



— PRACA DOKTORSKA —

**Otrzymywanie i charakterystyka formulacji kosmetycznych
zawierających inkorporowane substancje z grupy laktonów
seskwiterpenowych do nanocząstek lipidowych**

*Preparation and characterization of cosmetic formulations containing
substances from the sesquiterpene lactone group incorporated into
lipid nanoparticles*

mgr Aleksandra Skoczeń

Promotor:

prof. dr hab. Izabela Nowak

Praca przedstawiona Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne
Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu
celem uzyskania stopnia naukowego doktora nauk chemicznych

Poznań 2025

Przede wszystkim pragnę wyrazić ogromną wdzięczność
Pani Profesor Izabeli Nowak
za wieloletnią opiekę merytoryczną, przekazaną wiedzę,
ogromną wyrozumiałość, cenne rady i poświęcony mi czas,
a także za to, że bycie naukową Mentorką
potrafiła doskonale łączyć z właściwą sobie życzliwością i pogodą ducha.

Składam serdeczne podziękowania

Dr Marcie Marzec

za życzliwość i nieocenione wsparcie,
a także za bycie wzorem naukowej dociekliwości i profesjonalizmu.

Wyrazy wdzięczności kieruję także w stronę pozostałych osób
związanych z Zakładem Chemii Stosowanej Wydziału Chemii UAM
w okresie mojego doktoratu. Dziękuję:

Pani dr Agacie Wawrzyńczak, Pani dr hab. Agnieszce Feliczak-Guzik

za wszelką pomoc i wsparcie oraz za stworzenie przyjaznej atmosfery pracy.

Szczególnie dziękuję

Rodzinie i wszystkim Bliskim mi osobom

za wiarę we mnie, codzienne wsparcie oraz za bycie źródłem motywacji

Spis treści

1. Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim i angielskim	9
2. Spis symboli, oznaczeń i skrótów stosowanych w pracy	13
3. Wstęp.....	15
4. Część literaturowa.....	17
4.1. Transport substancji aktywnych przez skórę	17
4.1.1. Budowa naskórka.....	17
4.1.2. Nośniki substancji aktywnych	20
4.1.3. Nanocząstki lipidowe	20
4.1.4. Charakterystyka otrzymanych nanocząstek lipidowych.....	24
4.1.5. Zastosowania nanocząstek lipidowych w kosmetologii.....	25
4.2. Laktony seskwiterpenowe.....	28
4.2.1. Właściwości fizyczne laktonów seskwiterpenowych.....	28
4.2.2. Właściwości biologiczne laktonów seskwiterpenowych.....	29
4.3. Emulsje kosmetyczne	31
4.3.1. Rodzaje emulsji	31
4.3.2. Stabilność i mechanizmy stabilizacji emulsji.....	33
4.3.3. Charakterystyka rozkładu wielkości kropeł w układach rozproszonych.....	35
4.3.4. Zastosowanie emulsji w przemyśle kosmetycznym.....	36
4.4. Żele.....	37
4.4.1. Hydrożele	37
4.4.2. Oleożele	39
4.6. Badanie uwalniania substancji aktywnych z emulsji i żeli	42
4.7. Antyoksydacyjne właściwości substancji aktywnych.....	43
4.8. Badania biofizycznych parametrów skóry	46
4.8.1. Analiza nawilżenia skóry	47
4.8.2. Analiza kolorytu skóry	49
4.8.3. Analiza topografii skóry	49
4.8.4. Analiza makrorzeźby skóry.....	51
5. Cel pracy	53
6. Metodyka pracy	55
6.1. Preparatyka nanocząstek lipidowych	55
6.2. Charakterystyka fizykochemiczna uzyskanych dyspersji nanocząstek lipidowych.....	58
6.3. Preparatyka formułacji kosmetycznych	62
6.4. Charakterystyka fizykochemiczna badanych formułacji kosmetycznych	65
6.5. Badanie aktywności antyoksydacyjnej.....	72

6.6. Badanie efektywności działania otrzymanych preparatów kosmetycznych	75
7. Wyniki badań i dyskusja.....	79
7.1. Preparatyka nanocząstek lipidowych	79
7.2. Charakterystyka fizykochemiczna uzyskanych dyspersji nanocząstek lipidowych	81
7.3. Charakterystyka fizykochemiczna badanych formułacji kosmetycznych.....	95
7.4. Badanie aktywności antyoksydacyjnej	115
7.5. Badanie efektywności działania otrzymanych preparatów kosmetycznych	119
8. Podsumowanie i wnioski.....	147
9. Literatura.....	151
10. Spis osiągnięć naukowych	161
10.1. Publikacje w czasopismach naukowych	161
10.2. Uczestnictwo w konferencjach naukowych.....	161
10.3. Przyznane wyróżnienia	162
11. Spis rysunków i tabel	163
12. Załączniki	167

1. Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim i angielskim

Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim

Współczesna farmacja i kosmetologia stoją przed wyzwaniem opracowywania nowych substancji czynnych (SA), charakteryzujących się wysoką aktywnością biologiczną oraz skutecznością działania. Efektywność preparatów zawierających substancje aktywne jest determinowana szeregiem czynników fizykochemicznych i biologicznych, takich jak rozpuszczalność, biodostępność, przenikalność oraz metabolizm w organizmie. Jedną z istotnych dróg podawania substancji jest droga przezskórna, umożliwiająca miejscowe dostarczanie SA bezpośrednio do miejsca docelowego. Jej skuteczność ogranicza jednak bariera wynikająca z budowy skóry, stanowiąca istotne utrudnienie w przenikaniu substancji czynnych.

W celu pokonania tej bariery zastosowano różnego rodzaju nośniki, które pełnią rolę systemów transportowych. Szczególną uwagę poświęcono liposomom, mikrosferom oraz nanocząstkom lipidowym, które umożliwiły inkorporację określonych substancji aktywnych, zapewniając im wysoką stabilność oraz zwiększoną biodostępność. Dzięki małym rozmiarom i dużemu powinowactwu do składników skóry, nanocząstki lipidowe wykazały bardzo dobrą tolerancję skórną, wysoką stabilność oraz zdolność do modulowania uwalniania substancji w miejscu docelowym.

W niniejszej rozprawie doktorskiej wykorzystano nanocząstki lipidowe jako matrycę dla substancji aktywnych, co pozwoliło zwiększyć ich przenikanie przez skórę oraz kontrolować ich uwalnianie. Przedmiotem badań były nowe związki z grupy laktonów seskwiterpenowych – kostunolid oraz lakton dehydrokustusowy – wykazujące różnorodne właściwości biologiczne, dotychczas niesostosowane w kosmetykach ani lekach. Po raz pierwszy zbadano wpływ enkapsulacji tych substancji w nanocząstkach lipidowych na ich aktywność biologiczną, co otworzyło możliwość opracowania innowacyjnych formułacji kosmetycznych i leczniczych.

