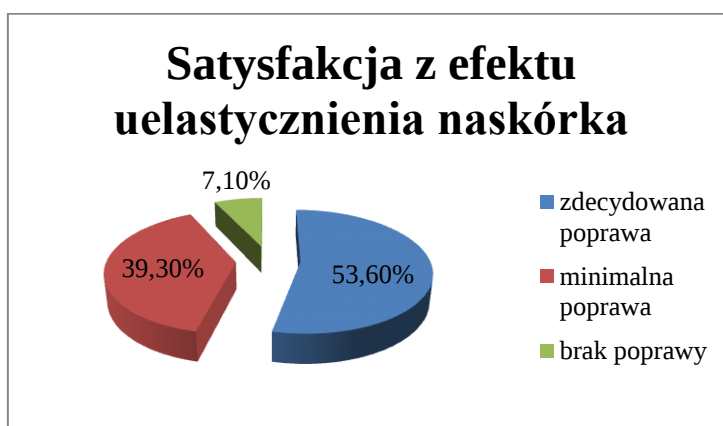
Rys. 95. Wzrost elastyczności naskórka od momentu nałożenia preparatu oraz po kolejnych tygodniach stosowania preparatu z β -karotenem.

Wzrost wartości elastyczności następował w sposób liniowy: po pierwszym tygodniu stosowania kremu wyniósł 13%. Wzrost badanej wartości dla kremu z β -karotenem w drugim tygodniu badań wyniósł 14%. Natomiast w trzecim tygodniu zauważono zmianę o 15%. W kolejnym tygodniu zanotowano zmianę badanej wartości o 16%. W piątym tygodniu zauważono wzrost elastyczności o 17%. W szóstym tygodniu zanotowano wzrost badanej wartości o 18%. W ostatnim tygodniu badań elastyczność wzrosła o 20%.

Wynioskowano, że poziom elastyczności rósł już po pierwszym tygodniu aplikacji kremów i ciągle wzrastał, aż do zakończenia badania. β -karoten może wpływać na poprawę

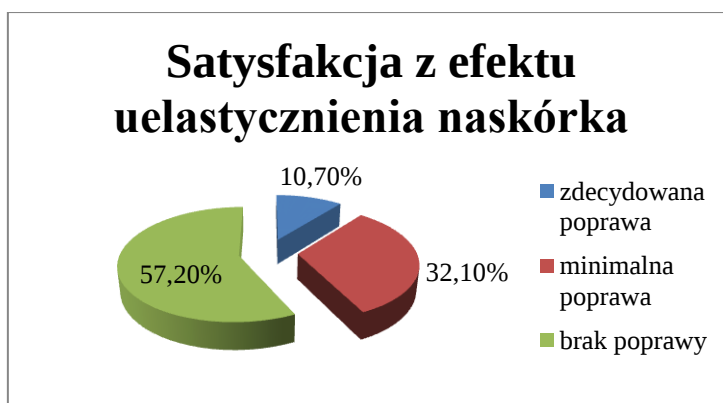
elastyczności skóry w następujący sposób: stymuluje fibroblasty do syntezy kolagenu i elastyny, powodując tym samym widoczny wzrost gęstości skóry. Odbudowuje i regeneruje zerwane włókna kolagenowe wskutek destrukcyjnego działania promieni UV. Powoduje osłabienie działania enzymów kolagenozy i elastazy, które są odpowiedzialne za obniżenie badanego parametru (rys. 95).

Tak samo jak w podrozdziale 6.2 przeprowadzono odczyt satysfakcji efektu uelastycznienia naskórka po aplikacji kremu z β -karotenem. 15 ankietowanych (53,6%) stwierdziło, że poprawa była zdecydowana, 11 osób (39,3%) poprawę określiło jako minimalną, zaś 2 ochotników (7,1%) nie zauważyło jej w ogóle (rys. 96).



Rys. 96. Poziom satysfakcji z efektu uelastycznienia naskórka po aplikacji kremu z β -karotenem.

Po stosowaniu kremu bez substancji aktywnej 16 probantów (57,2%) nie stwierdziło poprawy elastyczności naskórka, 9 osób (32,1%) zauważyło minimalną poprawę, a 3 (10,7%) ochotników dostrzegło zdecydowaną poprawę (rys. 97).



Rys. 97 Poziom satysfakcji z efektu uelastycznienia naskórka po aplikacji kremu bez substancji aktywnej.

Udzielone odpowiedzi probantów potwierdzają działanie kremów i są porównywalne z pomiarami wykonanymi przy użyciu kutometru. Już po czterech tygodniach stosowania kremów widoczna jest poprawa elastyczności naskórka.

6.9.5. Prezentacja testów zastosowanych w ocenie statystycznej parametrów nawilżenia, transepidermalnej utraty wody oraz elastyczności

W celu wybrania poprawnych testów do porównań lub korelacji sprawdzono zgodność z rozkładem normalnym (test Shapiro - Wilka). W przypadku porównania wyników TEWL, nawilżenia i elastyczności pomiędzy kremem a placebo, kiedy i krem i placebo spełniało kryterium normalności w celu wykrycia różnic stosowano parametryczny test t dla zmiennych niepowiązanych.. W tabeli 51 przedstawiono wyniki tego testu.

Tab. 51. Wyniki testu Shapiro - Wilka.

NORMALNOŚĆ	TEWL		nawilżenie		elastyczność	
	placebo	krem	placebo	krem	placebo	krem
1 tydzień	tak	tak	tak	tak	nie	nie
2 tydzień	tak	tak	tak	tak	nie	nie
3 tydzień	tak	tak	tak	tak	nie	nie
4 tydzień	nie	nie	tak	tak	nie	nie
5 tydzień	tak	nie	tak	tak	nie	nie
6 tydzień	nie	nie	tak	tak	nie	nie
7 tydzień	nie	tak	tak	nie	nie	nie

Na podstawie wyników testów Shapiro - Wilka wyciągnięto wnioski, że wartości TEWL oraz nawilżenie zarówno dla kremów i kremów placebo spełniają kryterium normalności. Natomiast wartość elastyczność dla kremu jak i dla kremu placebo tego kryterium nie spełnia, czyli nie jest istotne statystycznie.

W przypadku porównania wyników TEWL, nawilżenia i elastyczności pomiędzy kremem z β -karotenem a placebo, kiedy spełniały one kryterium normalności, w celu wykrycia różnic stosowano parametryczny test t dla zmiennych niepowiązanych.

Test Friedmana jest nieparametrycznym odpowiednikiem jednoczynnikowej analizy wariancji dla pomiarów powtarzanych. By uzyskać wiedzę o różnicach dla fragmentu naszego złożonego układu stosujemy procedury porównań wielokrotnych czyli **testy post - hoc**. Testem post - hoc sprawdzono, czy istnieją statystycznie istotne różnice między poszczególnymi tygodniami badania dla kremu z β -karotenem oraz placebo. W tabeli 52 pokazane są wyniki tej analizy.

Tab. 52. Wyniki badanych parametrów przeprowadzone przy użyciu testu post - hoc.

Porównanie wyników pomiędzy poszczególnymi tygodniami						
	TEWL		nawilżenie		elastyczność	
	placebo	krem	placebo	krem	placebo	krem
1 tydzień & 2 tydzień	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1 tydzień & 3 tydzień	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p<0,05	ns	p<0,01
1 tydzień & 4 tydzień	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
1 tydzień & 5 tydzień	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
1 tydzień & 6 tydzień	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
1 tydzień & 7 tydzień	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
2 tydzień & 3 tydzień	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2 tydzień & 4 tydzień	p<0,01	p<0,05	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p<0,05
2 tydzień & 5 tydzień	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
2 tydzień & 6 tydzień	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
2 tydzień & 7 tydzień	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
3 tydzień & 4 tydzień	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3 tydzień & 5 tydzień	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,01	p<0,05	p<0,05
3 tydzień & 6 tydzień	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
3 tydzień & 7 tydzień	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
4 tydzień & 5 tydzień	ns	ns	ns	ns	ns	ns
4 tydzień & 6 tydzień	p<0,05	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,05	ns
4 tydzień & 7 tydzień	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
5 tydzień & 6 tydzień	ns	ns	ns	ns	ns	ns
5 tydzień & 7 tydzień	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,01	ns
6 tydzień & 7 tydzień	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns - nieistotne statystycznie (czyli $p > 0,05$).

6.9.6. Kontrola jakości stosowanych kremów

Zgodnie z kontrolą jakości kremów kosmetycznych (wg normy BN-64/6140-02) [314] określono następujące cechy (tab. 53):

- wygląd,
- barwę,
- zapach,
- stabilność.

Tab. 53. Cechy badanej emulsji kosmetycznej przeprowadzonej wg normy BN-64/6140-02.

Cechy emulsji kosmetycznej (wg normy BN-64/6140-02)	Cechy użytej w badaniach emulsji kosmetycznej
wygląd	gładka, jednolita masa
barwa	jasnopomarańczowa
zapach	przyjemny
stabilność	krem nie rozwarstwia się

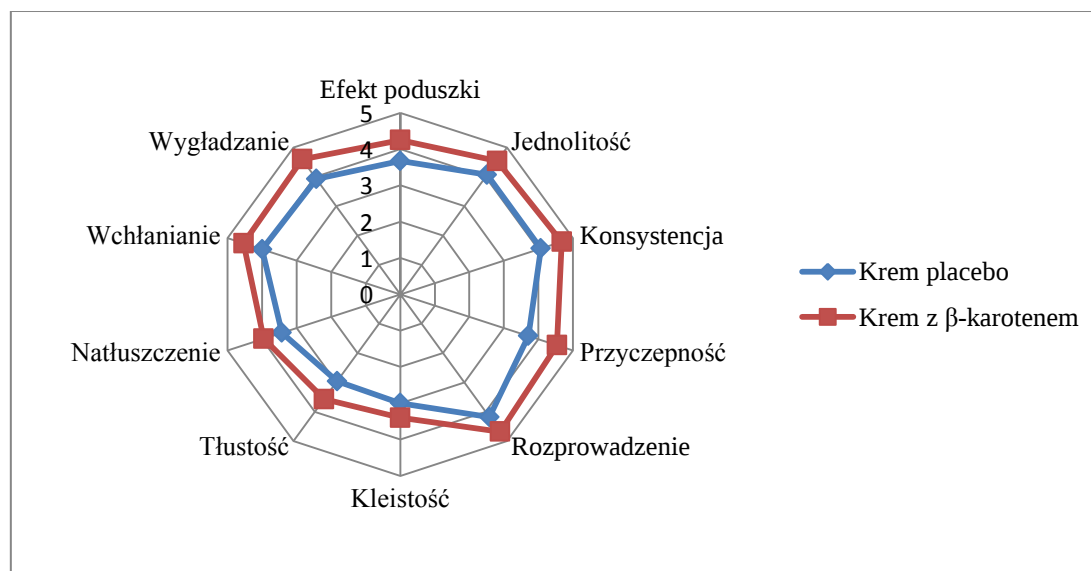
6.9.7. Ocena sensoryczno - jakościowa

Wykonano ocenę sensoryczną kremu z β -karotenem na podstawie tab. 54.

Tab. 54. Ocena sensoryczna badanych emulsji [315].

Cecha produktu	
efekt poduszki	gęsta, jednolita masa
jednolitość	gładka masa
konsystencja	krem jest gęsty
przyczepność	dobra, łatwo nabrać krem z naczynia palcem
Efekty na skórze	
rozprowadzanie	łatwo rozprowadza się na skórze
kleistość	po aplikacji na skórze w niewielkim stopniu zostaje kleista masa
tłustość i natłuszczenie	po nałożeniu emulsji na skórę przedramienia pozostaje niewielki tłusty film, natomiast po 30 minutach oraz po 1 godzinie tłusty film zanika
wchłanianie	preparat wnika w naskórek po minucie
wygładzanie	po aplikacji kremu na skórę przedramienia i upływie 30 minut oraz 1 godziny skóra jest odczuwanie gładka w porównaniu ze skórą nie posmarowaną kremem

Po siedmiu tygodniach stosowania badanych kremów, probanci wypełnili tabele z oceną sensoryczno-jakościową (zał. 7). Uzyskane wyniki badania zostały uśrednione i zaprezentowane za pomocą wykresów radarowych. Na wykresie zostały przedstawione obydwa badane kremy w celu ich porównania.



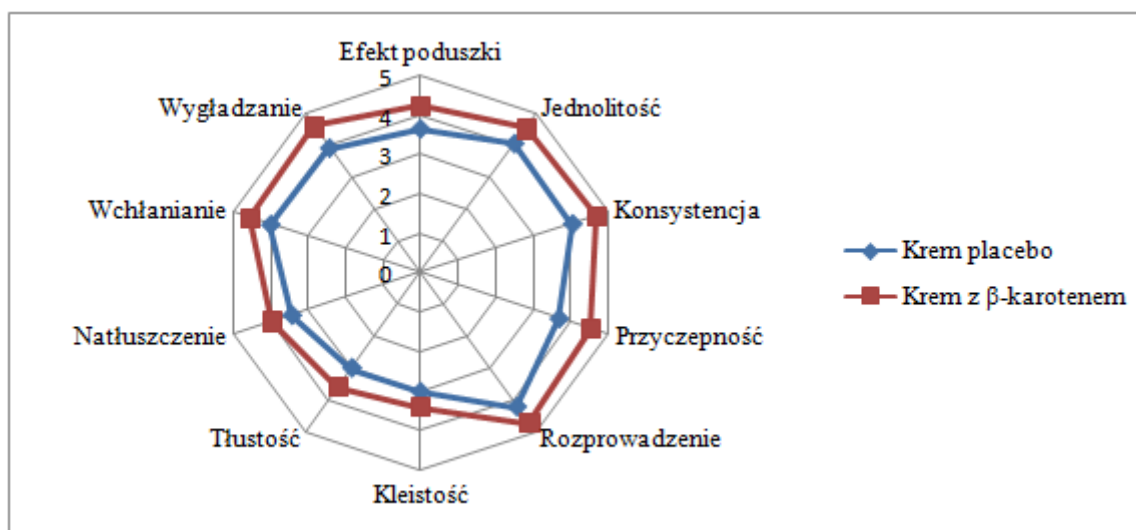
Rys. 98. Porównanie cech sensorycznych kremów placebo oraz z β -karotenem.

Na podstawie analizy wyników zamieszczonych na rys. 98 można stwierdzić, że probanci wyżej ocenili krem z β -karotenem od kremu placebo. Poszczególne właściwości (efekt poduszki, jednolitość, konsystencja, przyczepność, rozprowadzenie, wchłanianie oraz wygładzenie) otrzymały ocenę między dobrą a bardzo dobrą. Natomiast ocenę między

dostateczną a dobrą dostały: kleistość, tłustość i natłuszczenie. Z kolei krem placebo otrzymał następujące oceny: dobrą za jednolitość, konsystencję, rozprowadzanie oraz wchłanianie, dostateczną za efekt poduszki, przyczepność, kleistość, natłuszczenie oraz wygładzanie, niedostateczną za tłustość. Na podstawie badań możemy wnioskować, że wykorzystany w doświadczeniu krem z substancją aktywną zadowolili probantów, zaś krem bez substancji czynnej nie spełnia oczekiwań jakościowych probantów.

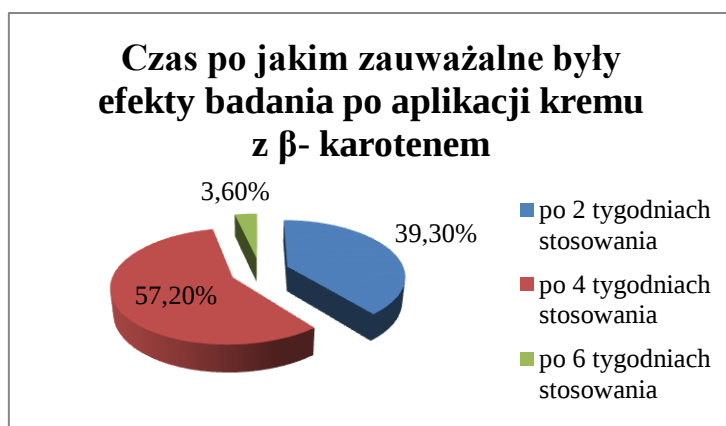
6.9.8. Ocena sensoryczno-hedonistyczna

Na podstawie analizy wyników zamieszczonych na rys. 99 można wyciągnąć wnioski, że krem z β -karotenem bardziej satysfakcjonuje probantów niż krem placebo. Byli zadowoleni z takich właściwości jak: rozsmarowywalność i działanie na skórę, ocenę ogólną preparatu oraz jego działanie zaopiniowali pomiędzy „podoba mi się”, a „bardzo mi się podoba”, natomiast zapach emulsji „trochę im się podobał”. Tymczasem krem bez substancji aktywnej otrzymał następujące opinie: rozsmarowywalność, ocena ogólna preparatu oraz ogólne jego działanie „trochę podobało się” probantom, a o działaniu na skórę i zapachu emulsji nie mieli zdania. Powyższe oceny wskazują na to, że krem z β -karotenem był lepiej akceptowany aniżeli krem placebo.



Rys. 99. Porównanie cech sensoryczno-hedonistycznych kremów placebo oraz z β -karotenem.

Wszyscy probanci po skończonych badaniach wypełnili ankietę (zał.7). Odpowiedzieli na pytanie dotyczące szybkości zauważenia efektów stosowania kremów. 39,3% badanych (n=11) stwierdziło, że po dwóch tygodniach stosowania zauważyli zmiany, 57,2% (n=16) po czterech tygodniach, natomiast 1 osoba (3,6%) zauważyła poprawę po 6 tygodniach (rys. 100).



Rys. 100. Czas po jakim zauważalne były efekty aplikacji kremu z β -karotenem.

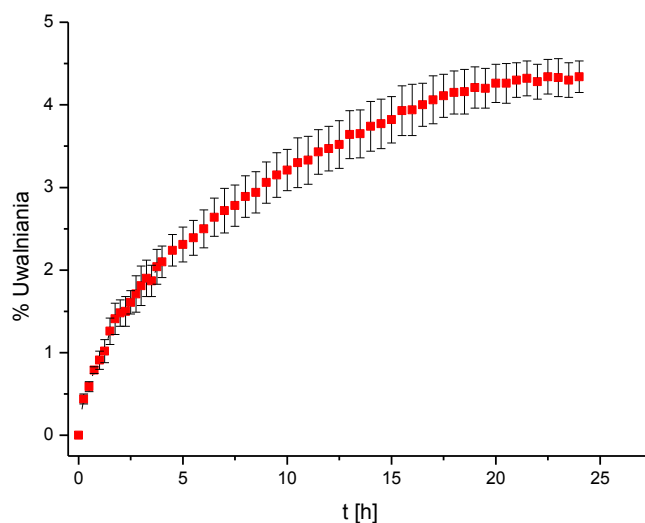
U wszystkich probantów biorących udział w badaniu zaobserwowano pozytywny wpływ kremu zawierającego β -karoten na poprawę nawilżenia, elastyczności, oraz zmniejszenia przeznaskórkowej utraty wody. U kilku badanych osób stwierdzono znaczną poprawę tych parametrów po zastosowaniu kremu z karotenoidem.

6.10. Badanie kinetyki uwalniania β -karotenu z samodzielnie przygotowanej formułacji kosmetycznej

Na podstawie wcześniejszych badań dotyczących stabilności samodzielnie przygotowanych emulsji kosmetycznych (rozdział 6.7 oraz 6.8) wyciągnięto wnioski, że najbardziej stabilnym typem jest emulsja O/W sporządzona na zimno, dlatego też została ona wykorzystana w badaniach *in vitro* dotyczących kinetyki uwalniania. Badania te przeprowadzono w celu przewidzenia wyników badań biodostępności dermalnej. Doświadczenie to pozwala na ocenę stopnia uwalniania β -karotenu, co jest istotne dla określenia jego skuteczności działania kosmetycznego oraz bezpieczeństwa. Wyniki badania kinetyki uwalniania pozwalają na wprowadzenie istotnych zmian przed rozpoczęciem kosztownego oraz długotrwałego badania aplikacyjnego przeprowadzanego na ludziach.

6.10.1. Badanie kinetyki uwalniania β -karotenu z emulsji typu O/W przygotowanej na zimno

Badania rozpoczęto od wyznaczenia charakterystycznej długości fali, przy której beta-karoten absorbuje promieniowanie. Jej wartość wyniosła 453 nm.



Rys. 101. Szybkość uwalniania β -karotenu zemulsji O/W przygotowanej na zimno w zależności od czasu trwania badania.

Na podstawie rys. 101, zaobserwowano, że po 24 godzinach prowadzonych badań maksymalny % uwolnienia β -karotenu z emulsji O/W przygotowanej na zimno wyniósł 4,34. Niski procent uwolnienia, wynika z faktu, że badany związek jest niestabilny w warunkach, którym towarzyszy dostęp światła oraz tlenu. Po przeprowadzonym doświadczeniu szybkości uwalniania β -karotenu z emulsji O/W przygotowanej na zimno dokonano kolejnego pomiaru analizowanej próbki przy użyciu spektrofotometru UV-Vis. Badanie to przeprowadzono w celu potwierdzenia rozkładu β -karotenu zawartego w emulsji w trakcie prowadzonych doświadczeń. Potwierdzono fakt, że badany związek jest niestabilny w warunkach, którym towarzyszy dostęp światła oraz tlenu [351].

6.11. Badanie biodostępności β -karotenu za pomocą metody wykorzystującej taśmy adhezyjne

W ciągu 5 tygodni 18 probantów zostało poddanych cotygodniowemu badaniu. Każdej osobie została zerwana taśma adhezyjna, która zarówno przed, jak i po badaniu została zważona. Zerwane taśmy adhezyjne zawierały pewne ilości *stratum corneum* oraz pewne ilości miejscowo zaaplikowanego β -karotenu.