W ramach przeprowadzonych badań otrzymano nanocząstki lipidowe zawierające wybrane substancje aktywne, dokonano charakterystyki ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych oraz włączono je do nowych formułacji kosmetycznych. Opracowano i zoptymalizowano skład nośników, określono efektywność enkapsulacji, oceniono stabilność otrzymanych układów oraz przeprowadzono analizę procesu uwalniania substancji aktywnych. Wykonano badania przenikania przezskórnego, w których uzyskane wyniki porównano z działaniem preparatów zawierających te same substancje w formie nieenkapsulowanej. Przeprowadzone badania aplikacyjno-użytkowe, obejmujące pomiar wybranych parametrów skóry podczas stosowania opracowanych preparatów, jednoznacznie potwierdziły możliwość zastosowania nanocząstek lipidowych w przezskórnym systemie dostarczania substancji czynnych.

Abstract of the PhD Thesis in English

Modern pharmacy and cosmetology face the challenge of developing new active substances (AS) characterized by high biological activity and efficacy. The effectiveness of formulations containing active substances is determined by a variety of physicochemical and biological factors, such as solubility, bioavailability, permeability, and metabolism in the human body. One of the important routes of administration is the transdermal route, which allows for the local delivery of active substances directly to the target site. However, its effectiveness is limited by the skin barrier, which significantly restricts the penetration of active compounds.

To overcome this barrier, various types of carriers have been applied as transport systems. Particular attention has been given to liposomes, microspheres, and lipid nanoparticles, which enable the incorporation of specific active substances, ensuring their high stability and enhanced bioavailability. Due to their small size and high affinity for skin components, lipid nanoparticles demonstrate excellent skin tolerance, high stability, and the ability to modulate the release of active compounds at the target site.

In this doctoral dissertation, lipid nanoparticles were used as carriers for active substances to enhance their penetration through the skin and to control their release. The research focused on two novel sesquiterpene lactones — costunolide and dehydrocostus lactone — which exhibit diverse biological properties and have not previously been applied in cosmetic or pharmaceutical formulations. For the first time, the influence of encapsulation of these compounds within lipid nanoparticles on their biological activity was investigated, opening up the possibility of developing innovative cosmetic and therapeutic formulations.

During the course of this research, lipid nanoparticles containing the selected active substances were prepared and comprehensively characterized in terms of their physicochemical and biological properties. They were then incorporated into newly developed cosmetic formulations. The composition of the carriers was optimized, encapsulation efficiency was determined, the stability of the obtained systems was evaluated, and the release profiles of the active compounds were analyzed. Furthermore, transdermal permeation studies were performed, and the results were compared with those obtained for formulations containing the same active substances in their non-encapsulated forms. Application and usability tests, which involved measuring selected skin parameters during the use of the prepared formulations, clearly confirmed the potential of lipid nanoparticles as effective carriers in transdermal delivery systems for active substances.

2. Spis symboli, oznaczeń i skrótów stosowanych w pracy

Poniżej podano rozwinięcia skrótów i symboli używanych w rozprawie, w języku polskim oraz angielskim (kursywą).

ABTS	2,2'-azyno-bis(3-etylo-benzotiazolino)-6-sulfonian
DLS	Dynamiczne rozpraszanie światła (ang. <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DPPH	2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl
DSC	Skaningowa kalorymetria różnicowa (ang. <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
ELS	Elektroforetyczne rozpraszanie światła (ang. <i>Electrophoretic Light Scattering</i>)
F-C	Metoda Folina–Ciocâlțeu
FRAP	Test siły przeciwutleniającej redukcji żelaza (ang. <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)
GAE	Ekwiwalent kwasu galusowego (ang. <i>Gallic Acid Equivalent</i>)
HAT	Mechanizm przeniesienia atomu wodoru (ang. <i>Hydrogen Atom Transfer</i>)
HLB	Równowaga hydrofilowo-lipofilowej (ang. <i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>)
HPH	Homogenizacja wysokociśnieniowa (ang. <i>High Pressure Homogenization</i>)
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
LOD	Granica wykrywalności (ang. <i>Limit of detection</i>)
LOQ	Granica oznaczalności (ang. <i>Limit of quantification</i>)
LN	Nanonośniki lipidowe (LN, ang. <i>Lipid Nanoparticles</i>),
NLC	Nanostrukturalne nośniki lipidowe (ang. <i>Nanostructured Lipid Carriers</i>)
NMF	naturalny czynnik nawilżający (ang. <i>Natural Moisturizing Factor</i>)
Nrf2	Jądrowy czynnik transkrypcyjny związany z czynnikiem erytroidalnym 2 (ang. <i>nuclear factor erythroid-2 related factor</i>)
O/W	Emulsja typu olej w wodzie (ang. <i>Oil-in-Water emulsion</i>)
PDI	Wskaźnik polidispersyjności (ang. <i>Polydispersity Index</i>)
RI	Współczynnik załamania światła ang. (ang. <i>Refractive Index</i>)

ROS	Reaktywne formy tlenu (ang. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SA	Substancja aktywna
SELS	Parametry powierzchni żywej skóry, (ang. <i>Surface Evaluation of Living Skin</i>)
SET	Mechanizm przeniesienia pojedynczego elektronu (ang. <i>Single Electron Transfer</i>)
SLN	Stałe nanocząstki lipidowe (ang. <i>Solid Lipid Nanoparticles</i>)
SC	Warstwa rogową naskórka (łac. <i>Stratum Corneum</i>)
TEAC	Ekwiwalent troloksu (ang. <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>)
TEM	Transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TEWL	Transepidermalna utrata wody, (ang. <i>Trans Epidermal Water Loss</i>)
TPC	Całkowita zawartość związków fenolowych (ang. <i>Total Phenolic Content</i>)
TPTZ	2,4,6-tri(2-pirydylo)-s-triazyna
W/O	Emulsja typu woda w oleju (ang. <i>Water-in-Oil emulsion</i>)
XRD	Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (ang. <i>X-ray Diffraction</i>)
Z-Ave	Średnia średnica cząstek (ang. <i>mean particle size</i>)
ZP	Potencjał Zeta (ang. <i>Zeta Potential</i>)

3. Wstęp

Nanotechnologia w ostatnich dwóch dekadach zrewolucjonizowała przemysł kosmetyczny, prowadząc do powstania tzw. nanokosmetyków, w których nanoskalowe układy nośnikowe zapewniają większą biodostępność, stabilność oraz skuteczność działania substancji aktywnych. W szczególności nanonośniki lipidowe (LN, ang. *Lipid Nanoparticles*), takie jak stałe nanocząstki lipidowe (SLN, ang. *Solid Lipid Nanoparticles*) oraz nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLC (ang. *Nanostructured Lipid Carriers*), zyskały duże znaczenie w dermatologii, kosmetologii i farmacji dzięki swojej biokompatybilności, zdolności do kontrolowanego uwalniania oraz możliwości inkorporacji związków zarówno lipofilowych, jak i hydrofilowych. Dodatkowym atutem tych systemów jest ich podobieństwo strukturalne do lipidów skóry, co sprzyja poprawie jej nawilżenia, uelastycznieniu bariery naskórkowej i zwiększeniu penetracji bioaktywnych składników.

Wśród licznych substancji aktywnych wykorzystywanych w kosmetologii coraz większe zainteresowanie budzą naturalne związki roślinne o silnym działaniu biologicznym, w tym laktony seskwiterpenowe. Wykazują one właściwości przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwdrobnoustrojowe i regenerujące, dzięki czemu mogą stanowić cenne składniki preparatów kosmetycznych i dermokosmetyków.

Zastosowanie lipidowych systemów nośnikowych w formulacjach kosmetycznych stanowi zatem perspektywiczne rozwiązanie w projektowaniu innowacyjnych produktów opartych na laktonach seskwiterpenowych. Badania nad takimi układami wpisują się w aktualne trendy zrównoważonego rozwoju i zielonej chemii, łącząc wykorzystanie naturalnych bioaktywnych składników z bezpiecznymi i efektywnymi technologiami dostarczania.

Celem niniejszej pracy jest opracowanie i charakterystyka formulacji kosmetycznych zawierających wybrane laktony seskwiterpenowe, inkorporowane do nanocząstek lipidowych. Badania koncentrują się na określeniu parametrów fizykochemicznych, stabilności oraz potencjału aplikacyjnego uzyskanych układów, z uwzględnieniem ich możliwego zastosowania w kosmetologii i dermatologii.

4. Część literaturowa

4.1. Transport substancji aktywnych przez skórę

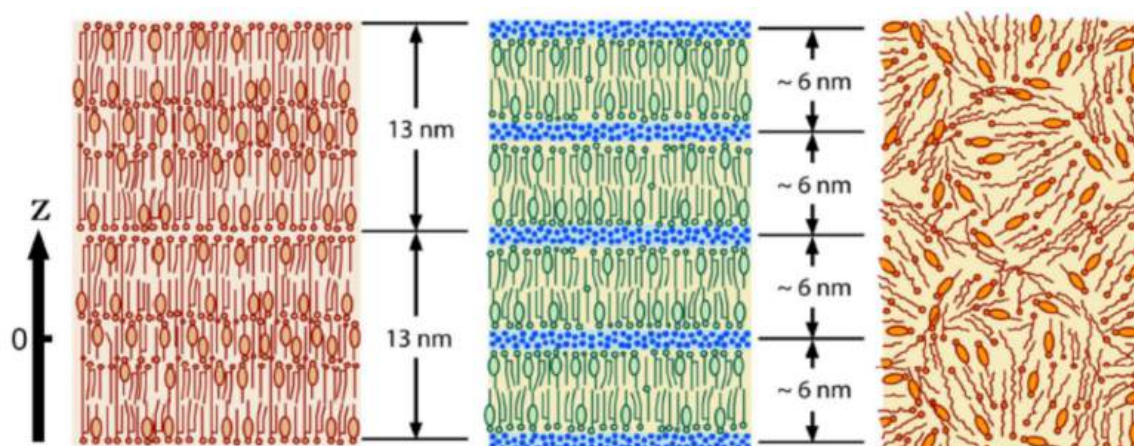
4.1.1. Budowa naskórka

Ludzka skóra, stanowiąca około 16% całkowitej masy ciała, jest największym organem i służy jako podstawowa bariera przed szkodliwymi czynnikami środowiskowymi, takimi jak inwazja drobnoustrojów, promieniowanie UV, stres chemiczny lub mechaniczny [1]. Przenikanie opracowanych substancji aktywnych (SA) przez skórę stanowi jedną z najważniejszych kwestii podczas badań nad efektywnością działania związków stosowanych na rynku kosmetyczno-farmaceutycznym. Skuteczność działania leku, z określoną substancją biologicznie czynną, uwarunkowana jest zarówno jego oddziaływaniem na lipidy cementu międzykomórkowego warstwy rogowej naskórka, jak i na błony komórkowe [2]. Główną barierą, która utrudnia przenikanie substancji aktywnej przez skórę, jest najbardziej zewnętrzna warstwa naskórka – warstwa rogową (łac. *stratum corneum*) [3]. Badania dotyczące mechanizmu przenikania na poziomie molekularnym są szczególnie ważne, ale żeby je przybliżyć niezbędny jest krótki opis struktury skóry, a dokładniej naskórka (SC).

Naskórek ma grubość 10-20 μm i składa się z 15-20 warstw spłaszczonych, gęsto upakowanych korneocytów wypełnionych keratyną, oddzielonych blaszkowatym międzykomórkowym układem lipidowym (rys. 4.1). Pozostała część naskórka ma grubość 50-120 μm , tj. warstwowego nabłonka płaskonabłonkowego, w którym nie występują naczynia krwionośne [4], [5].

Dane dotyczące rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małym kątem uzyskane przez Hatta i wsp. [6] wskazują, że lamelarny układ lipidowy SC można podzielić na dwie powtarzające się, charakterystyczne fazy, a mianowicie fazę o krótkiej okresowości (SPL) ~ 6 nm i fazę o długiej okresowości (LPL) ~ 13 nm oraz fazę ciekłą (rys. 4.1). W SPL łańcuchy węglowodorowe lipidów mogą tworzyć trzy formy upakowania z przekrojem poprzecznym węglowodorowych łańcuchów alkilowych wskazujących na stan ortorombowy, heksagonalny lub układ w stanie ciekłym (ciekły kryształ). Formy heksagonalne i ciekłokrystaliczne charakteryzują się większą mobilnością łańcuchów węglowodorowych, ponieważ są one luźno upakowane a zatem mają większą przepuszczalność w porównaniu do łańcuchów lipidowych w układzie romboidalnym.

Grubość SPL zależy od ilości wody zawartej w SC, ponieważ wraz ze wzrostem uwodnienia, do 60% w/w, długość SPL wzrasta liniowo, wskazując na tworzenie się nowej fazy wodnej pomiędzy lamelarnymi warstwami lipidowymi SC (bezpośrednio wpływając na wzrost długości fazy SPL). Separacja faz w obszarze lipidów lamelarnych może prowadzić do przegrupowania łańcuchów węglowodorowych lipidów w micelle.



Rys. 4.1. Chemia struktur lamelarnych utworzonych przez lipidy międzykomórkowe; od lewej: struktura lamelarna o długim okresie (LLS), struktura lamelarna o krótkim okresie (SLS); nieuporządkowany stan ciekły (LIQUID). Źródło: opracowanie na podstawie [6], licencja CC BY 4.0

Badanie przeprowadzone przez Ogawa-Fuse i wsp. [7] potwierdziły, że uwodniony SC powoduje zwiększoną przepuszczalność dla hydrofilowych substancji aktywnych (SA). W badaniu przeprowadzonym przez Yamamoto i wsp. [8] omówiono ważną rolę hamowania przeznaskórkowej utraty wody poprzez okluzję w penetracji ketoprofenu. Fizjologicznie, zawartość wody w naskórku zmniejsza się od żywych warstw naskórka *stratum spinosum* i *stratum granulosum* (około 70% wagowo) do SC. Średnio zawartość wody w SC wynosi 25%, ale autorzy podają różne wyniki, na które mogą mieć wpływ warunki pomiaru, a także indywidualny charakter bariery naskórkowej [9].