6.11.1. Metoda określania ilości zerwanego *stratum corneum* - metoda ważenia różnicowego

W tab. 55 przedstawiono masy usuniętej tkanki dla wybranych wzorcowych probantów, będące różnicą wag taśm adhezyjnych przed i po zerwaniu.

Tab. 55. Masa usuniętej tkanki.

Probant	1 tydzień	2 tydzień	3 tydzień	4 tydzień	5 tydzień
Masa usuniętej tkanki [g]					
2	$2 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$
4	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$
6	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$
7	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$9 \cdot 10^{-4}$
10	$1 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$
14	$1 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$9 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$
18	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$

Następnie obliczono głębokość ingerencji/penetracji w tkankę korzystając ze wzoru przedstawionego w rozdziale 5.9.1.

W tab. 56 przedstawiono głębokości ingerencji w tkankę podczas każdego oderwania taśmy adhezyjnej. Natomiast w tabeli 57 przedstawiono sumy głębokości ingerencji w tkankę.

Tab. 56. Głębokość ingerencji w tkankę.

Probant	1 tydzień badań	2 tydzień badań	3 tydzień badań	4 tydzień badań	5 tydzień badań
Głębokość ingerencji w tkankę [m]					
2	$8,31 \cdot 10^{-8}$	$1,25 \cdot 10^{-7}$	$3,33 \cdot 10^{-7}$	$2,08 \cdot 10^{-7}$	$8,30 \cdot 10^{-8}$
4	$8,31 \cdot 10^{-8}$	$8,30 \cdot 10^{-8}$	$2,08 \cdot 10^{-7}$	$1,67 \cdot 10^{-7}$	$1,25 \cdot 10^{-7}$
6	$4,2 \cdot 10^{-8}$	$8,30 \cdot 10^{-8}$	$1,67 \cdot 10^{-7}$	$1,25 \cdot 10^{-7}$	$2,50 \cdot 10^{-7}$
7	$1,67 \cdot 10^{-7}$	$1,67 \cdot 10^{-7}$	$1,67 \cdot 10^{-7}$	$8,3 \cdot 10^{-8}$	$3,75 \cdot 10^{-7}$
10	$4,20 \cdot 10^{-8}$	$1,67 \cdot 10^{-7}$	$3,33 \cdot 10^{-7}$	$1,25 \cdot 10^{-7}$	$2,08 \cdot 10^{-7}$
14	$4,20 \cdot 10^{-8}$	$1,67 \cdot 10^{-7}$	$4,20 \cdot 10^{-8}$	$3,75 \cdot 10^{-7}$	$1,67 \cdot 10^{-7}$
18	$4,20 \cdot 10^{-8}$	$4,20 \cdot 10^{-8}$	$8,30 \cdot 10^{-8}$	$2,00 \cdot 10^{-7}$	$8,30 \cdot 10^{-8}$

Tab. 57. Sumy ingerencji głębokości w tkankę po każdej oderwanej taśmie adhezyjnej.

Probant	1 tydzień badań	2 tydzień badań	3 tydzień badań	4 tydzień badań	5 tydzień badań
Sumy ingerencji w tkankę [m]					
2	$8,30 \cdot 10^{-8}$	$2,08 \cdot 10^{-7}$	$5,42 \cdot 10^{-7}$	$7,50 \cdot 10^{-7}$	$8,33 \cdot 10^{-7}$
4	$8,30 \cdot 10^{-8}$	$1,67 \cdot 10^{-7}$	$3,75 \cdot 10^{-7}$	$5,42 \cdot 10^{-7}$	$6,67 \cdot 10^{-7}$
6	$4,20 \cdot 10^{-8}$	$1,25 \cdot 10^{-7}$	$2,9 \cdot 10^{-7}$	$4,17 \cdot 10^{-7}$	$6,67 \cdot 10^{-7}$
7	$1,67 \cdot 10^{-7}$	$3,33 \cdot 10^{-7}$	$5,00 \cdot 10^{-7}$	$5,83 \cdot 10^{-7}$	$9,58 \cdot 10^{-7}$
10	$4,20 \cdot 10^{-8}$	$2,08 \cdot 10^{-7}$	$5,42 \cdot 10^{-7}$	$6,67 \cdot 10^{-7}$	$8,75 \cdot 10^{-7}$
14	$4,20 \cdot 10^{-8}$	$2,08 \cdot 10^{-7}$	$2,50 \cdot 10^{-7}$	$6,25 \cdot 10^{-7}$	$7,92 \cdot 10^{-7}$
18	$4,20 \cdot 10^{-8}$	$8,30 \cdot 10^{-8}$	$1,67 \cdot 10^{-7}$	$3,75 \cdot 10^{-7}$	$4,58 \cdot 10^{-7}$

Wyciągnięto wnioski, że masa usuniętej tkanki dla probantów różniła się nieznacznie. Wartości wahały się między $2 \cdot 10^{-4}$ - $9 \cdot 10^{-4}$ g zależności od badanego probanta. Różnice te

wynikają z różnej ilości korneocytów oderwanych dla danego ochotnika wraz z taśmą. Ilość korneocytów jest zależna od anatomicznego miejsca na powierzchni naskórka, wieku organizmu, topografii skóry oraz od czynników zewnętrznych. Głębokość ingerencji w tkankę była różna dla każdego z probantów ($4,2 \cdot 10^{-8}$ - $1,25 \cdot 10^{-7}$ m). Wartości przedstawione w tab. 55 - 57 wykorzystane zostały do obliczeń statystycznych przedstawionych w dalszej części niniejszej pracy doktorskiej.

6.11.2. Określenie ilości pozostałego β -karotenu w *stratum corneum* za pomocą pomiaru przeznaskórkowej utraty wody (TEWL)

Na podstawie wzoru wyliczono teoretyczne wartości TEWL dla warstwy skóry nieuszkodzonej przyklejeniem taśmy adhezyjnej. Skorzystano ze wzoru umieszczonego w rozdziale 5.9.2.

$$TEWL_x = 9,6688 \text{ [g/h}\cdot\text{m}^2\text{]}$$

Po otrzymaniu powyższego wyniku obliczano teoretyczne wartości TEWL (tab. 58), po oderwaniu każdej taśmy adhezyjnej korzystając ze wzoru umieszczonego w rozdziale 5.9.2.

Tab. 58. Obliczone wartości TEWL dla wybranych probantów przed badaniem właściwym i w czasie trwania badania.

Probant	Pomiar przed badaniem właściwym	1 tydzień badań	2 tydzień badań	3 tydzień badań	4 tydzień badań	5 tydzień badań
Obliczony TEWL [g/h·m ²]						
2	9,6688	10,24	11,23	15,13	19,34	21,75
4	9,6688	10,24	10,88	12,89	15,13	17,4
6	9,6688	9,95	10,55	12,00	13,39	17,40
7	9,6688	10,88	12,43	14,50	15,82	26,78
10	9,6688	9,95	11,23	15,13	17,40	23,21
14	9,6688	9,95	11,23	11,60	16,58	20,48
18	9,6688	9,95	10,24	10,88	12,89	13,92

Obliczone wartości transdermalnej utraty wody (TEWL) zostały wykorzystane w dalszej części badań do określenia grubości oraz pozostałego *stratum corneum* badanych probantów.

Tab. 59. Zależność procentowej średniej zmiany wartości TEWL obliczonego dla badanych probantów od czasu trwania doświadczenia.

	N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
% zmiany obliczonego TEWL przed pomiarem	7	12,20	12,16	10,73	14,32	1,31
% zmiany obliczonego TEWL 1 tydzień	7	12,80	12,51	11,49	14,73	1,18
% zmiany obliczonego TEWL 2 tydzień	7	13,95	14,12	12,85	15,16	0,82
% zmiany obliczonego TEWL 3 tydzień	7	16,42	16,45	14,59	17,47	0,98
% zmiany obliczonego TEWL 4 tydzień	7	19,71	19,85	17,56	22,14	1,54
% zmiany obliczonego TEWL 6 tydzień	7	24,93	24,90	20,61	29,73	2,93

Obliczona wartość TEWL wzrasta proporcjonalnie do zwiększającej się ingerencji w głąb tkanki. Przy testach zdzierania zrywa się warstwę za warstwą - zanika płaszcz wodno-lipidowy, czyli TEWL rośnie, ponieważ nie ma bariery ochronnej (tab.58). Tym samym, im mniejsza grubość warstwy *stratum corneum* - tym większa ilość wody przenika przez nią do środowiska zewnętrznego (rośnie TEWL). Zadaniem naskórka jest bowiem oddzielenie organizmu od otoczenia, ochrona głębszych warstw skóry przed działaniem czynników zewnętrznych oraz zapobieganie przeznaskórkowej utracie wody. W tabeli 59 przedstawiono uśrednione wartości procentowej zmiany wartości TEWL obliczonego dla probantów w zależności od czasu trwania badania. Można zauważyć, że wartość ta wzrasta wraz z czasem analizy. Przed rozpoczęciem aplikacji emulsji z β -karotenem wartość ta wynosiła 12,20% natomiast po ostatnim tygodniu trwania badań, zaobserwowano dwukrotny wzrost obliczanego parametru (24,93%). Istotność różnic analizowanych parametrów, weryfikowano stosując analizę wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami (tab. 60).

Tab. 60. Wyniki testu post - hoc między poszczególnymi tygodniami badań dla parametrów: % obliczonego TEWL oraz % zmierzonego TEWL (wyniki testu ANOVA dla obu parametrów wynosi $p < 0,0001$).

Wynik testu post-hoc			
		% obliczonego TEWL p testu	% zmierzonego TEWL p testu
% obliczonego TEWL przed pomiarem	% obliczonego TEWL 1 tydzień	ns	$p > 0,05$
% obliczonego TEWL przed pomiarem	% obliczonego TEWL 2 tydzień	ns	$p > 0,05$
% obliczonego TEWL przed pomiarem	% obliczonego TEWL 3 tydzień	$p < 0,01$	$p < 0,01$
% obliczonego TEWL przed pomiarem	% obliczonego TEWL 4 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$
% obliczonego TEWL przed pomiarem	% obliczonego TEWL 6 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$
% obliczonego TEWL 1 tydzień	% obliczonego TEWL 2 tydzień	ns	$p > 0,05$
% obliczonego TEWL 1 tydzień	% obliczonego TEWL 3 tydzień	$p < 0,01$	$p < 0,01$
% obliczonego TEWL 1 tydzień	% obliczonego TEWL 4 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$
% obliczonego TEWL 1 tydzień	% obliczonego TEWL 6 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$
% obliczonego TEWL 2 tydzień	% obliczonego TEWL 3 tydzień	ns	$p > 0,05$
% obliczonego TEWL 2 tydzień	% obliczonego TEWL 4 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$
% obliczonego TEWL 2 tydzień	% obliczonego TEWL 6 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$
% obliczonego TEWL 3 tydzień	obliczonego TEWL 4 tydzień	$p > 0,05$	$P < 0,05$
% obliczonego TEWL 3 tydzień	% obliczonego TEWL 6 tydzień	$p < 0,001$	$P < 0,001$
% obliczonego TEWL 4 tydzień	obliczonego TEWL 6 tydzień	$p < 0,001$	$P < 0,001$

ns - nieistotne statystycznie (czyli $p > 0,05$).

Wszystkie parametry mają rozkład zgodny z rozkładem normalnym.

W czasie trwania badań, przed jak i po przyklejeniu taśmy adhezyjnej, probantom zmierzono wartość TEWL za pomocą tewametru TM300. W tab. 61. przedstawiono wyniki TEWL zmierzonego dla poszczególnych probantów.

Tab. 61. Wartości TEWL zmierzone za pomocą tewametru TM300 dla badanych probantów przed i w czasie trwania badania.

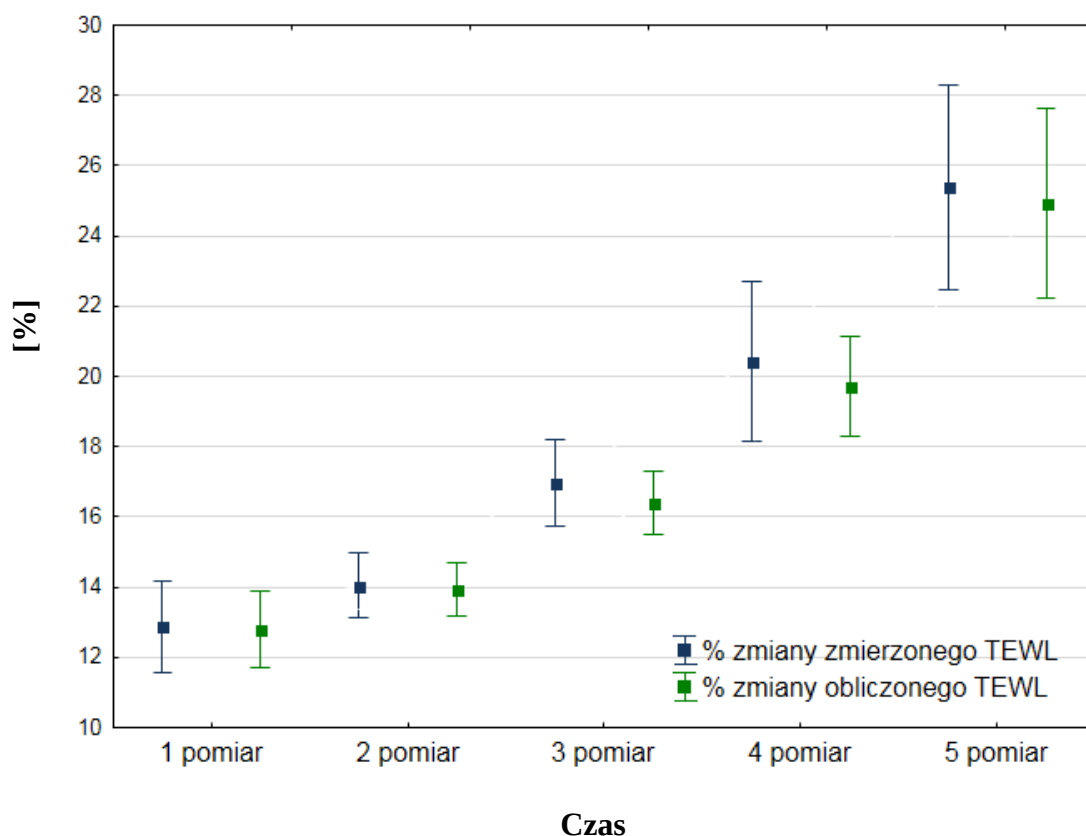
Probant	Pomiar przed badaniem właściwym	1 tydzień badań	2 tydzień badań	3 tydzień badań	4 tydzień badań	5 tydzień badań
Zmierzony TEWL [g/h·m²]						
2	9,2	11,0	11,3	16,1	20,3	21,2
4	9,3	10,0	11,2	13,3	16,0	17,8
6	5,8	10,7	11,5	12,6	13,2	19,0
7	7,8	11,7	13,2	15,3	15,9	28,1
10	8,9	10,6	11,8	16,2	17,6	23,9
14	8,1	8,7	11,1	11,4	19,4	21,3
18	8,7	9,7	9,2	11,4	13,3	13,8

Stwierdzono, że zmierzona wartość TEWL wzrasta proporcjonalnie do zwiększającej się ingerencji w głąb tkanki (tab. 61).

Tab. 62. Zależność procentowej zmiany wartości TEWL zmierzonego od czasu dla każdego probanta.

	N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie Standardowe
% zmiany zmierzonego TEWL przed pomiarem	7	10,29	10,13	7,97	13,16	1,82
% zmiany zmierzonego TEWL 1 pomiar	7	12,87	12,72	10,88	14,70	1,40
% zmiany zmierzonego TEWL 2 pomiar	7	14,04	13,92	12,68	15,80	0,99
% zmiany zmierzonego TEWL 3 pomiar	7	16,98	17,25	14,25	18,20	1,32
% zmiany zmierzonego TEWL 4 pomiar	7	20,42	20,12	17,28	24,25	2,45
% z zmiany mierzonego TEWL 5 pomiar	7	25,39	26,10	20,88	30,54	3,15

W tabeli 62 przedstawiono uśrednione wartości procentowej zmiany wartości TEWL zmierzonego dla probantów w zależności od czasu trwania badania. Można zauważyć, że wartość ta wzrasta wraz z czasem analizy. Przed rozpoczęciem aplikacji emulsji z β -karotenem wartość ta wynosiła 10,29% natomiast po ostatnim tygodniu trwania badań, zaobserwowano znaczny wzrost obliczonego parametru (25,39%). Wszystkie parametry mają rozkład zgodny z rozkładem normalnym.



Rys. 102. Zestawienie na jednym wykresie procentowej zmiany wartości TEWL obliczonego oraz zmierzonego od czasu trwania badań dla każdego probanta.

Zaobserwowano, że średnia procentowa zmiana wartości TEWL obliczonego dla wszystkich probantów wzrastała w następujący sposób: po pierwszym tygodniu wartość ta wyniosła 12,80%, po drugim tygodniu równa była 13,95%. Natomiast po trzecim tygodniu zaobserwowano zmianę wartości TEWL wynoszącą 16,42%. Po czwartym tygodniu wartość ta wyniosła 19,71%. Największą wartość badanego parametru zaobserwowano po pięciu tygodniach, wyniosła ona 24,93% (rys. 102). Parametr średniej procentowej zmiany wartości TEWL zmierzony dla wszystkich probantów zmienia się w następujący sposób: pierwszy tydzień - 12,87%, drugi tydzień - 14,04%, trzeci tydzień - 16,98%, czwarty tydzień - 20,42%. Największą wartość obliczonego parametru zaobserwowano w piątym tygodniu badań. Wyniosła ona 25,39% (rys.102).

Istotność różnic analizowanych parametrów, weryfikowano stosując analizę wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami (tab. 63).

Tab. 63. Wyniki testu post - hoc między poszczególnymi tygodniami badań dla parametrów: % obliczonego TEWL oraz % zmierzonego TEWL (wyniki testu ANOVA dla obu parametrów wynosi $p < 0,0001$).

Wynik testu post-hoc			
		% obliczonego TEWL p testu	% zmierzonego TEWL p testu
% obliczonego TEWL przed pomiarem	% obliczonego TEWL 1 tydzień	ns	$p > 0,05$
% obliczonego TEWL przed pomiarem	% obliczonego TEWL 2 tydzień	ns	$p > 0,05$
% obliczonego TEWL przed pomiarem	% obliczonego TEWL 3 tydzień	$p < 0,01$	$p < 0,01$
% obliczonego TEWL przed pomiarem	% obliczonego TEWL 4 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$
% obliczonego TEWL przed pomiarem	% obliczonego TEWL 6 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$
% obliczonego TEWL 1 tydzień	% obliczonego TEWL 2 tydzień	ns	$p > 0,05$
% obliczonego TEWL 1 tydzień	% obliczonego TEWL 3 tydzień	$p < 0,01$	$p < 0,01$
% obliczonego TEWL 1 tydzień	% obliczonego TEWL 4 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$
% obliczonego TEWL 1 tydzień	% obliczonego TEWL 6 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$
% obliczonego TEWL 2 tydzień	% obliczonego TEWL 3 tydzień	ns	$p > 0,05$
% obliczonego TEWL 2 tydzień	% obliczonego TEWL 4 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$
% obliczonego TEWL 2 tydzień	% obliczonego TEWL 6 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$
% obliczonego TEWL 3 tydzień	% obliczonego TEWL 4 tydzień	$p > 0,05$	$p < 0,05$
% obliczonego TEWL 3 tydzień	% obliczonego TEWL 6 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$
% obliczonego TEWL 4 tydzień	% obliczonego TEWL 6 tydzień	$p < 0,001$	$p < 0,001$

ns - nieistotne statystycznie (czyli $p > 0,05$).

Na podstawie otrzymanych wyników TEWL obliczono wartość $1/\text{TEWL}$ (tab.64).

Wszystkie parametry mają rozkład zgodny z rozkładem normalnym.

Tab. 64. Wartości odwrotności TEWL zmierzonego($1/TEWL$) dla badanych probantów przed badaniem właściwym i w czasie trwania badania.

Probant	Pomiar przed badaniem właściwym	1 tydzień badań	2 tydzień badań	3 tydzień badań	4 tydzień badań	5 tydzień badań
Odwrotność zmierzonego TEWL [hm^2/g]						
2	0,1087	0,0909	0,0885	0,0621	0,0493	0,0472
4	0,1075	0,1000	0,0893	0,0752	0,0625	0,0562
6	0,1024	0,0935	0,0870	0,0794	0,0758	0,0526
7	0,1082	0,0855	0,0758	0,0654	0,0629	0,0356
10	0,1024	0,0943	0,0847	0,0617	0,0568	0,0418
14	0,1035	0,0949	0,0901	0,0877	0,0515	0,0469
18	0,1049	0,1019	0,0957	0,0877	0,0752	0,0725

Zależność między odwrotnością TEWL a skumulowaną masą usuniętego SC opiera się na zastosowaniu prawa dyfuzji Ficka zakładając, że *stratum corneum* jest homogeniczną membraną.

Metoda zdzierania pasków w połączeniu z pomiarem transepidermalnej utraty wody (TEWL) służy do określania grubości warstwy *stratum corneum* (tab. 64).

W tabeli 65 przedstawiono wartość grubości SC dla poszczególnych probantów. Wartości te zostały obliczone na podstawie zmierzonych wartości TEWL. Wartości te mieściły się w zakresie od 14,8 do 15,2 μm . Dane literaturowe wskazują uśrednioną wartość grubości SC ok. 15 μm [352].