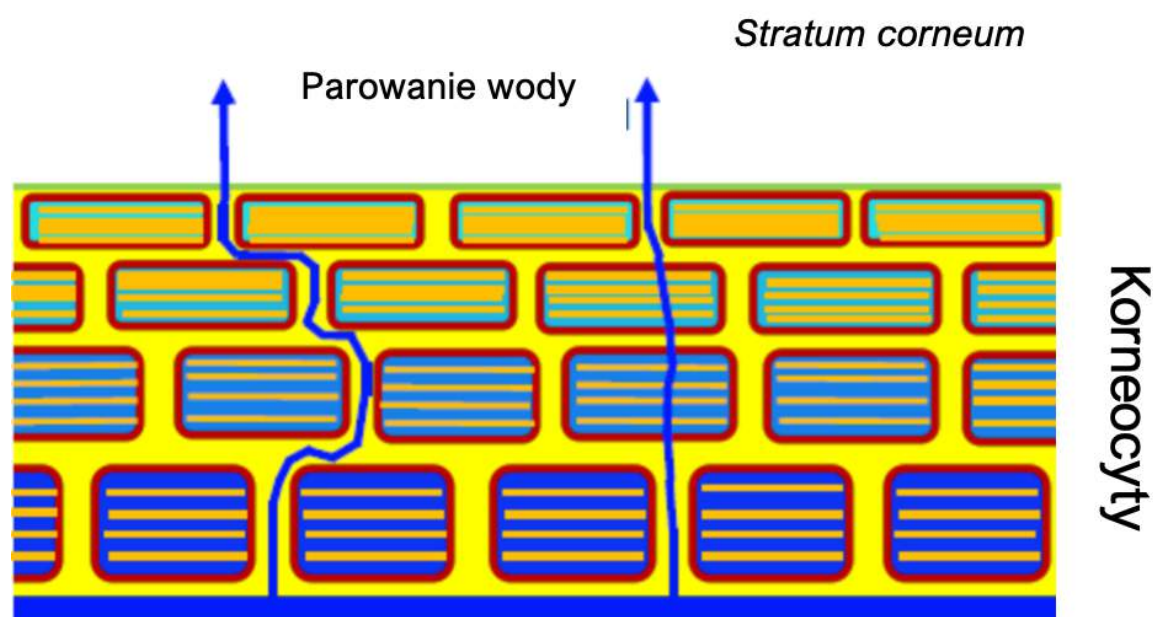
Badanie przeprowadzone przez Jokura i wsp. [10] dostarczyło informacji, że cząsteczki wody niezwiązane z białkami korneocytów są częścią naturalnego czynnika nawilżającego NMF. NMF składa się ponadto z aminokwasów, mocznika, soli kwasu mlekowego, kwasu piroglutaminowego (PCA) i jego soli, cukrów, jonów sodu, jonów magnezu, jonów potasu, jonów wapnia, jony chloru i fosforanowe. NMF tworzą wiązania jonowe do keratynowych, które zmieniają elastyczność keratyny poprzez zmniejszenie sił międzycząsteczkowych.

Mieszanina lipidów SC, zorganizowana w podwójną warstwę, zapewnia właściwości ochronne dla naskórka i jednocześnie tworzy barierę dla dyfuzji substancji aktywnych. Składa się ona z ceramidów (40-50% masy), cholesterolu (20-30%), siarczanu cholesterolu (2-5%) i wolnych kwasów tłuszczowych (7-13%) [11], [12]. Należy w tym miejscu wskazać, że warstwa SC nie zawiera fosfolipidów [13]. Zaś ceramidy są szczególnie ważne w zapewnianiu funkcji barierowej naskórka, zbudowane są z grupy sfingozy, która mogą być sfingozyną, dihydrospingozyzną lub fitosfingozyzną i 6-hydroksyfingozyną połączoną wiązaniem amidowym z resztą acylową kwasu tłuszczowego, który może być niepodstawiony, α -hydroksylowany lub ω -hydroksylowany i zawierać grupę ω -linoleoilową. Taka struktura zapewnia tworzenie silnej sieci wiązań wodorowych, która utrzymuje stabilność lamelarniej struktury oraz zapewnia wytrzymałość i właściwości barierowe SC [14].

Wolne kwasy tłuszczowe w ludzkim SC zazwyczaj składają się z nasyconych (długości łańcuchów od C14:0 do C34:0) i nienasyconych (C16:1 do C18:1, C30:1 do C36:1, C18:2) kwasów tłuszczowych. Najlichniesza grupa kwasów tłuszczowych

obecnych w SC (>50% wszystkich kwasów tłuszczowych SC) to kwasy nasycone, liniowe lipidy o łańcuchach od 16 do 30 atomów węgla, z których najczęstszymi są kwas lignocerynowy (C24:0) i kwas heksakozanowy (C26:0) [13].

Podsumowując, SC tworzy hydrofobową, niepolarną barierę ochronną, która jest określana przez homeostatyczny skład i ilość poszczególnych składników SC. Wahania w ilości składników SC, jak również zwiększone nawodnienie tej warstwy znacząco zmieniają jej właściwości (rys. 4.2). Jeśli chodzi o transdermalne podawanie SA, powyższe informacje są cenną wskazówką dla badaczy, ponieważ zachęca do poszukiwania środków zwiększających przenikanie, które mogą tymczasowo wpływać na skład chemiczny i uwodnienie SC.



Rys. 4.2. Zmodyfikowany model cegiełkowo-zaprawowy warstwy rogowej naskórka narysowany z uwzględnieniem udziału wody. Woda przenika krętymi ścieżkami międzykomórkowej macierzy lipidowej i przez korneocyty (woda nieustannie odparowuje z powierzchni skóry). Wraz ze spadkiem zawartości wody w kierunku powierzchni skóry, grubość korneocytów zmniejsza się [6], licencja CC BY 4.0

Dostarczanie przezskórne umożliwia penetrację skóry, modyfikując właściwości warstwy rogowej naskórka za pomocą metod pasywnych lub metod aktywnych. Podczas gdy technika pasywna koncentruje się na interakcji SA i nośnika oraz optymalizacji, aby wpłynąć na strukturę warstwy rogowej naskórka, aktywne podejście wykorzystuje energię zewnętrzną, aby ułatwić transport SA przez skórę lub poprzez fizyczne zakłócenie najbardziej zewnętrznej warstwy skóry, znaną jako warstwa rogowa naskórka [15], [16].

4.1.2. Nośniki substancji aktywnych

Dla umożliwienia efektywnego transportu tych substancji w głąb skóry tworzy się nowoczesne różnego rodzaju nośniki, w których zamknięte są niewielkie ilości substancji aktywnej. Zadaniem nośników jest penetracja kolejnych warstw skóry i transport substancji czynnej do miejsca, w którym powinno dojść do jej uwolnienia [17].

Polimerowe nanocząstki opracowane przez P. P. Speisera do celów farmaceutycznych w połowie lat siedemdziesiątych [18] znalazły jedynie ograniczone zastosowanie w kosmetykach. Problemem jest często brak statusu regulacyjnego wielu stosowanych polimerów, kosztowna produkcja na dużą skalę i brak biodegradacji (brak "zielonych" produktów, a więc brak certyfikacji po ECOCERT/COSMOS). Z biegiem czasu, pojawiły się również różne "somy", wywodzące się z liposomów i znajdujących niewiele zastosowań (np. niosomy, etosomy, transferomy, farmakosomy, herbosomy, koloidosomy, sfinosomy i kubosomy [19].

Krokiem naprzód w 1991 roku było opracowanie nośnika wykonanego ze stałych lipidów, stałych nanocząstek lipidowych (SLN, ang. *Solid Lipid Nanoparticles*). Są one produkowane z emulsji poprzez zastąpienie ciekłego lipidu (oleju) stałym lipidem i dlatego są stałe w temperaturze ciała. Druga generacja tych cząstek, nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLC, ang. *Nanostructured Lipid Carriers*) trafiła na rynek kosmetyczny w 2005 roku i jest zazwyczaj mieszaniną jednego stałego lipidu i jednego ciekłego lipidu [20] np. tristearyny i trójglicerydu kaprylowego/kaprynowego, które również są stałe w temperaturze ciała.

W 2014 r. opracowano nową generację nośników o nazwie SmartLipids [21]. Łączą one wszystkie dotychczasowe zalety poprzednich cząstek i dodają nowe kluczowe cechy – są to wyraźnie zwiększona pojemność i silne wiązanie substancji czynnych, wraz z poprawioną stabilnością fizyczną i zwiększoną stabilnością chemiczną. Osiągnięto to poprzez stworzenie "chaotycznej" struktury matrycy na drodze zmieszania wielu różnych lipidów, np. do dziesięciu stałych lipidów lub mieszaniny stałych i ciekłych lipidów [22].

Nanocząstki lipidowe są obecnie jednymi z najnowszych i najbardziej skutecznych nośników substancji aktywnych w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym, których zadaniem jest zwiększanie biodostępności inkorporowanej substancji aktywnej [23], [24], [25], [26]. Ze względu na zawartość fizjologicznych i biodegradowalnych lipidów, wykazują powinowactwo do skóry i stosowane zewnętrznie nie naruszają jej funkcji [27].

4.1.3. Nanocząstki lipidowe

Nanocząstki lipidowe (LN, ang. *Lipid Nanoparticles*) stanowią nowoczesną i wszechstronną platformę transportową, stosowaną w kosmetyce i farmacji, jak wspomniano powyżej, od początku lat 90. XX wieku. Ich struktura oparta jest na biokompatybilnych i biodegradowalnych lipidach, które dzięki zdolności do inkorporacji zarówno związków lipofilowych, jak i hydrofilowych, umożliwiają efektywne dostarczanie substancji aktywnych. Stabilność układu zapewniają

surfaktanty, pełniące kluczową rolę w kształtowaniu właściwości dyspersji. Charakter końcowej formulacji zależy m.in. od rodzaju użytego lipidu, surfaktantu oraz zastosowanej metody wytwarzania (rys. 4.3 i 4.4).

I generacja – stałe nanocząstki lipidowe (SLN)

Stale nanocząstki lipidowe należą do pierwszej generacji LN. Ich wielkość mieści się w zakresie 40–1000 nm, a matryca lipidowa pozostaje w stanie stałym w temperaturze ciała. Do wnętrza tak zbudowanej struktury można enkapsulować substancje czynne, których uwalnianie zależy od miejsca ich lokalizacji w obrębie nanocząstki. SLN wykazują niski profil toksyczności, wynikający z zastosowania lipidów uznawanych za fizjologiczne. W praktyce wyróżnia się trzy podstawowe typy SLN, różniące się rozmieszczeniem substancji aktywnej: matrycowe, z rdzeniem lipidowym oraz z substancją ułożoną w warstwie powierzchniowej.

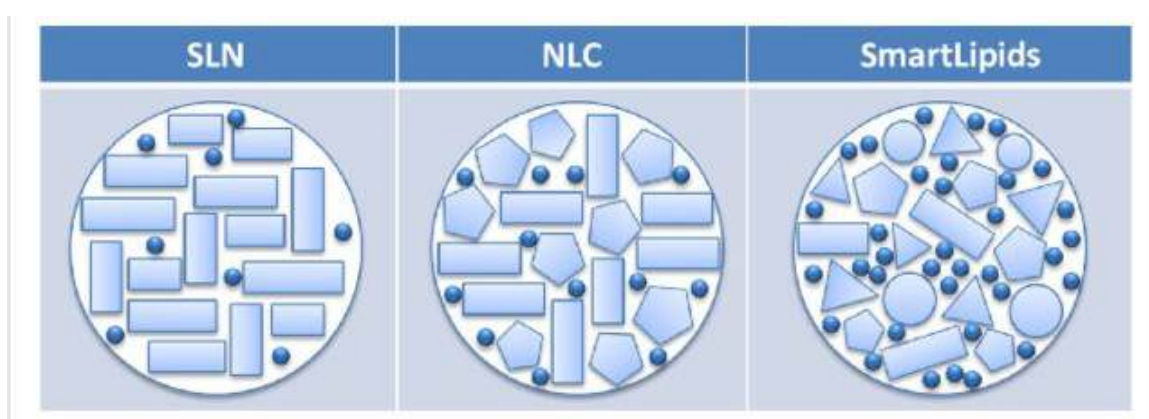
II generacja – nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLC)

Drugą generację nanonośników stanowią NLC, powstałe w celu eliminacji ograniczeń klasycznych SLN. Struktura NLC opiera się na mieszaninie lipidów stałych i ciekłych w ściśle dobranych proporcjach (najczęściej 70:30 do 99,9:0,1). Obecność frakcji ciekłej redukuje stopień uporządkowania matrycy lipidowej, co przekłada się na zwiększoną pojemność ładunkową oraz wyższą stabilność fizyczną. Wielkość NLC nie przekracza zazwyczaj 200 nm, a ich cechy – biodegradowalność i biokompatybilność – czynią je atrakcyjnymi nośnikami substancji aktywnych stosowanych w kosmetologii i farmacji [28].