Tab. 65. Wartości grubości SC obliczone na podstawie zmierzonych wartości TEWL.

Probant	Grubość SC [μm]
2	14,8
4	14,8
6	14,9
7	14,8
10	15,0
14	15,2
18	14,8

W tabeli 66 przedstawiono korelację między głębokością ingerencji β -karotenu w tkankę każdego probanta a % obliczonego TEWL.

Tab. 66. Zależność procentowej zmiany wartości TEWL obliczonego od głębokości całkowitej dla każdego probanta.

korelacje między głębokością ingerencji w tkankę a % obliczonego TEWL	współczynnik korelacji R	p testu
1 pomiar	-0,299	0,4975
2 pomiar	0,729	0,0642
3 pomiar	0,899	0,0123
4 pomiar	0,109	0,8397
5 pomiar	0,527	0,2357

W tabeli 67 przedstawiono korelację między głębokością ingerencji β -karotenu w tkankę każdego probanta a % zmierzonego TEWL.

Tab. 67. Zależność procentowej zmiany wartości TEWL zmierzonego od głębokości całkowitej dla każdego probanta.

korelacje między głębokością ingerencji w tkankę a % zmierzonego TEWL	współczynnik korelacji R	p testu
1 pomiar	-0,299	0,4975
2 pomiar	0,729	0,0642
3 pomiar	0,899	0,0123
4 pomiar	0,109	0,8397
5 pomiar	0,527	0,2357

Współczynnik korelacji p mierzy siłę zależności liniowej między dwoma cechami, w powyższym przypadku pomiędzy głębokością ingerencji w tkankę a procentową zmianą wartości obliczonego/zmierzonego TEWL (tab. 66 oraz 67). Im współczynnik korelacji p jest bliższy 1, tym bardziej „liniowa” jest zależność między analizowanymi cechami. Jeśli $p < 0$, to większym wartościom jednej cechy odpowiadają (średnio) mniejsze wartości drugiej cechy i odwrotnie (zależność malejąca, cechy zachowują się przeciwnie).

Poniżej przedstawiono wyniki, które umożliwiają określenie grubości SC dla badanych probantów (tab. 68).

Tab. 68. Korelacja 1/TEWL od głębokości całkowitej dla każdego probanta.

korelacje 1/TEWL a głębokością ingerencji w tkankę	współczynnik korelacji R	p testu
1 pomiar	-0,538	0,2357
2 pomiar	-0,561	0,200
3 pomiar	-0,918	0,0067
4 pomiar	-0,419	0,2667
5 pomiar	-0,667	0,1095

Wyniki testu zdzierania SC wyrażono jako ilość *stratum corneum* na znormalizowany ułamek usuniętego SC (x/L) (tab. 69). Dzięki otrzymanym wynikom, stwierdzono, że każdy z probantów charakteryzuje się inną grubością SC.

Tab. 69. Znormalizowany ułamek usuniętego SC dla badanych probantów.

Probant	1 tydzień badań	2 tydzień badań	3 tydzień badań	4 tydzień badań	5 tydzień badań
Znormalizowany ułamek usuniętego SC [j.u.]					
2	0,0563	0,1408	0,3660	0,5068	0,5631
4	0,0563	0,1126	0,2534	0,3660	0,4505
6	0,0280	0,0839	0,1957	0,2796	0,4474
7	0,1126	0,2252	0,3378	0,3941	0,6475
10	0,0278	0,1389	0,3611	0,4444	0,5833
14	0,0274	0,1371	0,1645	0,4112	0,5208
18	0,0282	0,0563	0,1126	0,2534	0,3097

Porównując wartości znormalizowanego ułamka oderwanego SC można zauważyć, iż wartości te różnią się w zakresie 0,0563 - 0,6475 [j.u.]. Dzięki temu parametrowi można porównywać probantów o różnej grubości SC.

Na podstawie otrzymanych danych dotyczących ilości usuniętego SC na każdej z taśm adhezyjnych oraz grubości SC określonej za pomocą pomiarów TEWL obliczono stężenie β -karotenu. Obliczone stężenie zostało przedstawione jako funkcję względnej głębokości (znormalizowany ułamek usuniętego SC- x/L) od przenikającego w głąb bariery SC.

Profil stężenia substancji w SC wyrażany jest równaniem:

$$Cx = K \cdot Cv \cdot \left\{ \left(1 - \frac{x}{L} \right) - \frac{2}{\pi} \sum_n \frac{1}{n} \cdot \sin \left(\frac{n \cdot \pi \cdot x}{L} \right) \cdot \exp \left(\frac{-D \cdot n^2 \cdot \pi^2 \cdot t}{L^2} \right) \right\}$$

gdzie:

Cx - stężenie cząstek przenikających,

K - współczynnik podziału wody w lipidach SC (0,06[j.u.]),

Cv - stężenie substancji w preparacie ($1,86 \cdot 10^{-4}$ [M]),

x - głębokość ingerencji w tkankę [m],

L - grubość SC [m],

n - numer kolejnych odrywanych taśm adhezyjnych,

D - współczynnik dyfuzji wody przez barierę SC ($6,72 \cdot 10^{-14}$ [m²/s]),

t - czas [s].

Równanie profilu stężenia jest właściwe jeśli spełnia prawo dyfuzji Ficka'a oraz trzy warunki graniczne:

- ilość aplikowanego β -karotenu (C_v) musi być stała podczas czasu aplikacji,
- przed rozpoczęciem badania warstwa SC nie może zawierać β -karotenu,
- warstwa żywych komórek tworząca naskórek musi być nieprzepuszczalna dla β -karotenu [353].

Na podstawie powyższego równania wyznaczono stosunek D/L^2 (tab.70). Charakteryzuje on absorpcję β -karotenu przenikającego do SC z aplikowanego kremu. Parametr ten informuje nas o tempie absorpcji β -karotenu, ponieważ przedstawiony jest w jednostkach odwrotności czasu [s^{-1}]. Może być określany mianem pierwszorzędowej stałej β -karotenu przenikającego przez SC.

Tab. 70. Zależność parametru D/L^2 od czasu dla każdego probanta.

Parametr $D/L^2 [s^{-1}]$	N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie Standardowe
1 tydzień	7	$3,06 \cdot 10^{-4}$	$3,09 \cdot 10^{-4}$	$2,92 \cdot 10^{-4}$	$3,14 \cdot 10^{-4}$	$8,00 \cdot 10^{-6}$
2 tydzień	7	$3,11 \cdot 10^{-4}$	$3,10 \cdot 10^{-4}$	$2,99 \cdot 10^{-4}$	$3,21 \cdot 10^{-4}$	$7,00 \cdot 10^{-6}$
3 tydzień	7	$3,19 \cdot 10^{-4}$	$3,21 \cdot 10^{-4}$	$3,01 \cdot 10^{-4}$	$3,31 \cdot 10^{-4}$	$1,00 \cdot 10^{-5}$
4 tydzień	7	$3,27 \cdot 10^{-4}$	$3,27 \cdot 10^{-4}$	$3,16 \cdot 10^{-4}$	$3,40 \cdot 10^{-4}$	$8,00 \cdot 10^{-6}$
5 tydzień	7	$3,36 \cdot 10^{-4}$	$3,36 \cdot 10^{-4}$	$3,24 \cdot 10^{-4}$	$3,51 \cdot 10^{-4}$	$9,00 \cdot 10^{-6}$

Parametr D/L^2 określany jako pierwszorzędowa stała β -karotenu przenikającego przez SC z aplikowanego kremu zwiększa się wraz z czasem trwania badań. Istotność różnic analizowanych parametrów, kolejny raz weryfikowano stosując analizę wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami (tab. 71).

Tab. 71. Wyniki testu post - hoc dla parametru DL^2 dla poszczególnych tygodni badań (wyniki testu ANOVA - $p < 0,0001$).

Wyniki testu post-hoc dla parametru DL^2 dla poszczególnych tygodni badań	
Parametr $D/L^2 [s^{-1}]$ 1 tydzień	ns
Parametr $D/L^2 [s^{-1}]$ 1 tydzień	$p < 0,001$
Parametr $D/L^2 [s^{-1}]$ 1 tydzień	$p < 0,001$
Parametr $D/L^2 [s^{-1}]$ 1 tydzień	$p < 0,001$
Parametr $D/L^2 [s^{-1}]$ 2 tydzień	$p < 0,01$
Parametr $D/L^2 [s^{-1}]$ 2 tydzień	$p < 0,001$
Parametr $D/L^2 [s^{-1}]$ 2 tydzień	$p < 0,001$
Parametr $D/L^2 [s^{-1}]$ 3 tydzień	$p < 0,01$
Parametr $D/L^2 [s^{-1}]$ 3 tydzień	$p < 0,001$
Parametr $D/L^2 [s^{-1}]$ 4 tydzień	$p < 0,001$

ns - nieistotne statystycznie (czyli $p > 0,05$).

Parametr D/L^2 ma rozkład normalny we wszystkich pomiarach.

Na podstawie profilu stężenia przenikania β -karotenu dla poszczególnych probantów określono pierwszorzędową stałą transportu β -karotenu D/L^2 , która określa szybkość absorpcji substancji aktywnej. Im większa wartość wyżej wymienionego parametru tym szybsza absorpcja.

Dzięki parametrowi D/L^2 obliczono standardowy czas martwy dyfuzji przez SC (tab.72). Parametr ten obliczano ze wzoru:

$$T_{\text{dyfuzji}} = L^2 / 6D$$

gdzie:

D - współczynnik dyfuzji wody przez barierę SC ($6,72 \cdot 10^{-14} \text{ [m}^2/\text{s]}$),

L - grubość SC [m].

Tab. 72. Standardowy czas martwy dyfuzji dla badanych probantów.

Probant	Standardowy czas martwy dyfuzji [s]
2	543,2
4	543,2
6	550,6
7	543,2
10	558,0
14	573,0
18	543,2

Ponadto obliczono czas jaki jest potrzebny, aby osiągnąć stan stacjonarny przesnaskórkowego transportu (tab. 73)

$$T_{\text{stanu stacjonarnego}} = (2,7 \cdot L^2) / 6D$$

Wielkości te umożliwiają porównanie biodostępności β -karotenu u poszczególnych probantów.

Tab. 73. Czas potrzebny do osiągnięcia stanu stacjonarnego transportu przeznaskórkowego.

Proband	Czas do osiągnięcia stanu stacjonarnego transportu przeznaskórkowego [s]
2	1466,8
4	1466,8
6	1486,7
7	1466,8
10	1506,7
14	1547,1
18	1466,8

Do obliczenia całkowitej ilości β -karotenu w warstwie *stratum corneum* (t) służy wzór otrzymany przez scałkowanie poniższego równania.

$$AUC = \int_0^1 Cx d\left(\frac{x}{L}\right)$$

$$AUC = K \cdot C_v \cdot \left\{ \frac{1}{2} - \frac{4}{\Pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \cdot \exp\left(-\frac{(2n+1)^2 \cdot \Pi^2 \cdot D \cdot t}{L^2}\right) \right\}$$

Na podstawie tabelki 74, można stwierdzić, że β -karoten, przenika do warstwy rogowej naskórka badanych probantów. W pierwszym tygodniu badań zauważono, że stężenie badanego związku w *stratum corneum* waha się w granicach od $1,67019 \cdot 10^{-10}$ - $1,71533 \cdot 10^{-10}$ mola. Natomiast w drugim tygodniu badań stężenie β -karotenu w SC dla poszczególnych probantów wynosiła od $2,36201 \cdot 10^{-10}$ do $2,42585 \cdot 10^{-10}$ mola. W trzecim tygodniu badań stężenie substancji aktywnej w warstwie rogowej naskórka mieściło się w zakresie $2,80241 \cdot 10^{-10}$ - $2,92653 \cdot 10^{-10}$ mola. W czwartym tygodniu doświadczeń, stężenie β -karotenu w *stratum corneum* dla poszczególnych probantów wynosiło od $3,34038 \cdot 10^{-10}$ do $3,43066 \cdot 10^{-10}$ mola. Po pięciu tygodniach badań stwierdzono, że β -karoten przenika do SC probantów biorących udział w doświadczeniu w ilości od $4,03612 \cdot 10^{-10}$ do $4,19751 \cdot 10^{-10}$ mola. Wartości dla poszczególnych probantów różnią się nieznacznie, ponieważ jak wynika z scałkowanego równania profilu stężenia - całkowita ilość substancji aktywnej nie zależy od głębokości ingerencji w tkankę tylko od grubości warstwy SC, różnej dla badanych probantów.

Tab. 74. Stężenie β -karotenu znajdującego się w warstwie *stratum corneum* badanych probantów.

Tygodnie					
Stężenie β -karotenu w SC [M].					
Probant	1	2	3	4	5
2	$1,71533 \cdot 10^{-10}$	$2,42585 \cdot 10^{-10}$	$2,92653 \cdot 10^{-10}$	$3,43066 \cdot 10^{-10}$	$4,19751 \cdot 10^{-10}$
4	$1,71533 \cdot 10^{-10}$	$2,42585 \cdot 10^{-10}$	$2,92653 \cdot 10^{-10}$	$3,43066 \cdot 10^{-10}$	$4,19751 \cdot 10^{-10}$
6	$1,70382 \cdot 10^{-10}$	$2,40956 \cdot 10^{-10}$	$2,90251 \cdot 10^{-10}$	$3,40764 \cdot 10^{-10}$	$4,16341 \cdot 10^{-10}$
7	$1,71533 \cdot 10^{-10}$	$2,42585 \cdot 10^{-10}$	$2,92653 \cdot 10^{-10}$	$3,43066 \cdot 10^{-10}$	$4,19751 \cdot 10^{-10}$
10	$1,69246 \cdot 10^{-10}$	$2,39350 \cdot 10^{-10}$	$2,82561 \cdot 10^{-10}$	$3,38492 \cdot 10^{-10}$	$4,07871 \cdot 10^{-10}$
14	$1,67019 \cdot 10^{-10}$	$2,36201 \cdot 10^{-10}$	$2,80241 \cdot 10^{-10}$	$3,34038 \cdot 10^{-10}$	$4,03612 \cdot 10^{-10}$
18	$1,71533 \cdot 10^{-10}$	$2,42585 \cdot 10^{-10}$	$2,92653 \cdot 10^{-10}$	$3,43066 \cdot 10^{-10}$	$4,19751 \cdot 10^{-10}$

Korzystając z równania:

$$Kp = \frac{K \cdot D}{L}$$

gdzie:

K- współczynnik podziału wody w lipidach SC (0,06 [j.u.]),

D- współczynnik dyfuzji wody przez barierę SC ($6,72 \cdot 10^{-14}$ [m²/s]),

L - grubość SC [m]

obliczono wartości współczynnika przepuszczalności β -karotenu dla poszczególnych probantów (tab. 75).

Tab. 75. Współczynnik przepuszczalności dla badanych probantów.

Probant	Współczynnik przepuszczalności [m/s]
2	$2,724 \cdot 10^{-10}$
4	$2,724 \cdot 10^{-10}$
6	$2,706 \cdot 10^{-10}$
7	$2,724 \cdot 10^{-10}$
10	$2,688 \cdot 10^{-10}$
14	$2,653 \cdot 10^{-10}$
18	$2,724 \cdot 10^{-10}$

W tabeli 75 przedstawiono współczynniki przepuszczalności dla poszczególnych probantów. Współczynniki ochotników wynosiły od $2,653 \cdot 10^{-10}$ - $2,724 \cdot 10^{-10}$ [m/s].

6.11.3. Określanie ilości zerwanego *stratum corneum* za pomocą metody spektroskopii optycznej

Stwierdzono, że przed zastosowaniem kremu zawierającego β -karoten, w naskórku wszystkich probantów nie wykryto obecności karotenoidu. W tabeli 76 przedstawiono wyniki absorbancji β -karotenu wyekstrahowanego z taśmy adhezyjnej. Wartości podane są od drugiego tygodnia badań, czyli po tygodniu stosowania kremu

Tab. 76. Wartości absorbancji taśmy adhezyjnej zawierającej β -karoten dla kilku probantów po 2-5 tygodniach smarowania się kremem z β -karotenem.

	probant 2	probant 4	probant 6	probant 7	probant 10	probant 14	probant 18
Absorbancja [j.u.]							
2 tydzień badań	0,0474	0,0458	0,0589	0,0469	0,0529	0,0583	0,0313
3 tydzień badań	0,0585	0,0618	0,075	0,0696	0,0759	0,0759	0,0603
4 tydzień badań	0,0733	0,0737	0,0936	0,0826	0,0866	0,0945	0,0786
5 tydzień badań	0,0878	0,0837	0,1009	0,1083	0,0939	0,1099	0,0899

Na podstawie poniższego wzoru obliczono stężenia β -karotenu w badanej próbce:

$$C = \frac{A \cdot 10^4}{\epsilon}$$

gdzie:

A- absorbancja

ϵ - współczynnik molowy ekstynkcji β -karotenu w acetonie przy $\lambda=454\text{nm}$ - 2500 [100ml $\cdot$ g $^{-1}$ cm $^{-1}$]

C-stężenie β -karotenu w próbce [$\mu\text{g/ml}$]

W tabeli 77 przedstawiono wartości stężenia β -karotenu.

Tab. 77. Stężenie β -karotenu dla wybranych probantów w ciągu 4 tygodni trwania badania.

	probant 2	probant 4	probant 6	probant 7	probant 10	probant 14	probant 18
Stężenia β -karotenu [$\mu\text{g/g}$]							
1 tydzień badań	0	0	0	0	0	0	0
2 tydzień badań	0,1896	0,1832	0,2356	0,1876	0,2116	0,2332	0,1252
3 tydzień badań	0,2340	0,2472	0,3000	0,2784	0,3036	0,3036	0,2412
4 tydzień badań	0,2932	0,2948	0,3744	0,3304	0,3464	0,3780	0,3144
5 tydzień badań	0,3512	0,3348	0,4036	0,4332	0,3756	0,4396	0,3596

U badanych probantów zaobserwowano stopniowy wzrost zawartości β -karotenu podczas codziennego stosowania kremu.

Tab. 78. Średnia zmiana stężenia % β -karotenu od czasu trwania badania dla każdego probanta.

	N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
% zmiany stężenia β-karotenu						
1 tydzień	7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2 tydzień	7	16,37	17,22	12,03	17,94	2,10
3 tydzień	7	22,98	22,84	21,91	24,54	0,84
4 tydzień	7	28,11	27,91	26,87	30,22	1,06
5 tydzień	7	32,54	32,46	30,36	35,23	1,85

Stwierdzono, że w pierwszym tygodniu badań nie wykryto u probantów badanego karotenoidu, natomiast po drugim tygodniu doświadczeń zaobserwowano średnią zmianę % stężenia β -karotenu wynoszącą 16,37%, w trzecim tygodniu wartość ta wynosiła 22,98%. Kolejno w czwartym tygodniu zauważono zmianę wynoszącą 28,11%. Największą zmianę stężenia % tego karotenoidu zaobserwowano w piątym tygodniu badań - 32,54%. Wyniki te potwierdzają wniosek, że wraz z czasem aplikacji kremu z β -karotenem, % zmiana jego stężenia w *stratum corneum* probantów wzrasta (tab. 78). Istotność różnic analizowanych parametrów, weryfikowano tak jak poprzednio stosując analizę wariancji ANOVA z powtarzanymi pomiarami (tab. 79).

Tab. 79. Analiza statystyczna średniej zmiany stężenia % β -karotenu od czasu trwania badania dla każdego probanta.

Wyniki testu post-hoc		
		% zmiany stężenia β-karotenu
		p testu
% zmiany stężenia β -karotenu 1 tydzień	% zmiany stężenia β -karotenu 2 tydzień	ns
% zmiany stężenia β -karotenu 1 tydzień	% zmiany stężenia β -karotenu 3 tydzień	ns
% zmiany stężenia β -karotenu 1 tydzień	% zmiany stężenia β -karotenu 4 tydzień	p<0,01
% zmiany stężenia β -karotenu 1 tydzień	% zmiany stężenia β -karotenu 5 tydzień	p<0,001
% zmiany stężenia β -karotenu 2 tydzień	% zmiany stężenia β -karotenu 3 tydzień	ns
% zmiany stężenia β -karotenu 2 tydzień	% zmiany stężenia β -karotenu 4 tydzień	ns
% zmiany stężenia β -karotenu 2 tydzień	% zmiany stężenia β -karotenu 5 tydzień	p<0,01
% zmiany stężenia β -karotenu 3 tydzień	% zmiany stężenia β -karotenu 4 tydzień	ns
% zmiany stężenia β -karotenu 3 tydzień	% zmiany stężenia β -karotenu 5 tydzień	ns
% zmiany stężenia β -karotenu 4 tydzień	% zmiany stężenia β -karotenu 5 tydzień	ns

ns - nieistotne statystycznie (czyli $p > 0,05$).

Do wykonania analizy statystycznej użyto testu Friedmana $p < 0,000$.

Tab. 80. Zmiana stężenia β -karotenu od czasu trwania badania dla każdego probanta.

	N	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odchylenie standardowe
Stężenia β-karotenu [mg/g]						
1 tydzień	7	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,000000
2 tydzień	7	0,19514	0,18960	0,12520	0,23560	0,037590
3 tydzień	7	0,27257	0,27840	0,23400	0,30360	0,031165
4 tydzień	7	0,33309	0,33040	0,29320	0,37800	0,034915
5 tydzień	7	0,38537	0,37560	0,33480	0,43960	0,040917

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że w pierwszym tygodniu badań nie wykryto u probantów badanego karotenoidu. Po dwóch tygodniach trwania doświadczeń zaobserwowano u probantów średnie stężenie β -karotenu wynoszące 0,19514 mg/g. W kolejnym tygodniu stężenie karotenoidu wynosiło 0,27257 mg/g. Następnie w czwartym tygodniu stężenie wzrosło do 0,33309 mg/g. Największe stężenie tego karotenoidu zaobserwowano w piątym tygodniu badań i wyniosło ono 0,38537 mg/g. Wyniki te potwierdzają wniosek, że wraz z czasem aplikacji kremu z β -karotenem, jego stężenie w *stratum corneum* probantów wzrasta (tab. 80).