III generacja – SmartLipids®

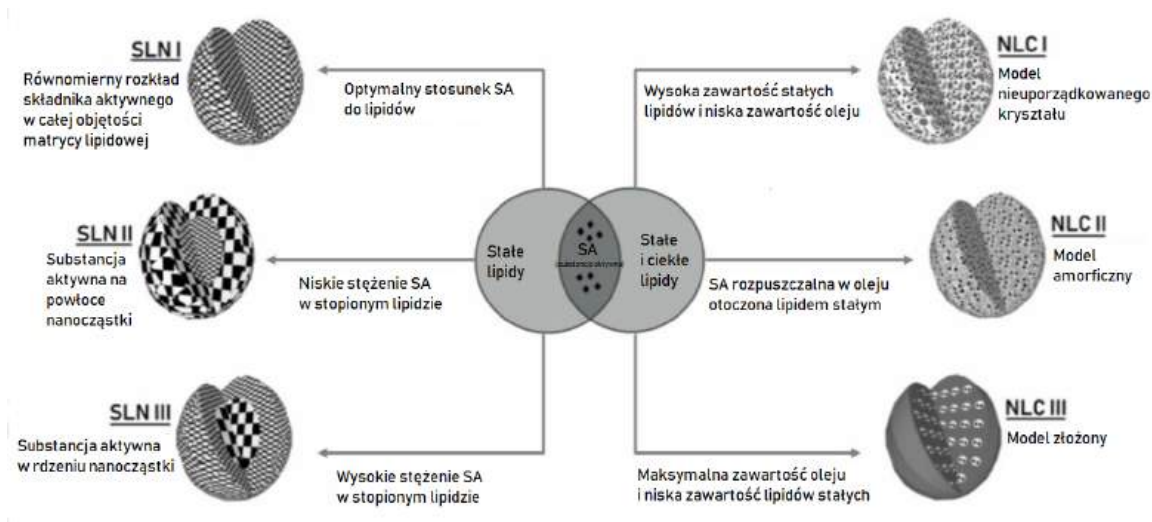
Najmłodszą, trzecią generację stanowią SmartLipids®, wprowadzone w 2014 roku. Ich unikatowa „chaotyczna” struktura tworzona jest poprzez połączenie nawet kilkunastu różnych lipidów, zarówno stałych, jak i ciekłych. Taki układ zwiększa możliwości enkapsulacji, poprawia stabilność fizyczną i chemiczną oraz pozwala uzyskać przedłużony profil uwalniania substancji czynnych. Typowe rozmiary SmartLipids® mieszczą się w zakresie 200–400 nm, choć mogą sięgać od kilku do ponad 1000 nm. Dzięki synergii zalet SLN i NLC są one obecnie uważane za jedne z najbardziej perspektywicznych nośników substancji aktywnych w dermo-kosmetykach i farmacji [29].

Należy dodać, że niektóre z wcześniej opisanych cząsteczek NLC już reprezentują zasadę "SmartLipids". Dzieje się tak w przypadku, gdy jeden stały lipid stosowany w mieszaninie jednego stałego/jednego płynnego lipidu jest to komercyjny lipid, który jest już mieszanką wielu lipidów, lub gdy jest to *a priori* nieuporządkowana mieszanka różnych struktur, np., wosk carnauba, składający się głównie z estrów alifatycznych (40,0% wag.), diestrów kwasu 4-hydroksycynamonowego (21,0% mas.), ω -hydroksykwasów karboksylowych (13,0% wag.) i alkoholi kwasów tłuszczowych (12,0% wag.). Długość łańcucha kwasów tłuszczowych i alkoholi jest głównie w zakresie C26-C30 [30]. Innym klasycznym przykładem komercyjnej mieszanki lipidów jest Cutina LM, która składa się z trzech czystych lipidów i trzech naturalnych mieszanin lipidów (alkohol cetylowy, glukozyd cetearylowy, octylo-dodekanol, wosk carnauba, wosk candelila i wosk pszczeli) [31].



Rys. 4.3. Schemat budowy nanocząstek lipidowych trzech typów - prostokąty reprezentują tłuszcze stałe, a pozostałe kształty różnych typów lipidów, substancja aktywna oznaczona jako grantowe kulki [32].

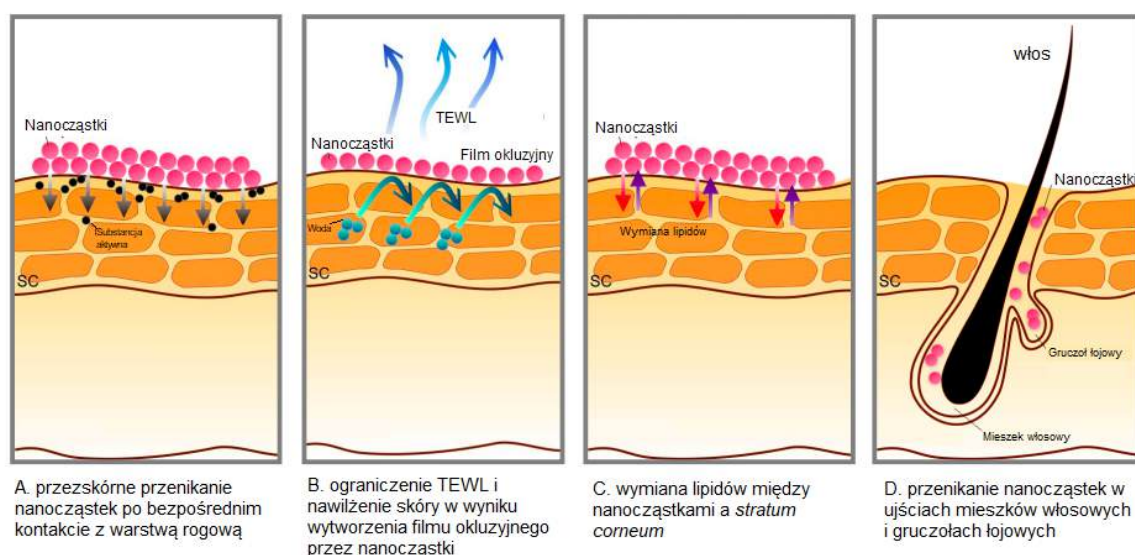
Na budowę nanocząstek lipidowych składają się: stały lipid, substancja aktywna, emulgator i woda (w przypadku NLC i SmartLipids). Stałe lipidy (o zawartości 0,1-30% wag. mieszaniny) zdyspergowane w wodzie tworzą matrycę lipidową, w której rozpuszczona lub zawieszona jest substancja aktywna. Aby stabilizować połączenie wody i lipidu dodawane są emulgatory (ok. 0,5-5% wag. mieszaniny). W przypadku NLC, aby uzyskać matrycę lipidową, stałe lipidy miesza się z ciekłymi w stosunku 70:30-99,9:0,1 [33]. W zależności od metody syntezy oraz charakterystyki wprowadzonego składnika aktywnego obserwuje się różne rozmieszczenie substancji w strukturze powstałej nanocząstki, co ma z kolei wpływ na jej właściwości np. szybkość uwalniania SA (rys. 4.4).



Rys. 4.4. Modele struktur różnych typów nanocząstek lipidowych, otrzymywanych dzięki odmiennym warunkom i właściwościom ich składników. (zaadaptowano z [34])

Do największych zalet nanocząstek lipidowych zalicza się ich nietoksyczność, dzięki biodegradowalności struktury lipidowej [35], zwiększanie skuteczności przenikania transportowanej substancji aktywnej w głąb skóry [36] oraz zwiększenie nawilżenia skóry na skutek wytworzenia filmu na skórze [37] i wzmocnienia bariery warstwy lipidowej przez przyleganie do warstwy rogowej [38].