Tab. 81. Analiza statystyczna zmiany stężenia β -karotenu od czasu trwania badania dla każdego probanta.

Wyniki testu post-hoc		
		Stężenia β-karotenu p testu
Stężenia β -karotenu [mg/g] 1 tydzień	Stężenia β -karotenu [mg/g] 2 tydzień	ns
Stężenia β -karotenu [mg/g] 1 tydzień	Stężenia β -karotenu [mg/g] 3 tydzień	ns
Stężenia β -karotenu [mg/g] 1 tydzień	Stężenia β -karotenu [mg/g] 4 tydzień	$p < 0,01$
Stężenia β -karotenu [mg/g] 1 tydzień	Stężenia β -karotenu [mg/g] 5 tydzień	$p < 0,001$
Stężenia β -karotenu [mg/g] 2 tydzień	Stężenia β -karotenu [mg/g] 3 tydzień	ns
Stężenia β -karotenu [mg/g] 2 tydzień	Stężenia β -karotenu [mg/g] 4 tydzień	ns
Stężenia β -karotenu [mg/g] 2 tydzień	Stężenia β -karotenu [mg/g] 5 tydzień	$p < 0,01$
Stężenia β -karotenu [mg/g] 3 tydzień	Stężenia β -karotenu [mg/g] 4 tydzień	ns
Stężenia β -karotenu [mg/g] 3 tydzień	Stężenia β -karotenu [mg/g] 5 tydzień	ns
Stężenia β -karotenu [mg/g] 4 tydzień	Stężenia β -karotenu [mg/g] 5 tydzień	ns

ns - nieistotne statystycznie (czyli $p > 0,05$).

Do analizy statystycznej wyników użyto Testu Friedmana $p < 0,0001$.

W tabeli 82 przedstawiono porównanie zmiany procentowej TEWL zbadanego od stężenia β -karotenu [$\mu\text{g/g}$].

Tab. 82. Porównanie zmiany procentowej wartości TEWL zmierzonego od stężenia β -karotenu [$\mu\text{g/g}$].

korelacje % TEWL zmierzonego z β -karotenem (mg/g)	współczynnik korelacji R	p testu
1 pomiar	-	-
2 pomiar	0,001	0,9989
3 pomiar	-0,144	0,7825
4 pomiar	-0,143	0,7826
5 pomiar	0,714	0,0881

Współczynnik korelacji p mierzy siłę zależności liniowej między zmianą procentowej wartości TEWL zmierzonego od stężenia β -karotenu. Współczynnik korelacji p jest bliski 1, co świadczy o „liniowej” zależności między analizowanymi cechami.

Wykazano, że obniżenie integralności bariery skórnej związane z odrywaniem kolejnych plastrów adhezyjnych, powodujące zwiększanie wartości TEWL, może jednocześnie zwiększyć szybkość absorpcji β -karotenu. Wpływa na to współczynnik podziału przenikania wody pomiędzy warstwą *stratum corneum* a żywym naskórkiem. Im większe uwodnienie naskórka, tym większy współczynnik podziału powodujący silniejszą absorpcję substancji

VII. WNIOSKI

1. Na podstawie badań lepkości kremów, przechowywanych w różnych warunkach stwierdzono, że im mniejsza zawartość wody w emulsji tym lepkość jest większa (emulsja typu W/O). Emulsje typu O/W przygotowane na zimno oraz na ciepło nieznacznie różniły się wartością lepkości. Największy spadek lepkości zanotowano dla kremów przechowywanych w temperaturze 45°C. Wartość początkowa lepkości praktycznie nie zmieniła się w temperaturze 4°C.
2. Dobrano odpowiednią metodę oznaczania zawartości β -karotenu w kremach komercyjnych przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Wykazano, że najbardziej odpowiednią fazą ruchomą do oznaczania wyżej wymienionego karotenoidu jest faza: A: metanol: woda (80:20 v/v), B: octan etylu. Stężenia masowe β -karotenu zawartego w badanych kremach komercyjnych o pojemności 100 g oscylowała między 3,10 - 10,45 mg.
3. Dobrano również odpowiednią metodę oznaczania zawartości likopenu w kremach komercyjnych przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Najbardziej odpowiednią fazą ruchomą do oznaczania wyżej wymienionego związku jest faza: A: acetonitryl: dichlorometan: metanol (70:20:10 v/v). Zawartość oznaczanego likopenu w wyżej wymienionych kremach komercyjnych wahała się w granicach 3,53 - 6,57 mg/100 g formulacji.
4. Na podstawie przeprowadzonych badań potwierdzono zależność spadku ilości β -karotenu jak i likopenu wprowadzonych do emulsji kosmetycznych od czasu przechowywania we wszystkich trzech warunkach. Likopen najszybciej ulega destabilizacji w temperaturze 45°C, natomiast najwolniej w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Najmniej stabilnym typem emulsji zawierającym β -karoten oraz likopen okazała się emulsja typu O/W. Najbardziej stabilna jest emulsja typu O/W przygotowana na zimno.
5. Widma spektroskopii ATR-IR kremów komercyjnych zawierających karotenoidy potwierdziły obecność β -karotenu, likopenu, astaksantyny w ich składzie. Zaobserwowano, że posiadają one charakterystyczne dla karotenoidów pasma odpowiadające drganiom zginającym C=C.
6. Potwierdzono antyoksydacyjne działanie zarówno kremów komercyjnych, jak i samodzielnie przygotowanych. Obliczeń dokonano za pomocą metody wygaszania wolnego rodnika DPPH^{*}. Wykazano, że antyoksydacyjne właściwości uzależnione są od zawartości karotenoidów w kremie, a wraz z upływem czasu inkubacji absorbancja próbki maleje. Najwyższym % inhibicji charakteryzują się karotenoidy zawarte w emulsjach typu O/W na zimno, natomiast najniższym % inhibicji cechują się karotenoidy zawarte w emulsji typu O/W. Najsilniejszymi właściwościami przeciwutleniającymi spośród kremów komercyjnych charakteryzował się krem Ava

Laboratorium, natomiast najniższymi właściwościami przeciwutleniającymi cechował się krem Bielenda Karoten, masło do ciała.

7. Udowodniono stabilność przygotowanych kremów zawierających karotenoidy przy użyciu metody wielokrotnego rozpraszania światła oraz badania rozkładu wielkości cząstek emulsji kosmetycznych techniką dyfrakcji laserowej. Zaobserwowano, że wraz z upływem czasu przechowywania emulsji postępuje zjawisko flokulacji, czyli agregacji cząstek. Wartość zmierzonych flokulacji świadczy o niewielkiej niestabilności emulsji, mieści się ona w granicach normy (-10%). Emulsja O/W przygotowana na zimno z udziałem koemulgatora, utrzymującego możliwie najniższe napięcie międzyfazowe, charakteryzuje się największą stabilnością. Wszystkie typy emulsji są najbardziej stabilne w temperaturze pokojowej bez dostępu światła, najmniej stabilne w temperaturze 45°C. Zawartość β -karotenu, likopeny czy astaksantyny we wszystkich typach emulsji nie wpłynęła istotnie na zmiany stabilności tych emulsji przechowywanych w różnych warunkach.
8. Badania *in vivo* przeprowadzone na probantach z wykorzystaniem samodzielnie przygotowanych emulsji kosmetycznych zawierających β -karoten, potwierdziły że badany krem jest skutecznym kosmetykiem. Stwierdzono poprawę poziomu nawilżenia skóry, zmniejszenie przeznaskórkowej utraty wody oraz wzrost elastyczności skóry po zastosowaniu kremu z karotenoidem. Stwierdzono również za pomocą aplikacji TRUE testów, czyli metody służącej ocenie działania drażniącego (ocena dermatologiczna), że β -karoten nie jest substancją uczulającą.
9. Przy użyciu badania biodostępności β -karotenu za pomocą metody zdzierania pasków adhezyjnych zaobserwowano, że wraz z czasem trwania badania wartość TEWL wzrasta co świadczy o poprawie tego parametru oraz kondycji skóry probantów. Obliczona wartość TEWL wzrasta proporcjonalnie do zwiększającej się ingerencji w głąb tkanki. Na podstawie profilu stężenia dla poszczególnych probantów określono pierwszorzędową stałą transportu β -karotenu D/L^2 , która określa szybkość absorpcji substancji aktywnej. Im większa wartość wyżej wymienionego parametru tym szybsza absorpcja. Wzrost wartości transepidermalnej utraty wody wraz z odrywaniem kolejnych plastrów adhezyjnych powoduje coraz głębszą ingerencję w warstwę SC. Im cieńsza grubość warstwy SC tym większa ilość wody przez nią przenika do środowiska zewnętrznego. Wartości TEWL wzrastają proporcjonalnie do całkowitej ingerencji w tkankę. Wartości dla poszczególnych probantów różnią się nieznacznie, jak wynika z scałkowanego równania profilu stężenia - całkowita ilość substancji aktywnej nie zależy od głębokości ingerencji w tkankę tylko od grubości warstwy SC. Analiza próbek pobranych podczas badania pokazała, że stężenie β -karotenu maleje w kolejnych oderwanych fragmentach naskórka. Świadczy to o wnikanii β -karotenu tylko do zewnętrznych warstw *stratum corneum*. Na podstawie badań transepidermalnej utraty wody oraz spektroskopii UV-Vis stwierdzono, że obniżenie

integralności bariery skórnej związane jest z odrywaniem kolejnych plastrów adhezyjnych powodujące zwiększanie wartości TEWL może jednocześnie zwiększyć szybkość absorpcji β -karotenu. Wpływa na to współczynnik podziału przenikania wody pomiędzy warstwą *stratum corneum* a żywym naskórkiem. Im mniejsze uwodnienie naskórka, tym większy współczynnik podziału powodujący silniejszą absorpcję substancji aktywnej. Zaobserwowano wzrost stężenia β -karotenu wraz z wzrostem wartości TEWL. Karotenoidy, w tym β -karoten są związkami liofilowymi, rozpuszczającymi się w tłuszczach. Na podstawie tej właściwości można stwierdzić, że mniejsze nawodnienie naskórka powoduje lepsze rozpuszczanie β -karotenu w lipidach skórnych, przez co obserwujemy wzrost stężenia β -karotenu przy jednoczesnym wzroście wartości TEWL. β -karoten mimo dość dużej masy molowej ($M=536$ g/mol) przenika w pewnym stopniu do warstwy naskórka *stratum corneum*, która dobrze przepuszcza cząstki do masy molowej $M=500$ g/mol [330].

VIII. STRESZCZENIE

Skóra stanowi bardzo dobry model badawczy w odniesieniu do całościowego zjawiska starzenia. Jest ona bezpośrednio narażona na destrukcyjne działanie czynników zewnętrznych. Ulega starzeniu szybciej niż pozostałe narządy naszego ciała. Poznanie mechanizmów starzenia się pozwala nam zrozumieć, w jaki sposób musimy zapobiegać i przeciwdziałać temu procesowi. Jest to proces wieloczynnikowy, regulowany przez czynniki genetyczne, jak i środowiskowe.

W rozprawie doktorskiej zaprezentowano zagadnienia literaturowe m.in. z zakresu chemii kosmetycznej. Przegląd literatury rozpoczął od budowy skóry, jej funkcji, a także opisu procesu starzenia się. Następnie, przedstawiono informacje na temat reaktywnych form tlenu oraz wolnych rodników i ich skutków działania na skórę. Doniesienia literaturowe wskazują, że organizm ludzki dysponuje kilkoma mechanizmami obronnymi, które neutralizują szkodliwe działanie reaktywnych form tlenu. Jedną z najważniejszych ról w zmniejszaniu uszkodzeń oksydacyjnych w ludzkim organizmie spełniają antyutleniacze. W kolejnym paragrafie dokonano przeglądu karotenoidów pod względem ich budowy, podziału, biosyntezy, właściwości oraz zastosowania. Ponadto w kolejnych rozdziałach opisano metody: badania *in vivo* formułacji kosmetycznych (testy na probantach), oceny stabilności emulsji kosmetycznych oraz określania składu form kosmetycznych. Ponadto podano informacje nt. badania biodostępności z wykorzystaniem metody zdzierania oraz kinetyki uwalniania substancji aktywnych z formułacji kosmetycznych.

W części doświadczalnej zaprojektowano oraz otrzymano formułacje kosmetyczne o określonym, pożądanym przeciwutleniającym spektrum działania. Właściwości fizykochemiczne takie jak: lepkość, pH, współczynnik refrakcji zostały określone przy pomocy różnych technik badawczych. Dokonano również obserwacji rodzaju emulsji z wykorzystaniem metody mikroskopowej. W dalszej części pracy oznaczono zawartości karotenoidów w preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Zanalizowano jakościowo karotenoidy zawarte w komercyjnych kremach metodą spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-IR). Określono właściwości antyoksydacyjne formułacji kosmetycznych zawierających karotenoidy na drodze pomiaru zdolności do wygaszania wolnego rodnika 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu. Przeprowadzono badania stabilności emulsji kosmetycznych zawierających karotenoidy metodą wielokrotnego rozpraszania światła. Pomiary prowadzono przez 100 dni. Kosmetyki przechowywane były w dwóch różnych temperaturach, w temperaturze pokojowej z dostępem lub bez światła oraz w temperaturze 45°C. Określono wpływ rodzaju formułacji kosmetycznej na stabilność badanych karotenoidów zawartych w tych emulsjach. Przeprowadzono również badanie rozkładu wielkości cząstek emulsji kosmetycznych techniką dyfrakcji laserowej, które wykazało rodzaj niestabilności występujący w badanych emulsjach kosmetycznych.

Podsumowując, w ramach pracy doktorskiej opracowano nowe receptury formułacji kosmetycznych z wybranymi karotenoidami oraz przeprowadzono badania *in vivo* na probantach z wykorzystaniem samodzielnie przygotowanych emulsji kosmetycznych zawierających β -karoten. Testy aplikacyjne potwierdziły poprawę poziomu nawilżenia,

elastyczności skóry oraz natłuszczenia skóry ochotników. Na podstawie badań wyciągnięto wniosek, że opracowany kosmetyk poprawia ogólną kondycję skóry. W wyniku prac, które przeprowadziłam na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, wykazano za pomocą badania biodostępności β -karotenu metodą zdzierania, że karotenoid ten przenika do górnej warstwy naskórka - *stratum corneum*.

Otrzymane wyniki powinny przyczynić się do rozwoju chemii kosmetycznej, nowej interdyscyplinarnej gałęzi nauki łączącej chemię, chemię analityczną oraz biotechnologię. Ponadto, uzyskane wyniki badań eksperymentalnych powinny pomóc w lepszym poznaniu wymagań stawianym preparatom kosmetycznym, a tym samym dostarczyć informacji niezbędnych w projektowaniu oraz badaniach wyrobów kosmetycznych z karotenoidami.

VIII. SUMMARY

The skin makes a very good model for investigation of the phenomenon of ageing. It is exposed to the destructive influence of external factors and its ageing is faster than that of the other parts of human body. The understanding of the mechanisms of ageing is expected to permit development of methods of slowing this process down. Ageing is a multifactor driven process, regulated by genetic and environmental agents.

The thesis begins with a survey of literature on ageing and cosmetic chemistry. The structure of skin, its functions and the known information on the mechanisms of its ageing are presented. In particular the roles of the reactive oxygen species and free radicals and their effect on the skin are described together with the protective mechanisms developed by the human organisms to neutralise the destructive effects of the reactive oxygen species and free radicals. Particular attention has been paid to the antioxidants and their effect on the oxidative skin damage. The second chapter of the thesis concerns a special group of antioxidants that is carotenoids. Their types, structures, biosynthesis, properties and application are presented and discussed. The methods for *in vivo* investigation of cosmetic formulations (tests on probands), for evaluation of stability of cosmetic formulations and determination of the composition of cosmetic formulations are described along with the methods for evaluation of bioavailability with the use of stripping and kinetics of active ingredient release from cosmetic formulations.

The aim of the experimental part was to design and synthesise cosmetic formulations of antioxidating effect based on carotenoids as the active ingredients. Physicochemical properties of the formulations, including viscosity, pH and refraction coefficient were determined by appropriate methods. The type of emulsion obtained in the formulation was established under a microscope. The content of carotenoids in the cosmetic formulations made was determined by high-performance liquid chromatography. The quality of carotenoids contained in the commercial cosmetic creams was evaluated by the method of attenuated total reflection in infrared (ATR-IR). By measuring the ability to quench free radical of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil the antioxidative properties of cosmetic formulations comprising carotenoids were evaluated. By the method of multiple light scattering the stability of cosmetic emulsions containing carotenoids was tested. The tests were performed for 100 days. For the test duration the cosmetic products were kept in different regimes: at room temperature with or without access of light or at 45°C. The influence of the type of cosmetic formulation on the stability of carotenoids contained in the emulsions was studied. The particle size distribution of the cosmetic emulsions was determined by the method of laser diffraction and revealed the types of instability developing in them.

Within the doctoral dissertation a new cosmetic formulation with beta carotenoid as an antioxidant was designed, obtained and tested *in vivo* on a group of probands. The application tests confirmed improvement in skin moisturising, elasticity and oiling of the skin of the probands. The cosmetic product designed and proposed was shown to improve the general condition of the skin. The study of beta-carotenoid bioavailability by the method of stripping proved that this carotenoid penetrates to the upper layer of epidermis, *stratum corneum*.

The results contribute to development of cosmetic chemistry, a new interdisciplinary branch of research combining chemistry, analytical chemistry and biotechnology. The results of the experiment have brought new information needed for design and characterisation of cosmetic products containing carotenoids.

IX. LITERATURA

1. Martini C.M. Kosmetologia i farmakologia skóry. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa. 2007.
2. Jabłońska S., Chorzelski T. Choroby skóry. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.
3. Zabel M. Histologia. Podręcznik dla studentów medycyny i stomatologii., wyd. I, Elsevier Urban & Partner. Wrocław. 2000.
4. http://www.cosmetic.pl/pro/elementy/skora_cosmetic_1.jpg, data dostępu 12.01.15.
5. <http://kosmetyka-uroda.blogspot.com/2012/10/kosmetologia-pielegnacyjna.html>, data dostępu 12.01.15.
6. Sawicki W. Histologia., wyd. IV, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2003.
7. Graham-Brown R., Bourke J., Dermatologia podręcznik i atlas., wyd. II, Elsevier Urban & Partner. Wrocław. 2010.
8. Zegarska B., Woźniak M. Przyczyny wewnątrzpochodnego starzenia się skóry. Gerontol. Pol. 2006, 14, 153-159.
9. Batko J. Mechanizm procesu starzenia się. Nasza droga do kosmetologii. WSZPZiU. Poznań. 2005.
10. Kopczewska M., Kopczewski B. Apoptoza - genetycznie zaprogramowana śmierć komórki. Nowiny Lekarskie. 2004.
11. Olek-Hrab K., Hawrylak A., Czarnecka-Operacz M. Wybrane zagadnienia z zakresu starzenia się skóry. Post. Dermatol. Alergol. 2008, 5, 226-234.
12. Ramos-e-Silva M., Coelho da Silca Carneiro S. Elderly skin and its rejuvenation: products and procedures for the aging skin. J. Cosmet. Dermatol. 2007, 6, 40-50.
13. Callaghan T.M., Wilhelm K.P. A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part I: Cellular and molecular perspectives of skin ageing. Int. J. Cosmetic Sci. 2008, 30, 313-322.
14. Augustyniak A., Skrzydlewska E. Zdolności antyoksydacyjne w starzejącym się organizmie. Postępy Hig. Med. Dośw. 2004, 58, 194-201.
15. Yaar M., Gilchrest B.A. Skin aging: postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. Clin. Geriatr. Med. 2001, 17, 617-630.
16. Gosain A., DiPietro L. Aging and wound healing. World J. Surg. 2004, 28, 321-326.
17. Gilhar A., Ullmann Y., Karry R. Ageing of human epidermis: the role of apoptosis. Fast and telomerase. Br. J. Dermatol. 2004, 150, 56-63.
18. Żakowska-Wachelko B., Pędich W. Pacjenci w starszym wieku. PZWL. Warszawa. 1995.
19. Dean W., Morgan R.F. In defense of the concept of biological aging measurement: current status. Arch. Gerontol. Geriatr. 1988, 7, 191-210.
20. Giacomoni P.U., Rein G. A mechanistic model for the aging of human skin. Micron. 2004, 35, 179-184.
21. Yu C.E., Oshima J., Fu Y.H. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. Science. 1996, 272, 258-262.
22. Beauregard S., Gilchrest B.A. Syndromes of premature aging. Dermatol. Clin. 1987, 5, 109-111.