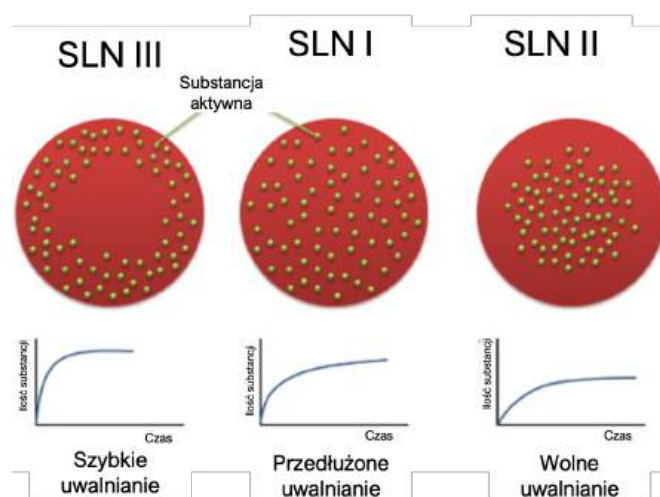
Przenikanie inkorporowanych substancji biologicznie czynnych w nanocząstkach lipidowych jest bardzo efektywne dzięki kilku czynnikom [39] (rys. 4. 5). Jednym z nich są zdolności adhezyjne tego rodzaju nanocząstek do warstwy rogowej naskórka, co umożliwia enkapsulowanym substancjom dotrzeć do głębszych warstw skóry (rys. 4.5a) Następstwem adhezji SLN/NLC jest utworzenie filmu okluzyjnego, który ogranicza przeznaskórkową utratę wody (TEWL, ang. *Trans Epidermal Water Loss*) (rys. 4.5b) [40], [41] co powoduje zmniejszenie wypełnienia korneocytów (komórek warstwy rogowej) i poszerzenie szczelin pomiędzy nimi, co również ułatwia przenikanie substancji w głąb skóry [42], [43], [44]. Kolejnym czynnikiem determinującym transport SA jest rozmiar i podobieństwo nanocząstek lipidowych do fizjologicznego składu skóry [45] co umożliwia wymianę lipidów z warstwą rogową [46] (rys. 4.5c). Warto wspomnieć o możliwości dyfuzji substancji czynnej przez mieszki włosowe, które znajdują się w miejscach na skórze o cieńszej strukturze warstwy rogowej i przy obecności sieci naczyń włosowatych, a ruch włosa przesuwają nanocząstki lipidowe w głąb skóry – w kierunku gruczołu łojowego (rys. 4.5d) [47].



Rys 4.5. Możliwe mechanizmy przenikania składników przez skórę za pomocą nanocząstek lipidowych (na podstawie [48])

Poza ułatwieniami w transporcie substancji, enkapsulacja w SLN/NLC zapewnia inkorporowanym substancjom aktywnym chemiczną ochronę i zwiększenie stabilności podczas transportu do miejsca uwolnienia [49]. Wiązanie SA z matrycą lipidową wpływa na trwałość substancji i eliminuje potencjalne uwalnianie substancji czynnej podczas przechowywania [43].

Pożądane uwalnianie SA może być szybkie, przedłużone/trwałe lub powinno być tak wolne, jak to tylko możliwe (nawet do całkowitego braku uwalniania). Oznacza to, że system nośnika powinien zapewniać możliwość kontrolowania uwalniania substancji czynnych. Uwalnianie może być kontrolowane przez lokalizację aktywnego wewnątrz stałej matrycy cząstek lipidowych (rys. 4.6) Przedłużone uwalnianie jest pożądane w wielu preparatach, np. w związkach przeciwstarzeniowych, takich jak retinol. Kontrolowane uwalnianie jest również pożądane w przypadku substancji czynnych mogących podrażniać skórę, ponieważ stężenia, które są zbyt wysokie i promują podrażnienie należy unikać.



Rys. 4.6. Modele kosmetycznych SA lub leków (zielony) wbudowanych w nanocząstki lipidowe. Od lewej: model wzbogaconej otoczki (szybkie uwalnianie), model roztworu stałego (przedłużone uwalnianie) i model wzbogaconego rdzenia (bardzo powolne uwalnianie) [32]

4.1.4. Charakterystyka otrzymanych nanocząstek lipidowych

Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek lipidowych stanowi kluczowy etap oceny ich stabilności, morfologii oraz właściwości strukturalnych matrycy lipidowej, determinujących zachowanie nośnika w układach kosmetycznych i farmaceutycznych. Właściwości te decydują o biodostępności substancji czynnych, ich uwalnianiu oraz interakcji z warstwą rogową skóry [50].

Stabilność dyspersji koloidalnych, takich jak uzyskane nanocząstki lipidowe, zależy w dużej mierze od ładunku elektrycznego na powierzchni cząstek. Na granicy faz ciecz–cząstka powstaje podwójna warstwa elektryczna, składająca się z warstwy jonów zaadsorbowanych na powierzchni oraz warstwy dyfuzyjnej. Różnica potencjałów między tymi warstwami określana jest jako potencjał zeta (ζ), będący miarą stabilności układu. Wysoka wartość bezwzględna potencjału zeta ($|\zeta| > 30$ mV) świadczy o dobrej dyspersyjności i małej tendencji cząstek do agregacji. Wartość ta zależy m.in. od pH układu – przy tzw. punkcie izoelektrycznym ($\zeta = 0$) cząstki łatwo ulegają zlepianiu. Do pomiaru potencjału zeta wykorzystuje się między innymi Zetasizer Nano Z pracujący w oparciu o technikę elektroforetycznego rozpraszania światła (ELS, ang. *Electrophoretic Light Scattering*). Cząstki zawieszone w cieczy poruszają się w polu elektrycznym, a ich prędkość migracji jest rejestrowana przez system optyczny i przeliczana na wartość potencjału zeta. Oprogramowanie aparatu umożliwia automatyczne opracowanie wyników oraz analizę stabilności dyspersji [51].

Kolejne z podstawowych parametrów opisujących nanonośniki lipidowe są średnia wielkość cząstek (Z-Ave, ang. *mean particle size*) oraz wskaźnik polidispersyjności (Pdl, ang. *Polydispersity Index*), określane metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. *Dynamic Light Scattering*). Technika ta wykorzystuje analizę fluktuacji intensywności rozproszonego światła wywołanych ruchem Browna cząstek zawieszonych w cieczy. Na podstawie prędkości ich dyfuzji obliczana jest hydrodynamiczna średnica cząstek zgodnie z równaniem Stokesa–Einsteina [52].

Wartość Pdl informuje o jednorodności rozkładu wielkości cząstek — wartości poniżej 0,3 uznaje się za charakterystyczne dla dyspersji jednorodnych, typowych dla stabilnych nanostruktur lipidowych [53].