23. Troelstra C., van Gool A., de Wit J., Vermeulen W., Bootsma D. ERCC6, a member of subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell*. 1992, 7, 939-941.
24. Guinot C., Malvy D., Tenenhaus M. Relative contribution of intrinsic vs. extrinsic to skin aging as determined by a validated skin age score. *Arch. Dermatol.* 2002, 138, 1454-1460.
25. Alsopp R.C. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992, 89, 101-114.
26. Vaziri H., Benchimol S. Form telomere loss to p53 induction and activation of a DNA - damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp. Gerontol.* 1996, 31, 295-298.
27. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 1965, 37, 614-636.
28. Hayflick L. *Cell aging*. Springer Publishing Co. New York. 1980.
29. Hayflick L. *Cerebrovascular Diseases*. Raven Press. New York. 1976.
30. Okuda K., Bardequez A., Gardner J.P., Rodriguez P., Ganesh V., Kimura M., Skurnick J., Awad G., Aviv A. Telomere length in the newborn. *Pediat. Res.* 2002, 52, 377-381.
31. Lindsey J., McGill N., Lindsey L., Green D., Cooke H. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat. Res.* 1991, 256, 45-48.
32. Blackburn E.H. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991, 350, 569-572.
33. Davies I. *The mechanisms of ageing*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1992.
34. Milewicz D.M., Urban Z., Boyd C. Genetic disorders of the elastic fiber system. *Matrix Biol.* 2000, 19, 471-480.
35. Hadshiew I., Eller M., Gilchrist B. Age-associated decrease in human DNA repair capacity: implications for the skin. *Age*. 1999, 22, 45-48.
36. Gilchrist B.A. Skin aging recent advances and current concepts. *Cutis*. 2003.
37. Gilhar A., Ullmann Y., Karry R., Shalaginov R., Assy B., Serafimovich S., Kalish R.S. Aging of human epidermis: reversal of aging changes correlates with reversal of keratinocyte fas expression and apoptosis. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2004, 59, 411-5.
38. Sessler T., Healy S., Samali A., Szegezdi E. Structural determinants of DISC function: New insights into death receptor-mediated apoptosis signaling. *Pharmacol. Ther.* 2013, 118, 186-99.
39. Zs.-Nagy I. A membrane hypothesis of aging. *J Theor. Biol.* 1978, 75, 189-195.
40. Berneburg M., Gremmel T., Kurten. Creatine supplementation normalizes mutagenesis of mitochondrial DNA as well functional consequences. *J. Invest. Dermatol.* 2005, 125, 220-225.
41. Ghadially R., Brown B.E., Sequeira-Martin S. The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in human and senescent murine model. *J. Clin. Invest.* 1995, 95, 2281-2290.
42. Jurgowiak M. Ile przed nami? *Wiedza i Życie*. 2005, 10, 55-61.
43. Yaar M., Gilchrist B.A. Aging versus photoaging: postulated mechanisms and effectors. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 1998, 3, 47-51.

44. Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H.H., Burgdorf W.H.C. *Dermatologia*. Czelej. Lublin. 2002.
45. Błaszczuk-Kostanecka M., Wolska M. *Dermatologia w praktyce*. PZWL. Warszawa. 2005.
46. Baran R., Maibach H. *Textbook of cosmetic dermatology*. Martin Dunitz Ltd. London. 1998.
47. Marzec A. *Chemia Kosmetyków: surowce, półprodukty, preparatyka wyrobów.*, wyd. II, TNOiK Dom Organizatora. Toruń. 2005.
48. Kujawska-Dębiec K., Broniarczyk-Dyła G. Wybrane choroby skóry spowodowane wpływem działania promieni słonecznych. *Post. Dermatol. Alergol.* 2008, 2, 61-65.
49. Rouger A. Czy promieniowanie UV jest niebezpieczne? *Post. Dermatol.* 1999, 7, 351-357.
50. Wolska H. Zewnętrzne środki chroniące przed światłem. *Dermatologia Estetyczna*. 1999, 1, 20-27.
51. Svobodová A., Psotová J., Walterová D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. *Biomed. Pap.* 2003, 147, 137-145.
52. Maier T., Korting H.C. Sunscreens - which and what for. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2005, 18, 253-262.
53. Salvador A., Chisvert A. A critical survey on UV filters determination. *Anal. Chim. Acta.* 2005, 537, 1-14.
54. Moloney F.J., Collins S., Murphy G.M. Sunscreens. Safety, efficacy and appropriate use. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2002, 3, 185-191.
55. Ambroziak M., Langner A. Uszkodzenie posłoneczne skóry i stany przednowotworowe: zapobieganie i leczenie. Współczesne leczenie wybranych chorób skóry. OIN Polfa. Warszawa. 2002.
56. Badarinath A.V., Mallikarjuna K., Madhusudhanachetty C., Ramkanth S., Rajan T.V.S., Gnanaprakash K. In-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *Pharm. Tech.* 2010, 2, 1276-1285.
57. Sohal R.S., Orr W.C. Relationship between antioxidants, prooxidants, and the aging process. *Acad Sci.* 1992, 21, 74-84.
58. Sokołowska E. Wpływ stresu oksydacyjnego indukowanego przez wodoronadtlenek kumenu na aktywność aromatazy w komórkach choriocarcinoma. Gdański Uniwersytet Medyczny. Gdańsk. 2010.
59. Kisała J. Antyutleniacze pochodzenia roślinnego i syntetycznego - ich rola i właściwości. *Zeszyt Naukowy*. 2009, 11, 109-114.
60. Schopfer P., Plachy C., Frahy G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellins, and abscisic acid. *American Society and Plant Biologists.* 2001, 125, 1591-1602.
61. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany.* 2003, 91, 179-194.
62. Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama K. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants. *Biomed. Res. Int.* 2014, 1, 1-19.
63. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 1997, 82, 291-5.

64. Bartosz G. Druga twarz tlenu. PWN. 2003.
65. Leja M., Mareczek A. Wybrane związki zawarte w roślinach mające wpływ na ich wartość biologiczną. Antyoksydacyjne wartości roślin. Katedra Fizjologii Roślin. Wydział Ogrodniczy AR w Krakowie. Kraków. 2001.
66. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 2004, 55, 373-99.
67. Thiel J.J., Elsner P. Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology. *Current Problem in Dermatology*. Zurich. 2001.
68. Ziemiański Ś., Wartanowicz M. Rola wolnych rodników w procesie starzenia się ustroju. *Pol. Tyg. Lek.* 1982, 37, 1453-1456.
69. Cybul M., Nowak R. Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych. *Herba. Polonica*. 2008, 54, 68-78.
70. Del Rio L.A., Javier Corpas F., Sandalio L.M., Palma J.M., Gomez M., Barroso J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J. Exp. Bot.* 2002, 53, 1255-1272.
71. Shur Y.J. Molecular mechanisms of chemo-preventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutation. Res.* 1999, 428, 305-327.
72. Halliwell B., Gutteridge J., M. Free radicals in biology and medicine. Oxford University. New York. 1999.
73. Kreger, B.E., Dorgan, J.F. Alcohol consumption and risk of breast cancer: The Framingham Study revisited. *JAMA*. 1998, 279, 535-540.
74. Sevilla M.D., Becker D, Yan M. The formation and structure of the sulfoxyl radicals RSO(·), RSOO(·), RSO₂(·), and RSO₂OO(·) from the reaction of cysteine, glutathione and penicillamine thiyl radicals with molecular oxygen. *Int. J. Radiat. Biol.* 1990, 57, 65-81.
75. Bland J.S. Oxidants and antioxidants in clinic medicine. *J. Nutr. Environ. Med.* 1995, 5, 255-262.
76. Nowicka B., Kruk J. Reaktywne formy tlenu w roślinach - więcej niż trucizna. *Kosmos*. 2013, 62, 583-596.
77. Puzanowska - Tarasiewicz H. Starczewska B., Kuźnicka L. Reaktywne formy tlenu. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2008, 4, 1007-1015.
78. Carocho M., Ferreira I.C.F.R.A review on antioxidants, prooxidants and related controversy : Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food. Chem. Toxicol.* 2013, 51, 15-25.
79. Fratianni A., Cinquanta L., Panfili G. Degradation of carotenoids in Orange juice during microwave heating. *Food Sci. Technol.* 2010, 43, 71-867.
80. Park H.H., Lee S., Son H.Y., Park S.B., Kim M.S., Choi E.J., Singh T.S.K., Ha J.H., Lee M.G., Kim J.E., Hyun M.C., Kwon T.K., Kim Y.H., Kim S.H. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharmacol. Res.* 2008, 31, 1303-1311.
81. Ray P., D. Huang B.W., Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular. *Cell. Signal.* 2012, 24, 981-990.
82. Grajek W. Rola przeciwutleniaczy w zmniejszeniu ryzyka wystąpienia nowotworów i chorób układu krążenia. *Żywn. Nauk. Technol.* 2004, 38, 2-11.

83. Cutler R.G., Packer L., Bertran J., Mori A. Oxidative stress and aging. *Molecular Biology*. Kiev. 2013.
84. Moise A.R., Al-Babili S., Wurtzel E.T. Mechanistic Aspects of Carotenoid Biosynthesis. *Che. Rev.* 2014, w druku; x.doi.org/10.1021/cr400106y.
85. Han R.M., Zhang J.P., Skibsted L.H. Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants. *Mol.* 2012, 17, 2140-2160.
86. Umeno D., Tobias A.V., Arnold R.H. Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005, 69, 51-78.
87. Alvarez R., Vaz B., Gronemeyer H., de Lera, A.G. Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. *Chem. Rev.* 2014, w druku; dx.doi.org/10.1021/cr400126u.
88. Skibsted, L. H. Carotenoids in antioxidant networks. Colorants or radical scavengers *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 2409-2417.
89. Gey K.F. Ten- years retrospective on the antioxidant hypothesis of arteriosclerosis: threshold plasma levels of antioxidant micronutrients related to minimum cardiovascular risk. *J. Nutr. Biochem.* 1998, 6, 206-236.
90. Scheer H. Chemistry of chlorophylls and carotenoids. John Wiley & Sons, Inc. All. 2008.
91. Dwyer J.H., Navab M. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. *Circ.* 2002, 103, 2922-7.
92. Liang J., Tian Y.X., Yang F., Zhang J.P., Skibsted L.H. Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. *Food Chem.* 2009, 115, 1437-1442.
93. Nguyen M., L., Schwatz S.J. Lycopene: chemical and biological properties. *Food Technol.* 1999, 53, 38-45.
94. Rao A.V., Agarwals. Bioavailability and antioxidant properties of lycopene from tomato products. *Nutr. Cancer.* 1998, 31, 199-203.
95. Burton G.W. Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutr.* 2015, 13, 109-111.
96. Lowe G.M., Vlismas K., Young A.J. Carotenoids as prooxidants. *Mol. Aspects. Med.* 2003, 24, 363-369.
97. Naguib Yousry M.A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 1150-1154.
98. Lorenz R.T. Astaxanthin nature's super carotenoid. *Bio. Astin. Technical Bulletin.* 2000, 62, 1-19.
99. Edge R., Land E. J., McGarvey D., Mulroy L., Truscott T.G. Relative one-electron reduction potentials of carotenoid radical cations and the interactions of carotenoids with the vitamin E radical cation. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 4087-4090.
100. Gacche R.N., Kabaliye V.N., Dhole N.A. Jadhav A.D. Antioxidant potential of selected vegetables commonly used in diet in Asian subcontinent. 2010, 3, 306-313.
101. Grajek W. Przeciwutleniacze w żywności. Aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne. WNT. Warszawa. 2007.
102. Grysczyńska A., Grysczyńska B., Opala B. Karotenoidy. Naturalne źródła, biosynteza, wpływ na organizm ludzki. *Post. Fizjoterapii.* 2002, 2, 127-143.

103. Juola F.A., Mc Graw K., Dearborn D.C. Carotenoids and throat pouch coloration in the great frigate bird. *Comp. Biochem. Physiol.* 2008, 149, 370-7.
104. Andersson S.C. Carotenoids, tocochromanols and chlorophylls in sea buckthorn berries and rose hips. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences. Alnarp. 2009.
105. Christaki E., Bonos E., Giannenas I., Florou-Paneri P., Functional properties of carotenoids originating from algae. *J. Sci. Food Agric.* 2013, 93, 5-11.
106. Iturriga E.A., Velayos A., Eslava A.P., Structure and function of the genes involved in the biosynthesis of carotenoids in the mucorales. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2000, 5, 263-274.
107. Wilska-Jeszka J. *Chemia żywności. Składniki żywności.* Wydawnictwo Naukowo-Technologiczne, Warszawa, 2007.
108. Jomova K., Valko M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 70, 102-10.
109. Jackson H., Braun C.L., Ernst H. The Chemistry of novel xanthophyll carotenoids. *Am. J. Card.* 2008, 10, 51-57.
110. Kączkowski J. *Biochemia roślin. Przemiany typowe.* Państwowe Wydawnictwo Naukowe. Warszawa. 1982.
111. Sikora M. Karotenoidy, wielofunkcyjne składniki preparatów kosmetycznych. *Magazyn Bez Recepty.* 2011, 5, 17-30.
112. Rivera S.M., Canela-Garayoa R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *J. Chrom. A.* 2012, 1224, 1-10.
113. Jaswir I., Novindri D., Hasrini R.F., Octavianti F. Carotenoids: sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *J. Med. Plants. Res.* 2011, 5, 7119-7131.
114. Rodríguez-Bernaldo de Quirós A., Costa H.S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: a review. *J. Food Compos. Anal.* 2006, 19, 97-111.
115. Widomska J., Kostecka-Gugała A., Latowski D. Calorimetric studies of the effect of cis-carotenoids on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine bilayers. *Biophys. Chem.* 2009, 140, 108-14.
116. Sahabi D.M., Shehu R.A., Saidu Y., Abdullahi A.S. Carotenoids and β -Carotene in some widely consumed vegetables in Nigeria. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science.* 2012, 3, 225-227.
117. Tobias A.V., Arnold F.H. Biosynthesis of novel carotenoid families based on unnatural carbon backbones: A model for diversification of natural product pathways. *BBA.* 2006, 1761, 235-46.
118. Simkin A.J., Moreau H., Kuntz M. An investigation of carotenoids biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. *J. Plant. Physiol.* 2008, 165, 1087-106.
119. Marionnet C., Pierrard C., Vioux-Chagnoleau C., Sok J., Asselineau D., Bernerd F. Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal function in a model of reconstructed skin. *J. Invest. Dermatol.* 2006, 126, 971-97.
120. Rock C.L. Carotenoids: Biology and treatment. *Pharmacol. Ther.* 1997, 3, 185-197.

121. Vilchez C., Forjan E., Cuaresma M., Bedmar F., Garbayo I., Vega J.M. Marine Carotenoids: Biological functions and commercial applications. *Marine Drugs*. 2011, 9, 319-333.
122. Darvin, M.E., Fluhr, J.W., Caspers, P., Van Der Pool, A., Richter, H., Patzelt, A., Sterry, W., Lademann, J. In vivo distribution of carotenoids in different anatomical locations of human skin: comparative assessment with two different Raman spectroscopy methods. *Experimental Dermatology*. 2009, 18, 1060-1063.
123. Darvin M.E., Fluhr J.W., Schanzer S., Richter H., Patzelt A., Meinke M.C., Zastrow L., Golz K., Doucet O., Sterry W., Lademann J. Dermal carotenoid level and kinetics after topical and systemic administration of antioxidants: Enrichment strategies in a controlled in vivo study. *J. Dermatol. Sci*. 2011, 64, 53-58.
124. Darvin M.E., Gersonde I., Albrecht H., Sterry W., Lademann J. In vivo Raman spectroscopic analysis of the influence of UV radiation on carotenoid antioxidant substance degradation of the human skin. *Laser Physics*. 2006, 5, 833-837.
125. Darvin M.E., Meinke M.C., Friedrich A., Tscherch K., Haag S.F., Vollert H., Groth N., Lademann J., Rohn S. Influence of dietary carotenoids on radical scavenging capacity of the skin and skin lipids. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013, 84, 365-373.
126. Igielska-Kalwat J., Gościańska J., Nowak I. Astaksantyna - cenny składnik preparatów kosmetycznych. *Kosmetologia Estetyczna*. 2013, 2, 83-85.
127. Igielska-kalwat J. Wawrzyńczak A., Nowak I. Karotenoidy i ich zastosowanie w przemyśle kosmetycznym. *Chemicz.* 2012, 2, 140-144.
128. Igielska-Kalwat J., Gościańska J., Nowak I. Zastosowanie likopenu w dermokosmetykach, *Przem. Chem.* 2014, 7, 1110-1130.
129. Ziemiański Ś. Normy Żywienia człowieka. PZWL. Warszawa. 2001.
130. Hurst W.J. *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, CRC PRESS. 2002.
131. Sies H., Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995, 62, 1315-1321.
132. Han R.M., Zhang J.P., Skibsted L.H. Reaction dynamics of flavonoids and carotenoids as antioxidants. *Mol.* 2012, 17, 2140-2160.
133. Bayerl C. Beta-carotene in dermatology: does it help? *APA*. 2008, 4, 160-166.
134. Staniszek K., Goździcka-Józefiak A. Wpływ β -karotenu, retinoidów i receptorów retinoidowych na proliferację i transformację nowotworową komórek. *Biotechnologia*. 2008, 3, 28-45.
135. Mączka W., Wińska K. β -karoten - przyjaciel czy wróg? Część I. *Postępy Kosmetologii*. 2011, 4, 259-262.
136. β -karoten. Technical Evaluation Report Compiled by the Technical Services Branch for the USDA National Organic Program Supplemented by IFC International. 2012.
137. Wertz K., Seifert N., Hunziker P.B., Riss G., Wyss A., Lankin C., Góralczyk R. Beta-carotene inhibits UVA-induced matrix metalloprotease 1 and 10 expression in keratinocytes by a singlet oxygen-dependent mechanism. *Free Radic. Biol. Med.* 2004, 5, 654-70.

138. Luo M., Estivariz C.F., Schleicher R.L. Prospective analysis of serum carotenoids. Vitamin A and tocopherols in adults with short bowel syndrome undergoing intestinal rehabilitation. *J. Nutr.* 2009, 25, 400-7.
139. Rice- Evans C., Miller N., Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant. Sci.* 1997, 2, 152-159.
140. Jeśko A. Substancje aktywne w kosmetyce. 2012.
141. Cabric M., Pokrywka L. Piękne ciało. Wydawnictwo naukowe PWN. Warszawa. 2010.
142. Olemparska-Beer Z. Lycopene (synthetic). Chemical and technical assessment. 2006.
143. Shi J., Dai Y., Kakuda Y., Mittal G., Xue S.J. Effect of heating and exposure to light on the stability of lycopene in tomato purée. *Food Control.* 2008, 19, 514-520.
144. Turski J.S., Więclawek B. Barwniki roślinne i zwierzęce. Państwowe Wydawnictwo Techniczne. Warszawa. 1952.
145. Gärtner C., Stahl W., Sies H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997, 66, 116-122.
146. Kwiatkowska E. Likopen w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. *Post. Fitoterapii.* 2010, 1, 38.
147. Brady W.E., Mares-Perlman J.A., Bowen P. Human serum carotenoid concentrations are related to physiologic and life style factors. *J. Nutr.* 1992, 37, 126-129.
148. Islamin J.P., Mehrali H. Lycopene as a carotenoid provides radioprotection and Antioxidant Effects by Quenching Radiation-Induced Free Radical Singlet Oxygen. *Cell J.* 2015, 16, 386-391.
149. Rao A.V., Agarwal S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J. Am. Coll. Nutr.* 2000, 19, 563-569.
150. Martinez-Valverde I., Periago M.J., Provan G., Chesson A. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Sci. Food Agric.* 2002, 82, 323-330.
151. Agarwal S., Rao A.V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ.* 2000, 6, 739-744.
152. Bober J., Dollgowska B., Stachowska E., Kucharska E. Likopen - naturalny antyoksydant. *Czyn. Ryz.* 2005, 1, 61-66.
153. Subczyński W.K., Wiśniewska A., Widomska J. Location of macular xanthophylls in the most vulnerable regions of photoreceptor outer-segment membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 2010, 1, 61-66.
154. Heber D., Qing-Yi L. Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp. Biol. Med.* 2002, 227, 920-923.
155. Di Mascio D., Kaiser S., Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoids singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989, 274, 532-538.
156. Kumavat S.D., Vhaudhari Y.S. Lycopene; It's role as prostate cancer chemopreventive agent. *IJRPC.* 2013, 3, 545-551.
157. Basu A., Imrhan V. Tomatoes versus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis conclusions from clinical trials. *Eur. J. Clin.* 2007, 61, 295-303.

158. Heinrich U., Tronnier H., Stahl W., Béjot M., Maurette J.M. Antioxidant supplements improve parameters related to skin structure in humans. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2006, 19, 224-231.
159. Sahasrabuddhe S.H., Lycopene-An Antioxidant. *Pharma Times.* 2001, 12, 13-15.
160. Capelli B., Cysewski G.R. Astaksantyna. Naturalna astaksantyna - królowa karotenoidów. Copyright by Cyanotech Corporation. 2007.
161. Stachowiak B., Czarnecki Z. Drożdże *Phaffia Rhodozyma* jako potencjalne źródło naturalnej astaksantyny. *Żywność.* 2006, 2, 17-28.
162. Guerin M., Huntle M.E., Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends. in Biotechn.* 2003, 21, 210-216.
163. Seki T., Sueki H., Kohno H., Suganuma K., Yamashita E. Effects of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* on human skin. *Fragrance Journal.* 2001, 12, 98-103.
164. Arakane K. Superior Skin Protection via Astaxanthin. Research & Development Division. KOSE Corporation. 2003.
165. Black H.S. Radical interception by carotenoids and effects on UV carcinogenesis. *Nutr. Cancer.* 2004, 3, 212-217.
166. Camera E, Mastrofrancesco A, Fabbri C, Daubrawa F, Picardo M, Sies H, Stahl W. Astaxanthin, canthaxanthin and beta-carotene differently affect UVA-induced oxidative damage and expression of oxidative stress responsive enzymes. *Exp Dermatol.* 2009, 3, 222-231.
167. Gościńska J, Olejnik A, Nowak I. *Analityka Kosmetyczna. Cursiva.* Kostrzyn. 2012.
168. Tominaga K., Hongo N., Karato M., Yamashita E. Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. *Acta Biochim. Pol.* 2011, 1, 43-47.
169. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych. *Dz.U.L.* 342 z 22.12. 2009, 59-209.
170. Ustawa z dnia 30 marca 2001 r. o kosmetykach *Dz.U.*2001.42.473 wraz z późniejszymi zmianami (tekst pierwotny: *Dz. U.* 2001 r. Nr 42 poz. 473) (tekst jednolity: *Dz. U.* 2013 r. poz. 475).
171. Dębowska R. In vitro and ex vivo tests in contemporary cosmetology. *Chemik.* 2010, 2, 74-79.
172. Michael K., Robinson M., Perkins A. A Strategy for Skin Irritation Testing. *Am. J. Contact. Derma.* 2002, 13, 21-29.
173. Basketter D., Jirova D., Kandarova H. Review of skin irritation/corrosion Hazards on the basis of human data: A regulatory perspective. *Interdiscip Toxicol.* 2012, 2, 98-104.
174. Kandárová H., Hayden P., Klausner M., Kubilus J., Sheasgreen J. An in vitro skin irritation test (SIT) using the epidermis reconstructed human epidermal (RHE) model. *J Vis Exp.* 2009, w druku; doi: 10.3791/1366.
175. Klausner M., Ayehunie S., Hayden P.J., Ballavance K.L., Lamore S.D. Full thickness Epiderm, a dermal - epidermal skin model to study epithelial-mesenchymal interaction. *J. Invest. Dermatol.* 2002, 119, 260-266.
176. Elias P.M. Stratum Corneum Defensive Functions: An Integrated View. *J Invest Dermatol.* 2005, 125, 183-200.

177. Tupker R.A, Willis C., Berardesca E., Lee C.H. Guidelines on sodium lauryl sulphate (SLS) exposure tests. A report from the standardization group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1997, 37, 53-69.
178. Dickiel H., John S.M. Ratio of irritant contact dermatitis to allergic contact dermatitis in occupation skin disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2003, 2, 360-361.
179. Fluhr J.W., Daelenski R., Angelova-Fischer I. Tsankova N. Skin irritation and sensitization: mechanisms and new approaches for risk assessment. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2008, 21, 191-202.
180. Belsito D.V. Occupational contact dermatitis Etiology, prevalence, and resultant impairment/disability. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2005, 53, 303-313.
181. Levin C.Y., Maibach H.I. Irritant contact dermatitis is there an immunologic component? *Int. J. Immunopharmacol.* 2002, 2, 183-189.
182. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Ruth P. Kompendium farmakologii I toksykologii Mutschlera. *Med. Pharm. Wrocław*. 2008.
183. Berardesca E., Distant F. The modulation of skin irritation. *Contact Dermatitis*. 1994, 31, 281-287.
184. Berardesca E., Barbareschi M., Veraldi S., Pimpinella V. Evaluation of efficacy of a skin lipid mixture in patients with irritant contact dermatitis, allergic contact dermatitis or atopic dermatitis: a multicenter study. *Contact Dermatitis*. 2001, 44, 280-285.
185. Basketter D. A., Whittle E., Griffiths H. A., York M. The identification and classification of skin irritation hazard by a human patch test. *Fd. Chem. Toxicol.* 1994, 32, 769-775.
186. Kartono F., Maibach H.I. Irritants in combination with a synergistic or additive effect on the skin response an overview of tandem irritation studies. *Contact Dermatitis*. 2006, 54, 303-312.
187. Sertol A., Gola M., Martinelli C., Angelini G. Epidemiology of contact dermatitis. *Semin. Dermatol.* 1989, 8, 120-126.
188. Robinson M.K., Kruszewski E.K., Al-Atrash I., Blazka M.E. Comparative assessment of the acute skin irritation potential of detergent formulations Using a novel human 4-h patch test method. *Food Chem. Toxicol.* 2005, 43, 1703-1712.
189. Tupker R.A., Pinnagoda J., Nater J.P. The transient and cumulative effect of sodium lauryl sulphate on the epidermal barrier assessed by transepidermal water loss: inter-individual variation. *Acta Derm. Venereol.* 1990, 70, 1-5.
190. Martins L.E.A.M., Silv V.M. Immunopathology of allergic contact dermatitis. *An. Bras. Dermatol.* 2011, 3, 419-433.
191. Albert M., Kligman M.D. The identification of contact allergens by human assay. *J Invest. Dermatol.* 1966, 47, 367-374.
192. Draize, J.H. Dermal toxicity. Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics. Association of food and drug officials of the United States, Texas State Department of Health. Austin. 1959.
193. Hannuksela A., Hannuksela M. Irritant effects of a detergent in wash, chamber and repeated open application tests. *Contact Dermatitis*. 1996, 34, 134-137.
194. Podlewska K. Testy kontaktowe- ich rola w badaniu kosmetyków. *Świat Przemysłu Kosmetycznego* 2011, 2, 12-13.

195. Jirova D., Liebsch M., Basketter D., Spiller E. comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular in vitro assays and animal in vivo data. *AATEX*. 2008, 14, 359-365.
196. Basketter D. The human repeated insult patch test in the 21 st century: a commentary. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 2009, 28, 49-53.
197. Romano A., Marinella V., Gaeta F., Rumi G. Patch Testing in non-immediate drug eruptions. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2008, 2, 66-74.
198. Barany E., Lindberg M., Loden M. Biophysical characterization of skin damage and recovery after exposure to different surfactants. *Contact Dermatitis*. 1999, 40, 98-103
199. Rycroft R.J.G., Menne T., Frisch P.J., Lepoittévin J.P. Textbook of contact dermatitis. Springer. Berlin. 2001.
200. Fischer T., Kreilgård B., Maibach, H.I. The true value of the TRUE Test for allergic contact dermatitis. *Curr. Allergy and Asthma Reports*. 2001, 1, 316-322.
201. Gollhausen R., Przybilla B., Ring J. Reproducibility of patch test results: comparison of TRUE Test and finn chamber test results. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1989, 2, 843-846.
202. Kajds T.M., Gartstein V. Review of the instrumental assessment of skin: Effects of cleansing products. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1991, 42, 249-271.
203. Kosboth M., Chin-Loy A., Lyons R., Wesson S.K., Reeves W.H. Malay rash caused by metal allergy in a patient with systemic lupus erythematosus. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2007, 3, 240-245.
204. <http://alergiaweb.com/alergia-de-contacto/>; data dostępu 14.07.2014r.
205. Spoo J., Wigger-Alberti W., Berbadt U., Fischer T., Elsner P. Skin cleansers: Three test protocols for the assessment of irritancy ranking. *Acta Derm. Venereol.* 2002, 82, 13-17.
206. Zaghi D., Maibach H.O. Quantitative relationship between patch test reactivity and use test reactivity: an overview. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 2008, 27, 241-248.
207. Nigam P.K. Adverse reactions to cosmetics and methods of testing. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2009, 75, 10-19.
208. Śpiewak R. Alergia kontaktowa - diagnostyka i postępowanie. *Alerg. Astma Immun.* 2007, 12, 109-127.
209. Tupker R.A., Schuur J., Coenraads P.J. Irritancy of antiseptics tested by repeated open exposures on the human skin, evaluated by non - invasive methods. *Contact Dermatitis*. 1997, 5, 213-217.
210. Slotosch C.M., Kampt G., Loffler H. Effects of skin disinfectants and determents on skin irritation. *Contact Dermatitis*. 2007, 57, 235-241.
211. Clemmensen A., Andersen E., Petersen T.K., Kalden H. The irritant potential of n-propanol (nonionic acid vehicle in cumulative skin irritation: a validation study of two different human in vivo test model. *Skin Res. Technol.* 2008, 14, 277-286.
212. Rogiers V., Balls M., Basketter D., Berrardesco E. The potential use of Non- invasive methods in the safety assessment of cosmetic products. *Atla*. 1999, 27, 616-637.
213. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/docs/service_contract_20096104_en.pdf; data dostępu 14.07.2014.
214. Pierard G.E. Instrumental non-invasive assessments of cosmetic efficacy. *J. Cosmet. Dermatol.* 2002, 2, 57-58.

215. Tupker R.A., Pinnagoda J., Coenraads P.J., Nater J.P. The influence of repeated exposure to surfactants on the human skin as determined by transepidermal water loss and visual scoring. *Contact Dermatitis*. 1989, 20, 108-114.
216. Parente M.E., Gambaro A., Solana G. Study of sensory properties of emollients used in cosmetics and their correlation with physicochemical properties. *J. Cosmet. Sci.* 2005, 56, 175-182.
217. Goldember R.L., De la Rosa C. Correlation of skin feel of emollients to their chemical structure. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1999, 22, 635-654.
218. Kamershwari V., Mistery N. Propriedades sensoriais dos emolientes. *Cosmet. Toiletr.* 2001, 13, 52-57.
219. Feliczka-Guzik A., Bazarnik K., Nowak I. Analiza sensoryczna i ocena organoleptyczna substancji zapachowych w kosmetykach. *Dermatol Estet.* 2014, 1, 23-27.
220. Alikhan A., Maibach H.I. 40 Biology of stratum corneum: Tape Stripping and protein quantification. Berlin. 2010.
221. Lademann L., Jacobi U., Surber C., Weigmann H.J., Fluhr J.W. The tape stripping procedure - evaluation of some critical parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009, 72, 317-323.
222. Incecayir T., Agabeyoglu I., Deriki U., Sindel S. Assessment of topical bioequivalence using dermal microdialysis and Tape Stripping methods. *Pharmaceutical Research*. 2011.
223. Reed J. T., Ghadially R., Elias P.M. Skin type, but neither race nor gender influence epidermal permeability barrier function. *Archives of Dermatology*. 1993, 131, 1134-1138.
224. Westman M.A., Badet T., Marinville E., Cattley K., Lafon-Kolb V., Darbon J., Mava A., Laloëuf A. In vivo cosmetic product efficacy testing by analyzing epidermal proteins extracted from tape strips. *Cosmetics*. 2014, 1, 29-36.
225. Thiele J.J., Hsieh S.N., Briviba K., Sies H. Protein oxidation in human stratum corneum: Susceptibility of keratins to oxidation in vitro and presence of a keratin oxidation gradient in vivo. *J. Invest Dermatol.* 1999, 113, 335-339.
226. Van der Molen R.G., Spies F., van't Noordende J.M., Boelsma E., Mommaas A.M., Koerten H.K. Tape stripping of human stratum corneum yields cell layers that originate from various depths because of furrows in the. *Arch. Dermatol. Res.* 1997, 289, 514-518.
227. Escobar-Chavez J.J., Marino-Sanjuan V., Lopez-Cervantes M., Urban-Morlan Z., Pinon-Segundo E., Quintanar-Querrero D., Ganem-Quintanar A. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2008, 11, 104-130.
228. Wagner S., Merfort I. Skin penetration behavior of sesquiterpene lactones from different Arnica preparations using a validated GC-MSD method. *J. Pharm Biomed Anal.* 2006, 4, 32-8.
229. Frasnó-Contreras M.J., Jiménez-Soriano M.M., Ramírez-Díezguéz A. In vitro percutaneous absorption of all- trans retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposome's. *Int. J. Pharm.* 2005, 297, 134-145.

230. Bashir S.J., Dreher F., Chew A.L., Zhai H., Levina C., Stern R., Maibach H.I. Coetaneous bioassay of salicylic acids as a keratoltic. *Int. J. Pharm.* 2005, 292, 187-194.
231. De Jongh C.M., Jakasa I. Verber M.M., Kezic S. Variation in barrier impairment and inflammation of human skin as determined by sodium lauryl sulphate penetration rate. *Br. J. Dermatol.* 2006, 154, 651-657.
232. Tsai J.C., Weiner N.D., Flynn G.L., Ferry J. Properties of adhesive tapes used for stratum corneum stripping. *Int. J. Pharmaceut.* 1991, 72, 227-231.
233. Pardeike J. Coenzyme Q10 loaded NLC: in vitro release and in vivo skin penetration. AAPS Annual Meeting & Exposition. San Diego. 2007.
234. Stauber J.L., Andrade S., Ramirez M., Adams M., Correa J.A. Copper bioavailability in a coastal environment of Northern Chile: Comparison of bioassay and analytical speciation approaches. *Marine Pollution Bulletin.* 2005, 50, 1363-1372.
235. Weigmann H.J., Lademan J., Meffert H., Schaefer H., Sterry W. Determination of the horn layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 1999, 12, 34-35.
236. Curt R. Evaluation of emulsion stability. Principle, applications, Advantages and Drawbacks. *Sciences des Aliments* 1994, 6, 699-724.
237. Lindgren A., Sjostrom M., Wold S. Quantitative-structure-effect relationship for some technical nonionic surfactants. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1996, 73, 863–875.
238. Dayan N., Apply Topically: A practical guide to formulating topical application. Hardcover. 2014.
239. Arct J., Pytkowska K. Emulsje kosmetyczne. *Wiadomości PTK.* 2000.
240. Morrison I. Emulsion technology dispersions in liquids: suspensions, emulsions, and foams. ACS National Meeting. New Orleans. 2008.
241. Mengual O., Meunier G., Cayre I., Puech K., Snabre P. Turbiscan MA 2000 multipleligot scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta* 1999, 50, 445-456.
242. Álvarez Cerimedo M.S., Huck Iriart C., Candal R.J., Herrera M.L. Stability of emulsions formulated with high concentrations of sodium casein ate and trehalose. *Food Res. Int.* 2010, 43, 1482-1493.
243. Chauvierre C., Labarre D., Couvreur P., Vauthier C. A new approach for the characterization of insoluble amphiphilic copolymers based on their emulsinifying properties. *Colloid Polymer Sci.* 2004, 282, 1097-1104.
244. Palazolo G., Sorgentini D.A., Wagner, J. R. Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. *Food Hydrocolloids.* 2005, 19, 595-604.
245. Celia C., Trapasso E., Cosco D., Paolino D., Fresta M. Turbiscan lab expert analysis of the stability of ethosomes and ultra deformable liposome's containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2009, 1, 155-60.
246. www.labor.ps.pl, data dostępu 12.01.2015.
247. Malinka M. Zarys chemii kosmetycznej. Volumed. Wrocław. 1999.

248. www.park-odkrywcow.com.pl/albert-einstein/ruchy-browna/, data dostępu, 10.01.2013.
249. Marzec A. Chemia kosmetyków. Dom Organizatora. Toruń. 2005.
250. Tadros F.T. Colloids in Cosmetics and Personal Care. Colloids and Interface Science Series. Wiley-VCH Verlag. Weinheim. 2008.
251. Guidelines on stability testing of cosmetic products CTFA (Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association), COLIPA (European cosmetic toiletry and perfumery association. 2004.
252. Minor P.E. Stability Testing of Cosmetic Products. Cosmetic Regulation in a Competitive Environment, CRC Press. 2000.
253. Bronaugh R.L., Stewart R., Simon M. Methods for in vitro percutaneous absorption studies VII: use of excised human skin. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2006, 75, 1094-1097.
254. Główniczek-Zubek J. Chemia i biochemia dla kosmetologów. WSZKiPZ. 2010.
255. Grissom R.E. Prediction of percutaneous penetration - methods, measurements modeling. IBC Technical Services. London. 2000.
256. Jaroszewska B. Kosmetologia. Wydawnictwo Atena. 2008.
257. Alpert A., Milady's Standard Cosmetology. Milady Publishing. 2007.
258. Starzyk E., Zachwieja P. Ustawodawstwo kosmetyczne w Polsce i Unii Europejskiej. Polska. 2010.
259. Schaefer H., Redelmeier T.E. Skin barrier. Principles of percutaneous absorption/penetration. Karger. 2010.
260. Scott R.C., Ramsey J.D. Comparison of the in vivo and in vitro percutaneous absorption of a lipophilic molecule (Cypermethrin, a Pyrethroid Insecticide), Journal of Investigative Dermatology. 2007.
261. Scott R.C. Biological monitoring for pesticide exposure: measurement, estimation and risk reduction. In ACS Symposium Series 382. Franklin. 2009.
262. Shein-Chung C., Jen- Pei L. Design and analysis of clinical trials: concepts and methodologies. John Wiley & Sons. 2008.
263. Spengler, Steiling W. Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. Food Chem. 2009, 37, 191-193.
264. Szczepaniak W. Metody instrumentalne w analizie chemicznej. PWN. Warszawa. 1996.
265. Minczewski J., Marczewski Z. Chemia analityczna. tom III, PWN. Warszawa. 1986.
266. Ewing G.W. Metody instrumentalne w analizie chemicznej. PWN. Warszawa. 1980.
267. Witkiewicz Z. Podstawy chromatografii. WNT. Warszawa. 2005.
268. Speek A.J., Temalilwa C.R., Schrijver J. Determination of β -carotene content and vitamin A activity of vegetables by high-performance liquid chromatography and spectrophotometry. Food Chem. 1986, 19, 65-74.
269. Bushway R.J., Wilson A.M. Determination of α - and β -carotene in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 1982, 15, 165-169.

270. Quackenbush, F. W. Reverse phase HPLC separation of cis- and trans-carotenoids and its application to beta-carotenes in food materials. *J. Liq. Chrom.* 1987, 10, 643-653.
271. Thompson J.N, Hatina G, Maxwell W.B. High performance liquid chromatographic determination of vitamin A in margarine, milk, partially skimmed milk, and skimmed milk. *J. Assoc Off Anal Chem.* 1980, 63, 894-898.
272. Melendez-Martinez A.J, Vicario I.M, Heredia F. J. Analysis of carotenoids in orange juice. *J. Food Comp. Anal.* 2007, 5, 638-649.
273. Bushway R.J. Separation of carotenoids in fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. *J. Lig. Chromatography.* 1985, 8, 1527-1547.
274. Fischer C., Kocis J.A. Separation of paprika pigments by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 1987, 35, 55-57.
275. Mcfeeters R.F., Barish A.O. Sulfite analysis of fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet spectrophotometric detection. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1513-7.151.
276. Van Amerongen I.A., de Ronde H.A.G., Kooster N.T.M. Physical-chemical characterization of semi solid topical dosage from using a new dissolution system. *Int. Pharm.* 1992, 86, 9-15.
277. Olejnik A., Gościańska J., Nowak I. Uwalnianie substancji aktywnych z preparatów dermatologicznych. *Pol. J. Cosmet.* 2011, 14, 224-232.
278. Zatz J.L. Drugrelease from semisolids: Effect of membrane permeability on sensitivity to product parameters. *Pharm. Res.* 1995, 12, 787-789.
279. Zatz J.L., Segers J.D. Techniques for measuring in vitro release from semisolids. *Dissolution Technology.* 1998.
280. Pluta J., Lepka M., Michalska E. Wpływ temperatury na parametry reologiczne i dostępność farmaceutyczną diklofenaku sodu z preparatów hydrożelowych, sporządzonych na bazie karbopolu do stosowania na skórę. *Katedra Technologii Postaci Leku Akademii Medycznej. Wrocław.* 1990.
281. Gościańska J., Olejnik A., Sobieszczuk E., Latanowicz K., Nowak I. Significance of UV-Vis spectroscopy in in vitro release studies. *Chemik.* 2011, 7, 652-654.
282. Liebenberg W., Engelbrecht E., Wessels A., Devarokonda B., Yang W., De Villiers M.M. A Comparative study of the release of active ingredients from semisolid cosmetics measured with Franz, Enhancer or Flow-Through cell diffusion apparatus. *J. Food Drug. Anal.* 2004, 1, 19-28
283. Zillich O.V., Schweiggert-Weisz U., Hasenkopf K., Eisner P., Kerscher M. Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. *Int. J. Cosmetic. Sci.* 2013, 35, 491-501.
284. Baby A.R., Haroutiounian-Filho C.A., Sarruf F.D., Pinto C.A., Kaneko T.M., Velasco M.V. Influence of urea, isopropanol, and propyleneglycol on rutin in vitro release from cosmetics semisolid system sestimated by factorial design. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2009, 35, 272-82.
285. Gabbanini S., Matera R., Beltramini C., Minghetti A., Valgimigli L. Analysis of in vitro release through reconstructed human epidermis and synthetic membranes of

- multi-vitamins from cosmetic formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 4, 461-467.
286. Thakker K.D., Chern W.H. Development and validation of in vitro release tests for semisolid dosage forms - case study. *Dissolution Technologies*. 2003.
 287. Suksawad N., Sangkro S., Bonme B. Kinetics of in vitro release of nicotinamide from non-ionic micro emulsions. *International Conference Thailand*. 2010.
 288. Mahdi E.S., Noor A.M., Sakeena M.H., Abdullah G.Z., Abdulkarim M.F., Sattar M.A. Formulation and in vitro release evaluation of newly synthesized palm kernel oil esters - based nanoemulsion delivery system for 30% ethanolic dried extract derived from local *Phyllanthus Urinaria* for skin anti-aging. *International Journal of Nanomedicine*. 2011, 6, 2499-2512.
 289. Modi P.G. Development of in vitro release test for capsaicin topical gel formulations by Rusing Franz diffusion cell. *IJPBS*. 2014, 5, 285-293.
 290. Higuach T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointment. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1960, 11, 85-89.
 291. Montenegro L., Paolino D., Puglisi G. Effects of silicone emulsifiers on in vitro skin permeation of sunscreens from cosmetic emulsions. *J. Cosmet. Sci.* 2004, 55, 509-518.
 292. Numanoglu U., Sen T., Tarimci N., Kartal M., Koo O.M.Y., Önyüksel H. Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance materials: linalool and benzyl acetate. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2007, 8, 1-9.
 293. Kołodziej J., Berner-Strzelczyk A., Piechota-Urbańska M. Zastosowanie ekstraktu z tymianku w recepturze hydrożeli stomatologicznych wytworzonych na bazie carbopoli. *Katedra Farmacji Stosowanej Uniwersytet Medyczny. Łódź*.
 294. Piechota-Urbańska M. Wpływ suchych, standaryzowanych wyciągów roślinnych na proces uwalniania arbutyny z preparatów aplikowanych na skórę, wytworzonych na bazie Carbopoli. *Polimery w Medycynie*. 2010, 1, 65-71.
 295. Instrukcja obsługi Rheotestu 2. Charakterystyka pomiarowa wiskozymetru rotacyjnego.
 296. Norma BN-77/6140-01 Emulsje kosmetyczne. Metody badań. Oznaczanie pH w emulsjach kosmetycznych.
 297. Hecht E. Optics. Wydawnictwo Naukowe PWN. 2012.
 298. PN-EN 12823-2 (Artykuły żywnościowe. Oznaczanie zawartości witaminy A metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej).
 299. PN-90 A-75101/12 (Przetwory owocowe i warzywne. Przygotowanie próbek i metody badań fizykochemicznych. Oznaczanie zawartości sumy karotenoidów i β -karotenu).
 300. Domaradzki P., Malik A., Wójcik W. Zawartość β -karotenu i witaminy C w wybranych produktach z marchwi. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2010, 2, 118-123.
 301. Ali I., Aboul-Enein H.A. Instrumental Methods in Metal Ion Speciation. CRC Press. 2006.
 302. Shahidi F. Natural Antioxidants. Chemistry. Health Effects and Applications, In: Application FTIR-IR Differential Spectroscopy of Monitoring Oil Oxidation and Antioxidant Efficacy. AOCS Press. 1997

303. Baranowska M., Shutze W., Schulz H. Determination of Lycopene and β -Carotene content in Tomato Fruits and Related Products: Comparison of Ft-Raman, ATR-IR, and NIR Spectroscopy. *Anal. Chem.* 2006, 78, 8456-8461.
304. Brand-Williams J.W., Cuvelier M.E., Berset C. *Food Sci. Technol.* 1995, 1, 25-30.
305. www.formulaction.com, data dostępu 16.10.2014.
306. Instrukcja Obsługi Analizatora Wielkości Cząstek Malvern Mastersizer.
307. Kowas K. Rozpraszanie światła na pojedynczej cząstce. *Badania erozolu miejskiego.* WUW. 2007.
308. Bazela K. *Badania in vitro i in vivo we współczesnej dermatologii.* Centrum Naukowo-Badawcze Dr Irena Eris. 2005.
309. Chomiczewska D, Kieć-Świerczyńska M, Kręcis B. Kontaktowe zapalenie skóry z podrażnienia część II. Metody badania działania drażniącego substancji aktywnych. *Med. Pracy.* 2009, 3, 209-214.
310. Basketter D., York M. McFadden J., Robinson M. Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact. Dermatitis.* 2004, 51, 1-4.
311. Kvang H.L. Tissue-engineered human living skin substitutes: development and clinical application. *Yonsei Med. J.* 2000, 41, 774-779.
312. Westwood M., Joore M., Whiting P., van Asselt T., Ramaekers B., Armstrong N., Misso K., Severens J. Kleijnen J. Health technology assessment. NHS. UK. 2014.
313. Instrukcja obsługi. Chemotechnique Diagnostics: IQ Ultra.
314. Norma BN-64/6140-02- Kontrola jakości kremów.
315. Gawęcka J., Jędryka T. Analiza sensoryczna. Wybrane metody i przykłady zastosowań. Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu. 2001.
316. Gościańska J., Nowak I., Olejnik A. Uwalnianie substancji aktywnych z preparatów dermatologicznych. *Pol. J Cosmetol.* 2012, 4, 224-232.
317. Darleński R., Sassning S., Tsankov N., Fluhr J.W. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009, 72, 295-303.
318. Navidi W., Hutchinson A.N., Dri-Stempfer, B. Bunge A. Determining bioequivalence of topical dermatological drug products by tape - stripping. *J. Pharmacokinet. Biop.* 2008, 35, 337-348.
319. Anroop Nair, Shery Jacob, Bandar Al-Dhubiab, Mahesh Attimarad, Sree Harsha. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2013, 49, 423-434.
320. Surber C., Schwarb F., Smith E.W. Tape - stripping technique. *J. Toxicol-Cutan.* 2001, 20, 461-518.
321. Reddy M.B., Stinchcomb A.L., Guy, R.H., Bunge, A.L. Determining dermal absorption parameters in vivo from tape strip data. *Pharmaceut. Res.* 2001, 19, 292-298.
322. Kembłowski Z., Sęk J., Krynke K. Wpływ struktury emulsji na ich właściwości reologiczne. *Przem. Chem.* 2003, 9, 1206-1208.
323. Mason T.G. New fundamental concepts in emulsion rheology. *Colloid Interface Sci.* 1999, 4, 231-238.
324. Stein D.J., Spera F.J. Shear viscosity of rhyolite-vapor emulsions at magmatic

- temperatures by concentric cylinder reometry. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. 2002, 113, 243-258.
325. Vingerhoeds M.H., de Wijk R.A., Zoet F.D., Nixdorf R.R., van Aken G.A. How emulsion composition and structure affect sensory perception of low-viscosity model emulsions. *Food Hydrocolloid*. 2008, 22, 631-646.
 326. Gilewicz P., Tal-Figiel B., Figiel W., Kwiecień M. Nowoczesne rozwiązania w zakresie wytwarzania i kontroli jakości emulsji. *Technical Transaction*. 2012, 17, 25-40.
 327. Czikow P., Łaptiew J. Rośliny lecznicze i bogate w witaminy. PWRiL. Warszawa 1988.
 328. Ożarowski A., Jaroniewski W. Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie. IWZZ. Warszawa 1989.
 329. Johnson E.J., Qin J., Krinsky N.I., Russell R.M. Ingestion by men of a combined dose of beta-carotene and lycopene does not affect the absorption of beta-carotene but improves that of lycopene. *J.Nutr*. 1997, 127, 1833-1837.
 330. Shreoder G. Kosmetyki - chemia dla ciała. Cursive. Inowrocław. 2011.
 331. Mordt R.C. Mechanism of beta-carotene degradation. *Biochem. J*. 1993, 15, 310-312.
 332. Boon C.S., McClements D.J., Weiss J., Decker E.A. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2010, 50, 515-32.
 333. Lee M.T., Chen B.H. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chem*. 2002, 78, 425-433.
 334. Kopec R.E., Riedel K.M., Harrison E.H., Curley R.W.J., Hruszkewycz D.P., Clinton S.K., Schwartz S.J. Identification and quantification of apo-lycopenals in fruits, vegetables, and human plasma. *J. Agric. Food Chem*. 2010, 58, 3290-3296.
 335. Nardo T.D., Shiroma-Kian C., Halim Y., Francis D., Rodriguez Saona L.E. Rapid and simultaneous determination of lycopene and β -carotene contents in tomato juice by infrared spectroscopy. *J. Agr. Food Chem*. 2009, 57, 1105-1112.
 336. Coates J. Interpretation of infrared spectra: a practical approach. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley. UK. 2000.
 337. Gunzler H., Gremlich H.E. Qualitative spectra interpretation. In *IR Spectroscopy: An Introduction*. Wiley. Germany. 2002.
 338. Guillen M.D., Cabo N. Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. *J.Sci. Food Agric*. 1997, 75, 1-11.
 339. Juncan A.M., Fetea F., Socaciu C. Application of fourier transform infrared spectroscopy for the characterization of sustainable cosmetics and ingredients with antioxidant potential. *EEMJ*. 2014, 13, 105-113.
 340. Rohman A., Man Y.B.C. Analysis of lard in cream cosmetics formulations using FT-IR spectroscopy and chemometrics. *Middle East J. Sci. Res*. 2011, 7, 726-732.
 341. Elumalai S., Infant S.B., Kanna R.G. Extraction of carotenoid and thin layer chromatography (TLC), GC-MS, FT-IR and HPLC analysis of pharmaceutically important pigment astaxanthin from a new strain of *Haematococcus pluvalis*. *Weekly Science Research Journal*. 2014, 2, 1-14.
 342. Tasato M.G., Alves R.S., Edson A.P., Ranierp L., Menezes P.F.C, Belletti K.M.S., Praes C.E.O., Martin A.A. Raman spectroscopy investigation of the effects of cosmetic

- formulation on the constituents and properties of human skin. *Photomed. Laser Surgery*. 2012, 2, 85-91.
343. Bunghez I.R., Raduly M., Dincea S., Aksahin I., Ion R.M. Lycopene determination in tomatoes by different special Techniques (UV-Vis, FTIR and HPLC). *Dig. J. Nanomater. Bios.* 2011, 3, 1349-1356.
 344. Kamil Sierżant. Dodatki naturalnych ekstraktów polifenolowych do diety kurcząt rzeźnych i ich wpływ na stabilność oksydacyjną mięsa oraz wybrane parametry produkcyjne. Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu. Wrocław. 2013.
 345. Loft S., Møller P., Cooke M.S., Rozalski R., Olinski R. Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker? *Eur. J. Nutr.* 2008, 47, 19-28.
 346. Igielska-Kalwat., Gościańska J., Nowak I. Karotenoidy jako naturalne antyoksydanty. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2015, 69, 418-428.
 347. Zieliński H., Kozłowska H. Superoxide scavenging activity of cereal grains before and after hydrothermal processing. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2000, 9, 85-90.
 348. Gruczyńska E., Kowalski B., Kowalska M., Śmiechowski K. Charakterystyka wybranych majonezów oraz wpływ temperatury i czasu przechowywania na ich stabilność. *ŻNTJ*. 2006, 4, 154-166.
 349. Sachdeva S. Fitzpatrick skin typing: Application in dermatology. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2009, 75, 93-96.
 350. Ravnbank M.H. Objective determination of Fitzpatric skin type. *Dan. Med. Bull.* 2010, 57, 1-20.
 351. Herkenne C., Naiki A., Kalia Y.N., Hadgraft J., Guy R.H. Pig Ear Skin ex vivo a Model in vivo dermatopharmaco kinetic studies in man. *Pharm. Res.* 2006, 23, 1850-1856.
 352. Herkenne C., Alberti I., Naik A., Kalia Y.N. Mathy F.X. Preat V., Guy R.H. In vivo methods for the Assessment of topical drug bioavailability. *Pharm. Res.* 2008, 25, 87-103.
 353. Schneider M., Stracke F., Hansen S., Schaefer U.F. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermato. Endocrinol.* 2009, 1, 197-206.

X. ZAŁĄCZNIKI

Załącznik nr 1



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 835/13

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 szczególnych zasad powoływania i finansowania oraz trybu dziedzienia Komisji Bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 489); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 Nr 191, poz. 1934 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 191, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2006r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2006 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niepożądanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wyrobów medycznych przedłożonych w związku z badaniem klinicznym, wyroby i opłaty 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 (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 Nr 32 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, Nr 9 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 uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 6 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu **05 grudnia 2013 r.**

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu:

prof. dr hab. Izabela Nowak

Miejsce prowadzenia badań:

Wydział Chemii UAM w Poznaniu

Główny badacz: **mgr inż. Joanna Igielska-Kalwat**

Temat badań:

„Badanie in vitro oraz in vivo wpływu form kosmetycznych na biodostępność wybranych karotenoidów”.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji

prof. dr hab. med. Paweł Chęciński

Załącznik nr 2

Formularz świadomej zgody na udział w badaniu

Imię i nazwisko:.....

Data urodzenia:.....

PESEL:.....

Adres zamieszkania:.....

Numer telefonu:.....

Ja niżej podpisany/a oświadczam, że:

1. Przeczytałem/am i zrozumiałem/am wszelkie informacje dotyczące celu i zasad badania.
2. Otrzymałem/am zadowalającą odpowiedź na wszystkie zadane przeze mnie pytania.
3. Wyrażam dobrowolnie zgodę na udział w tym badaniu i jestem świadomy/a możliwości odstąpienia od udziału w badaniu na każdym etapie jego trwania, bez podania przyczyny.
4. Zgadzam się na udział w wyżej wymienionym badaniu i na wykonanie wymaganych w nim procedur.
5. Zostałem/am poinformowany/a o spodziewanych korzyściach i grożących mi ujemnych skutkach oraz prawdopodobieństwie ich powstania.
6. Zostałem/am poinformowany/a, że administratorem danych związanych z badaniem będzie placówka, w której prowadzony jest eksperyment. Przed podpisaniem dokumentu zostałem/am poinformowany/a o sposobie przetwarzania danych pochodzących z badania oraz że dane te, zbierane są wyłącznie w celach analizy naukowej.
7. Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych na potrzeby wyżej wymienionego badania, zgodnie z obowiązującym w Polsce prawem (*Ustawą z dnia 29.08.1997 o Ochronie Danych osobowych Dz. Ust. Nr 133 poz 83*).
8. Wyrażam zgodę na udział w tym badaniu.
9. Otrzymałem/am kopię niniejszego oświadczenia opatrzoną czytelnym podpisem i datą.

.....
(data i podpis)

Załącznik nr 3

Ochotnik:

.....
(czytelny podpis ochotnika)

.....
(data)

Osoba przyjmująca formularz zgody:

Ja niżej podpisany/a oświadczam, że zgodnie z moją wiedzą, badanie zostało w pełni i dokładnie omówione z ochotnikiem/czką podpisującym/ą niniejszy formularz zgody oraz że ochotnik/czka jest świadomy/a istoty badania, zagrożeń oraz korzyści związanych z udziałem w tym badaniu.

.....
(czytelny podpis badacza)

.....
(data)

Załącznik nr 4

Informacja dla Pacjenta o przebiegu testów płatkowych

Uwaga: Prosimy zapoznać się z poniższą informacją! Przestrzeganie opisanych procedur ma wpływ na wiarygodność uzyskanych wyników oraz komfort i bezpieczeństwo Pacjenta w czasie trwania testu.

Test płatkowy (ang. *patch test*) jest najbardziej uznaną metodą diagnostyki alergii kontaktowej (wyprysku kontaktowego i chorób pokrewnych). Test polega na nałożeniu na skórę (za pomocą specjalnych przylepców) niewielkich ilości substancji testowych (haptenu). Dawka jest ściśle określona, podobnie jak czas kontaktu ze skórą oraz czas kolejnych odczytów. Jeżeli badana osoba jest uczulona na konkretną substancję, to w miejscu jej podania pojawia się w określonym czasie reakcja skórna (zaczerwienienie, naciek, swędzenie). Na podstawie wyglądu tego odczynu, doświadczony lekarz może wnioskować o obecności uczulenia, jego nasileniu, a także o znaczeniu konkretnej substancji dla choroby pacjenta. Testy płatkowe wykonywane według zaleceń Europejskiego Towarzystwa Wyprysku Kontaktowego są uznawane za najważniejsze badanie w rozpoznawaniu alergii kontaktowej.

Informacje szczegółowe o testach płatkowych:

1. Test płatkowy typowo wymaga 4 wizyt w ciągu 5 dni, jednak w indywidualnych przypadkach niezbędne mogą się okazać dodatkowe wizyty – np. po 7 i 14 dniach. W typowym cyklu badania testy są zakładane na plecy w poniedziałek, w środę następuje ich zdjęcie i pierwszy odczyt, a ostateczne odczyty odbywają się w czwartek i piątek.
2. Pacjent przystępujący do badań powinien być w dobrym stanie zdrowia. Prosimy poinformować o przebytych ostatnio chorobach oraz przyjmowanych lekach.
3. Testów nie należy wykonywać u osób przeziębionych, gorączkujących, przyjmujących antybiotyki, leki przeciw alergii, białaczce, nowotworom, osób, które w ciągu ostatnich 4 tygodni intensywnie opalały się lub korzystały z solarium. Nie należy się szczepić bezpośrednio przed oraz w trakcie wykonywania testów.
4. Testów nie można wykonywać na skórze zmienionej chorobowo lub leczonej w ciągu ostatnich 4 tygodni maściami przeciwalergicznymi (sterydy).
5. Prosimy naszych Pacjentów, aby od pierwszego do ostatniego dnia badania nosili **odzież rozpinaną** z przodu. Nie są wskazane golfy, obcisłe podkoszulki itp., ponieważ podczas ściągania odzieży „przez głowę” może dojść do zerwania założonych testów. Ewentualnie dopuszczalny jest bardzo luźny podkoszulek bawełniany.
6. Niektóre z testowanych substancji mają intensywny kolor i mogą **zabarwić ubranie**. Dlatego odzież mająca bezpośredni kontakt ze skórą pleców (podkoszulek, koszula, bluzka) powinna być ciemnego koloru i nadawać się do prania w wysokiej temperaturze. Prosimy nie nosić w okresie badania ubrań delikatnych i kosztownych. Nie przyjmujemy odpowiedzialności za ewentualne przebarwienia odzieży.
7. Przez cały okres badania obowiązuje całkowity **zakaz moczenia pleców!** Obmywając inne okolice ciała należy bardzo uważać, by nie doszło do zalania zamontowanych plastrów.

8. **Nadmierne owłosienie** na plecach może uniemożliwić założenie testów, dlatego Pacjenci posiadający owłosienie na plecach proszeni są o dokładne ogolenie pleców na 1-2 dni przed rozpoczęciem badania.

9. Prosimy nie golić pleców tuż przed badaniem - podrażniona skóra może podczas testu reagować nietypowo!

10. W okresie badania **niewskazany** jest **intensywny wysiłek**, ponieważ zapocenie pleców może udaremnić badanie podobnie jak ich zamoczenie wodą. Przepocenia należy unikać również ze względów higienicznych, w związku z opisanym wcześniej ograniczeniem mycia pleców.

11. **W razie niejasności zapytaj osobę przeprowadzającą doświadczenie!**

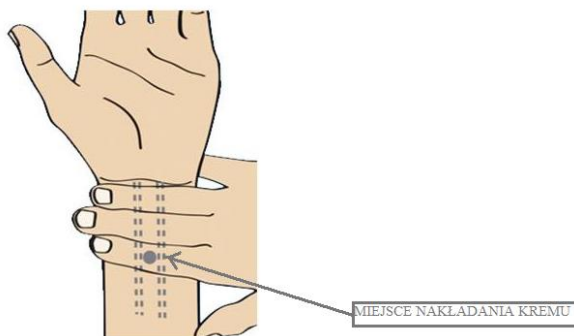
12. W razie nieprzewidzianych zdarzeń lub wątpliwości dzwoń:

nr tel. 501667270

Załącznik nr 5

Formularz informacji dla probanta

1. Celem badania jest sprawdzenie tolerancji skóry oraz skuteczność działania kosmetyku, którego kluczowymi składnikami są karotenoidy.
2. Przed rozpoczęciem testowania kosmetyku zostaną przeprowadzone testy płatkowe służące wyeliminowaniu alergii na substancje aktywne zawarte w emulsji kosmetycznej, pomiary przez naskórkowej utraty wody, elastyczności, napięcia oraz nawilżenia warstwy rogowej naskórka w celu określenia rodzaju skóry.
3. Otrzymany kosmetyk należy aplikować dwa razy dziennie, **rano i wieczorem** (w zbliżonych godzinach) na wewnętrznej stronie nadgarstka, ewentualnie w innej części przedramienia (po wewnętrznej stronie), ale **zawsze w tym samym miejscu**:



KREM 1 - lewa ręka, przedramię

KREM 2 - prawa ręka, przedramię

4. Czas trwania badań wynosi około 3 miesięcy, a pomiary będą przeprowadzane raz w tygodniu na Wydziale Chemii (adres: Uniwersytet imienia Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań).

Warunki stosowania kremów:

- W czasie stosowania kremów **nie należy** używać innych środków pielęgnacyjnych na skórę obydwu przedramion.
- Regularnie stosować badane preparaty w okresie 6 tygodni.
- Natychmiast przerwać stosowanie kremu w przypadku wystąpienia jakichkolwiek objawów podrażnienia lub alergii.
- Obserwować właściwości preparatów (działanie pielęgnacyjne, tolerancja, uczucie na skórze, nawilżenie, wygładzenie, rozprzeczalność, zdolność wchłaniania).

Ryzyko związane z poddaniem się eksperymentowi

Karotenoidy w dozwolonych dawkach nie wykazują niekorzystnego działania na organizm. Stwierdzone działania niepożądane: bóle brzucha, biegunka, przejściowe żółte zabarwienia skóry.

Przeciwwskazania

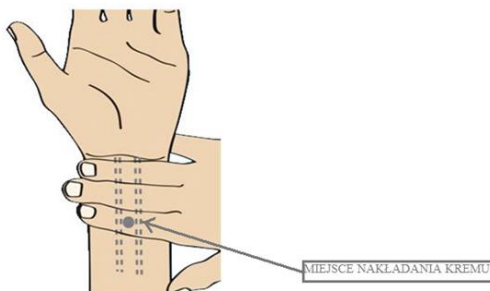
- nadwrażliwość na lek
- ciężka niewydolność wątroby i nerek
- kobiety w ciąży

Udział w badaniu jest dobrowolny. Istnieje możliwość odstąpienia od udziału w badaniu na każdym etapie jego trwania, bez podania przyczyny. Dane osobowe będą przetwarzane wyłącznie w celach analizy naukowej zgodnie z obowiązującym w Polsce prawem (*Ustawą z dnia 29.08.1997 o Ochronie Danych osobowych Dz. Ust. Nr 133 poz 83*).

Załącznik nr 6

Formularz informacji dla probanta

1. Celem badania jest sprawdzenie biodostępności (przenikalności) karotenoidu jakim jest beta-karoten w limitującej przenikanie warstwie naskórka, *stratum corneum*.
2. Przed rozpoczęciem testowania kosmetyku zostaną przeprowadzone testy strippingu oraz pomiary TEWL-u, aby określić stan skóry probanta.
3. Otrzymany kosmetyk należy aplikować dwa razy dziennie, **rano i wieczorem** na wewnętrznej stronie nadgarstka, ewentualnie w innej części przedramienia (po wewnętrznej stronie), ale **zawsze w tym samym miejscu!**



4. Czas trwania badań wynosi około 5 tygodni, a pomiary będą przeprowadzane raz w tygodniu na Wydziale Chemii (adres: Uniwersytet imienia Adama Mickiewicza, ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań).

Warunki stosowania kremów:

- W czasie stosowania kremu **nie należy** używać innych środków pielęgnacyjnych na badanym fragmencie skóry.
- Regularnie stosować badane preparaty w okresie 4 tygodni.
- Natychmiast przerwać stosowanie kremu w przypadku wystąpienia jakichkolwiek objawów podrażnienia, alergii lub widocznych przebarwień.
- Obserwować właściwości preparatów (działanie pielęgnacyjne, tolerancja, uczucie na skórze, nawilżenie, wygładzenie, rozsmarowywalność, zdolność wchłaniania).

Ryzyko związane z poddaniem się eksperymentowi:

Karotenoidy w dozwolonych dawkach nie wykazują niekorzystnego działania na organizm. Stwierdzone działania niepożądane: bóle brzucha, biegunka, przejściowe żółte zabarwienia skóry.

Przeciwwskazania: nadwrażliwość na lek, ciężka niewydolność wątroby i nerek, kobiety w ciąży.

Udział w badaniu jest dobrowolny. Istnieje możliwość odstąpienia od udziału w badaniu na każdym etapie jego trwania, bez podania przyczyny.

Dane osobowe będą przetwarzane wyłącznie w celach analizy naukowej zgodnie z obowiązującym w Polsce prawem (Ustawą z dnia 29.08.1997 o Ochronie Danych osobowych Dz. Ust. Nr 133 poz 83).

Załącznik nr 7

ANKIETA

NUMER PROBANTA.....

1. PŁEĆ

- ☐ ☐ kobieta
☐ ☐ mężczyzna

2. WIEK

- ☐ ☐ 18-25
☐ ☐ 26-35
☐ ☐ 36-45
☐ ☐ 46-55
☐ ☐ 56-65

3. TYP SKÓRY WEDŁUG KLASYFIKACJI FITZPATRICKA

- ☐ ☐ I (błada, biała skóra, łatwo ulegająca poparzeniom, nigdy nie opalająca się)
☐ ☐ II (biała skóra, łatwo ulegająca poparzeniom, minimalnie i trudno opalająca się)
☐ ☐ III (ciemniejsza biała skóra, umiarkowanie opalająca się, po początkowym poparzeniu)
☐ ☐ IV (jasna, brązowa skóra, ulegająca minimalnym poparzeniom, łatwo opalająca się)
☐ ☐ V (brązowa skóra, rzadko ulegająca poparzeniom, łatwo i mocno opalająca się)
☐ ☐ VI (ciemnobrązowa/czarna skóra, nie ulegająca poparzeniom, mocno opalająca się).

4. OKOLICA CIAŁA DOTKNIĘTA NAJWIĘKSZYM PRZESUSZENIEM

- ☐ ☐ twarz
 o czoło
 o nos
 o policzek lewy
 o policzek prawy
 o górna warga
 o broda
☐ ☐ szyja
 o
☐ ☐ dekol
 o
☐ ☐ plecy
 o

- ☐ ☐ kończyna górna
 - o
- ☐ ☐ kończyna dolna
 - o
- ☐ ☐ inna, jaka
 - o

5. PRZYCZYNA PRZESUSZENIA SKÓRY

- ☐ ☐ wrodzona
- ☐ ☐ nabyta
 - o promieniowanie UV
 - o lecznicze
 - o kosmetyczne
 - o zmiany hormonalne (ciąża, menopauza, preparaty antykoncepcyjne)
 - o inne zaburzenia endokrynologiczne
 - o leki
 - o zmiany zapalne skóry
 - o urazy mechaniczne
 - o inne, jakie
- ☐ ☐ nie pamiętam

6. CZAS TRWANIA PRZESUSZENIA SKÓRY

- ☐ ☐ od urodzenia
- ☐ ☐ od miesiąca
- ☐ ☐ od 2 miesięcy
- ☐ ☐ od 6 miesięcy
- ☐ ☐ od roku
- ☐ ☐ odlat
- ☐ ☐ odroku życia

7. CZY ULEGL PAN/PANI POPARZENIU SŁONECZNEMU?

- ☐ ☐ tak
- ☐ ☐ nie

8. CZY STOSUJE PAN/PANI OCHRONĘ PRZECIWSŁONECZNĄ?

- ☐ ☐ tak
- ☐ ☐ nie

9. JAK CZĘSTO PAN/PANI JĄ STOSUJE?

- ☐ ☐ codziennie
- ☐ ☐ wyłącznie podczas opalania
- ☐ ☐ rzadko
- ☐ ☐ w ogóle

10. W JAKI SPOSÓB PAN/PANI RADZI SOBIE Z PROBLEMEM PRZESUSZONEJ SKÓRY?

- ☐ ☐ nic z tym nie robię
- ☐ ☐ konsultacje z kosmetologiem
- ☐ ☐ konsultacje z dermatologiem
- ☐ ☐ inne, jakie.....

11. CZY KORZYSTA PAN/PANI Z ZABIEGÓW NAWILŻAJĄCYCH/NATŁUSZCZAJĄCYCH/UELASTYCZNIAJĄCYCH SKÓRĘ?

- ☐ ☐ tak
- ☐ ☐ nie

12. JAKIE ZABIEGI WYKONYWANE BYŁY W TYM CELU?

- ☐ ☐ peeling owocowy (chemiczny)
- ☐ ☐ maski nawilżające/natłuszczające/uelastyczniające
- ☐ ☐ sonoforeza
- ☐ ☐ oksybrazia
- ☐ ☐ kawitacja
- ☐ ☐ mezoterapia igłowa
- ☐ ☐ mezoterapia bezigłowa
- ☐ ☐ inne, jakie.....
- ☐ ☐ żadne

13. CZY STOSUJE PAN/PANI KOSMETYKI LUB SUPLEMENTY DIETY Z β -KAROTENEM?

- ☐ ☐ tak
- ☐ ☐ nie

14. JAK CZĘSTO PAN/PANI JE STOSUJE?

- ☐ ☐ 2 razy dziennie
- ☐ ☐ raz dziennie
- ☐ ☐ kilka razy w tygodniu

- ☐ ☐ raz w tygodniu
- ☐ ☐ rzadziej

☐ ☐ nie stosuję

15. CZY TERAPIA PRZYNOSI POŻĄDANY EFEKT?

- ☐ ☐ tak
- ☐ ☐ nie
- ☐ ☐ nie dotyczy

16. PO JAKIM CZASIE BYŁY ZAUWAŻALNE EFEKTY TERAPII?

- ☐ ☐ po 2 tygodniach stosowania
- ☐ ☐ po miesiącu stosowania
- ☐ ☐ po kilku miesiącach stosowania, ilu ?
- ☐ ☐ nie było zauważalnych efektów
- ☐ ☐ nie dotyczy

17. CZY W TRAKCIE BADANIA STOSOWAŁ/A PAN/PANI ZALECANY KREM Z β -KAROTENEM?

- ☐ ☐ tak
- ☐ ☐ nie

18. CZY W TRAKCIE EKSPERYMENTU EKSPONOWAŁ/A PAN/I BADANĄ OKOLICĘ CIAŁA NA PROMIENIOWANIE SŁONECZNE?

- ☐ ☐ tak
- ☐ ☐ nie

19. CZY ULEGŁ/A PAN/PANI POPARZENIU SŁONECZNEMU W TRAKCIE TRWANIA BADANIA?

- ☐ ☐ tak
- ☐ ☐ nie

20. W JAKIEJ STREFIE KLIMATYCZNEJ PAN/I PRZEBYWAŁA?

- ☐ ☐ strefa umiarkowana chłodna
- ☐ ☐ strefa umiarkowana ciepła

☐ ☐ strefa podzwrotnikowa

☐ ☐ strefa zwrotnikowa

21. CZY KORZYSTAŁ/A PAN/PANI Z INNYCH ZABIEGÓW NAWILŻAJĄCYCH/NATŁUSZCZAJĄCYCH/UELASTYCZNIAJĄCYCH SKÓRĘ W TRAKCIE BADANIA?

☐ ☐ tak

☐ ☐ nie

22. CZY STOSOWAŁ/A PAN/PANI INNE KOSMETYKI LUB LEKI NAWILŻAJĄCE SKÓRĘ W TRAKCIE BADANIA?

☐ ☐ tak, jakie.....

☐ ☐ nie

23. CZY UDZIAŁ W BADANIU PRZYNIÓSŁ OCZEKIWANE REZULTATY?

☐ ☐ tak

☐ ☐ nie

24. EFEKT NAWILŻENIA SKÓRY PO APLIKACJI KREMU Z LEWEGO PRZEDRAMIENIA (SKALA NUMERYCZNA):

☐ ☐ 0 - pogorszenie

☐ ☐ 1 - brak poprawy

☐ ☐ 2 - minimalna poprawa

☐ ☐ 3 - zdecydowana poprawa .

25. EFEKT NATŁUSZCZENIA SKÓRY PO APLIKACJI KREMU Z LEWEGO PRZEDRAMIENIA (SKALA NUMERYCZNA):

☐ ☐ 0 - pogorszenie

☐ ☐ 1 - brak poprawy

☐ ☐ 2 - minimalna poprawa

☐ ☐ 3 - zdecydowana poprawa

26. EFEKT UELASTYCZNIENIA SKÓRY PO APLIKACJI KREMU Z LEWEGO PRZEDRAMIENIA (SKALA NUMERYCZNA):

☐ ☐ 0 - pogorszenie

☐ ☐ 1 - brak poprawy

☐ ☐ 2 - minimalna poprawa

☐ ☐ 3 - zdecydowana poprawa

27. EFEKT NAWILŻENIA SKÓRY PO APLIKACJI KREMU Z PRAWEGO PRZEDRAMIENIA (SKALA NUMERYCZNA):

☐ ☐ 0 - pogorszenie

☐ ☐ 1 - brak poprawy

☐ ☐ 2 - minimalna poprawa

☐ ☐ 3 - zdecydowana poprawa .

28. EFEKT NATŁUSZCZENIA SKÓRY PO APLIKACJI KREMU Z PRAWEGO PRZEDRAMIENIA (SKALA NUMERYCZNA):

☐ ☐ 0 - pogorszenie

☐ ☐ 1 - brak poprawy

☐ ☐ 2 - minimalna poprawa

☐ ☐ 3 - zdecydowana poprawa

29. EFEKT UELASTYCZNIENIA SKÓRY PO APLIKACJI KREMU Z PRAWEGO PRZEDRAMIENIA (SKALA NUMERYCZNA):

☐ ☐ 0 - pogorszenie

☐ ☐ 1 - brak poprawy

☐ ☐ 2 - minimalna poprawa

☐ ☐ 3 - zdecydowana poprawa

30. PO JAKIM CZASIE ZAUWAŻALNE BYŁY EFEKTY APLIKACJI KREMU?

☐ ☐ po 2 tygodniach stosowania

☐ ☐ po 4 tygodniach stosowania

☐ ☐ po 6 tygodniach stosowania

31. CZY PODCZAS APLIKACJI KREMU Z β -KAROTENEM POJAWIŁY SIĘ PODRAŻNIENIA SKÓRY TYPU:

☐ ☐ rumień

o tak

o nie

☐ ☐ obrzęk

o tak

o nie

☐ ☐ wysypka

o tak

o nie

SUBIEKTYWNA OCENA TESTOWANEGO KOSMETYKU

W skali od 1-5:

5 - bardzo dobrze, 4 - dobrze, 3 - przeciętnie, 2 - niezadowalająco, 1 - źle

Parametry/ocena	1	2	3	4	5
Nawilżenie					
Zdolność do wchłaniania					
Uczucie na skórze					
Działanie pielęgnacyjne					
Wyglądzenie					
Rozsmarowywalność					
Tolerancja (działanie uczulające)					

WYNIKI OCENY DLA ANALIZY SENSORYCZNEJ - JAKOŚCIOWEJ

W skali od 1-5:

5 - bardzo dobrze, 4 - dobrze, 3 - przeciętnie, 2 - niezadowalająco, 1 - źle

Cecha/parametr	1	2	3	4	5
Jednolitość					
Konsystencja					
Wchłanianie					
Rozprowadzenie					
Kleistość					
Natluszczenie					
Przyczepność					
Wyglądanie					

XI. SPIS PUBLIKACJI I KOMUNIKATÓW

PUBLIKACJE

1. Z listy Ministerialnej części A:

- **Igielska-Kalwat J.**, Gościańska J., Nowak I. Karotenoidy jako naturalne antyoksydanty. *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej*. 2015, 69, 418-428.
- **Igielska-Kalwat J.**, Gościańska J., Witkowska B., Nowak I. In vivo studies of substances used in cosmetic industry. *Advances in Dermatology and Allergology* - w druku.
- Kapuścińska A., **Igielska-Kalwat J.**, Gościańska J. Nowak I. Zastosowanie fitoestrogenów w kosmetykach przeciw starzeniu się skóry. *Przemysł Chemiczny* 2015, 94, 566-570.
- **Igielska-Kalwat J.**, Gościańska J., Nowak I. Zastosowanie likopenu w dermokosmetykach. *Przemysł Chemiczny* 2014, 93, 1110-1113.

2. Z listy Ministerialnej części B:

- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Uwalnianie substancji aktywnych uwalnianych z emulsji kosmetycznych/ The release of active substances released from cosmetic emulsions. *Chemik*. 2015, 69, 498-504.
- **Igielska-Kalwat J.**, Gościańska J., Nowak I. Astaksantyna w preparatach kosmetycznych. *Dermatologia Estetyczna*. 2013, 2, 83-85.
- **Igielska-Kalwat J.**, Wawrzyńczak A., Nowak I. Karotenoidy i ich zastosowanie w przemyśle kosmetycznym na przykładzie β - karotenu. *Chemik* 2012, 8, 140-144.

3. Rozdziały w monografiach:

- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Przegląd karotenoidów, Nowe trendy w naukach przyrodniczych 3. Wydawnictwo CREATIVETIME TOM V, 90. Rozdział w monografii. Kraków. 2012.

4. Inne:

- **Igielska-Kalwat J.**, Gościańska J., Witkowska B., Nowak I. Badanie in vivo substancji stosowanych w przemyśle kosmetyczny. *Świat Przemysłu Kosmetycznego*. 2015, 1, 56-61.
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Astaxanthin - the strongest natural antioxidant. Monograph 4TH Eueopean Young Engineers Conference. 2015, 7, 264-271.
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Stabilność emulsji kosmetycznych zawierających wybrane substancje aktywne. Materiał zjazdowy PTChem 57. Zjazd PTChem i SITPChem. 2014.

- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Zastosowanie nowej techniki analitycznej wykorzystującej zjawisko wielokrotności rozproszenia światła do badania stabilności emulsji kosmetycznych. Wydawnictwo CreativeTime. Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauk. ISBN 978-83-63058-38-8. 2014.
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Innovative Use of carbon nanotubes in medicine, Materiały konferencyjne. 4th Summer Symposium on Nanomaterials and their Application to Biology and Medicine. 2014.
- **Igielska-Kalwat J.**, Kapuścińska A., Nowak I. Use of silica in the cosmetics industry. Materiały konferencyjne. Balt Silica. ISBN: 978-83-62783-01-4. 2014.
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Zastosowanie kantaksantyny w przemyśle kosmetycznym. Wydawnictwo CreativeTime Dokonania Młodych Naukowców. ISSN: 2300-4436. 2014.
- **Igielska-Kalwat J.**, Kapuścińska A., Nowak I. Application of nanotubes in medicine, Book of Abstracts. Carbon Materials in Science and Technology, The 9th Torunian Carbon Symposium. Toruń 2014. ISBN 978-83-231-3281-3.
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Opracowanie metodyki oznaczania zawartości karotenoidów oraz stopnia ich uwalniania z formułacji kosmetycznych. Materiały konferencyjne 57 Zjazdu PTCH. ISBN 978-83-981072-6-1. 2014.
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Oznaczanie właściwości antyoksydacyjnych w kremach komercyjnych zawierających β -karoten. Materiały konferencyjne konferencji Oxygenalia. ISBN 978-83-7597-7. 2014.
- Kapuścińska A., **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Badanie właściwości fizykochemicznych emulsji kosmetycznych. Materiały pokonferencyjne 57 Zjazdu PTCH. ISBN 978-83-981072-6-1. 2014.
- Kapuścińska A., **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Mocznik jako substancja aktywna preparatów kosmetycznych. Materiały pokonferencyjne 57 Zjazdu PTCH. ISBN 978-83-981072-6-1. 2014.
- **Igielska-Kalwat J.** Kosmetyczne zastosowanie karotenoidów, www.kosmetologia.com. 2013.
- **Igielska-Kalwat J.** Cudowne rośliny zawierające karotenoidy, www.kosmetologia.com. 2013.
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Kosmetyczne zastosowanie karotenoidów, Młodzi naukowcy dla polskiej nauki Część 8 - Nauki przyrodnicze. Wydawnictwo CreativeTime , TOM III, 103. Kraków. 2012
- **Igielska-Kalwat J.**, Gościańska J. Nowak I. Antyoksydacyjne właściwości karotenoidów. Kosmetologia i Kosmetyka. 2013, 96, 3-4.

KOMUNIKATY

- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki - (poster). Badanie wpływu form kosmetycznych na biodostępność wybranych karotenoidów, (Poznań, 12.12.2015).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Współczesna zapatrywania na zdrowie, urodę i edukację w cyklu nowoczesne trendy w kosmetologii i dietetyce, Wyższa Szkoła Zdrowia, Urody i Edukacji - (poster). Badanie wpływu form kosmetycznych na biodostępność β -karotenu, (Poznań, 18-19.11.2015).
- Gościańska J., Olejnik A., **Igielska-Kalwat J.**, Kapuścińska A., Zielińska A., Nowak I. 58 Zjazd PTChem i SITPChem - (współautorstwo wystąpienia ustnego). Stabilność emulsji kosmetycznych zawierających wybrane substancje aktywne, (Gdańsk, 21-25.09.2015).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Zielone Idee 21 wieku, Karotenoidy - (poster). Substancje aktywne XXI wieku stosowane w kosmetykach naturalnych, (Poznań, 15.10.15).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Wpływ Młodych Naukowców Na Osiągnięcia Polskiej Nauki VII Edycja - (poster). Nowe trendy w naukach, Badanie in vivo wpływu form kosmetycznych zawierających β -karoten, (Wrocław, 16.01.15).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. 4th European Young Engineers Conference - (wystąpienie ustne oraz poster). In vivo studies of cosmetic formulations with β -carotene, (Warszawa, 27-29.04.2015).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry - (poster). Determination of antioxidant activity of commercial creams containing carotenoids, (Warszawa 23-25.10.2014).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Oxygenalia - (poster). Oznaczanie właściwości antyoksydacyjnych w kremach komercyjnych zawierających β -karoten, (Poznań, 21.10.2014).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Zielone Idee 21 wieku - (poster). Karotenoidy - substancje aktywne stosowane w kosmetykach naturalnych, (Poznań, 15.10.14r.).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. IX Poznańska Konferencja Naukowa: Chemia - nowe wyzwania dla nauki i przemysłu - (poster). Metodyka oznaczania karotenoidów w preparatach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, (Poznań, 5.12.2014).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. 1 Poznańskie Sympozjum Młodych Naukowców - (poster). Badanie in vivo form kosmetycznych na biodostępność β -karotenu, (Poznań, 15.10.14).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki - (wystąpienie ustne). Badanie stabilności emulsji zawierających karotenoidy, (Poznań, 01.12.13).

- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. 57 Zjazd PTChem i SITPChem - (poster), Opracowanie metodyki oznaczania zawartości karotenoidów oraz stopnia ich uwalniania z formułacja kosmetycznych, (Częstochowa, 14-18.09.14).
- Kapuścińska A., **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. 57 Zjazd PTChem i SITPChem - (poster). Badanie właściwości fizykochemicznych emulsji kosmetycznych, (Częstochowa, 14-18.09.14).
- Kapuścińska A., **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. 57 Zjazd PTChem i SITPChem - (poster). Mocznik jako substancja aktywna preparatów kosmetycznych, (Częstochowa, 14-18.09.14).
- Kapuścińska A., **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. BaltSilica - (poster). Use of the silica in cosmetics industry, (Poznań, 1-3.06.14).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. 4th Summer Symposium on Nanomaterials and their Application to Biology and Medicine - (poster), Innovative use of carbon nanotubes in medicine, (Poznań, 15-18.06.14).
- **Igielska-Kalwat J.**, Kapuścińska A., Nowak I. Carbon Materials in Science and Technology - (poster). Applications of nanotubes in medicine, (Toruń, 14-18.14).
- Kapuścińska A., **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Carbon Materials in Science and Technology - (poster). Prospects for the use of carbon nanotubes in cancer therapy, (Toruń, 14-18.14).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Ekologia w dietetyce i kosmetologii - (wystąpienie ustne). Karotenoidy - substancje aktywne stosowane w kosmetykach naturalnych, (Lublin, 24.04.13).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki - (wystąpienie ustne). Zastosowanie nowych technik analitycznych do badania stabilności emulsji kosmetycznych zawierających karotenoidy, (Poznań, 12.01.13).
- **Igielska-Kalwat J.**, Nowak I. Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki - (wystąpienie ustne). Karotenoidy i ich zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, (Poznań, 08.12.12).