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM, ang. *Transmission Electron Microscopy*) umożliwia bezpośrednią obserwację morfologii i kształtu nanocząstek lipidowych, dostarczając informacji o ich rozkładzie wielkości, gładkości powierzchni oraz jednorodności matrycy lipidowej. Dzięki wykorzystaniu wiązki elektronów TEM pozwala na uzyskanie obrazu o rozdzielczości rzędu pojedynczych nanometrów, umożliwiając wizualizację sferycznych lub owalnych nanocząstek charakterystycznych dla układów SLN i NLC [54].

Wysoki stopień jednorodności morfologicznej koreluje z równomiernym rozmieszczeniem lipidów w matrycy oraz korzystnymi właściwościami reologicznymi i stabilnością układu.

Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC, ang. *Differential Scanning Calorimetry*) stanowi podstawową metodę oceny właściwości termicznych i polimorficznych lipidów użytych w matrycy nanocząstek. Analiza krzywych topnienia pozwala na określenie temperatur przejść fazowych oraz entalpii topnienia, które odzwierciedlają stopień krystaliczności lipidów. Lipidy mogą występować w trzech podstawowych odmianach polimorficznych: α , β' oraz β , różniących się stabilnością termodynamiczną i uporządkowaniem łańcuchów alifatycznych [55].

W nanocząstkach lipidowych obserwuje się zwykle częściową rekrytalizację lipidów w formach metastabilnych (α lub β'), co sprzyja tworzeniu bardziej elastycznej i mniej uporządkowanej matrycy – korzystnej dla kontrolowanego uwalniania substancji czynnych [56].

Dyfrakcja rentgenowska (XRD, ang. *X-ray Diffraction*) pozwala na określenie uporządkowania strukturalnego i identyfikację faz krystalicznych lipidów w nanocząstkach. Pozycje i intensywności refleksów dyfrakcyjnych dostarczają informacji o odległościach między płaszczyznami krystalicznymi i rodzaju form polimorficznych.

Wzorce dyfrakcyjne nanocząstek lipidowych charakteryzują się zwykle poszerzonymi refleksami, co świadczy o niskim stopniu krystaliczności lipidów w porównaniu do ich form surowych. Taka amorficzno-krystaliczna struktura jest pożądana, gdyż zapobiega krystalizacji substancji czynnych i umożliwia ich bardziej stabilne osadzenie w matrycy lipidowej [57].

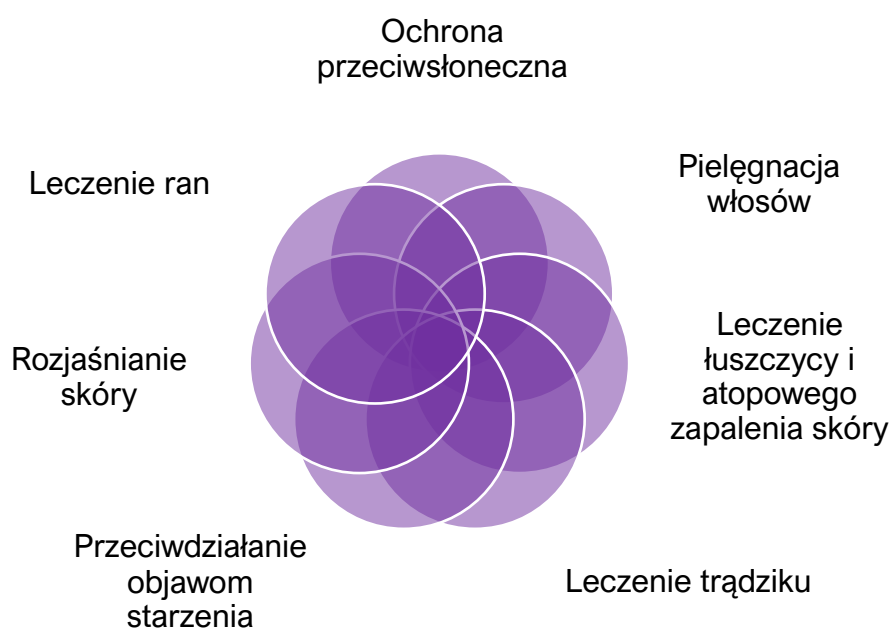
4.1.5. Zastosowania nanocząstek lipidowych w kosmetologii

Nanocząstki lipidowe z powodzeniem wykorzystywane są w szerokiej gamie produktów kosmetycznych i dermokosmetycznych. Ich obecność pozwala na:

- zwiększenie biodostępności składników aktywnych (np. witamin, polifenoli, terpenów),
- poprawę stabilności substancji wrażliwych na światło, tlen czy temperaturę,
- zmniejszenie potencjału drażniącego poprzez kontrolowane uwalnianie,
- poprawę właściwości sensorycznych formulacji (np. łatwiejsza aplikacja, uczucie nawilżenia),

- uzyskanie efektu filmotwórczego na powierzchni skóry, sprzyjającego jej nawilżeniu.

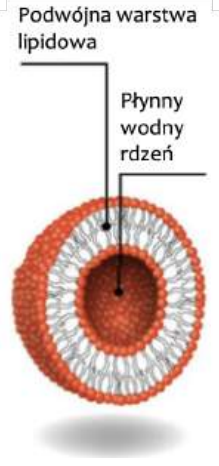
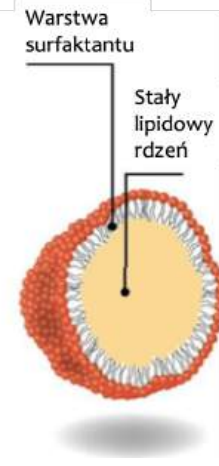
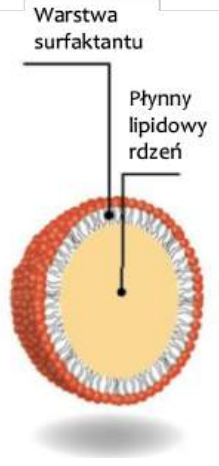
Przykładowo, w badaniach nad zastosowaniem SLN i NLC w preparatach przeciwsłonecznych wykazano, że nanonośniki te poprawiają rozpuszczalność i stabilność filtrów UV, jednocześnie zmniejszając ich potencjał drażniący. Poniżej na rys. 4.7 pokazano potencjalne zastosowania w produkcji różnych produktów kosmetycznych.



Rys. 4.7. Potencjalne zastosowania nanocząstek lipidowych jako nośników SA [58]

Strategie oparte na nanonośnikach są ogólnie uważane za bezpieczne ze względu na biokompatybilność i biodegradowalność materiałów takich jak liposomy i nanocząstki lipidowe, chociaż niektóre typy, takie jak liposomy kationowe, mogą stanowić zagrożenie dla komórek odpornościowych. Ich słaba penetracja i kontrolowane uwalnianie SA przyczyniają się do korzystnego profilu bezpieczeństwa [59]. Skalowalność jest jednak główną przeszkodą, zwłaszcza w przypadku liposomów, ponieważ spójna, powtarzalna produkcja na dużą skalę stanowi wyzwanie techniczne [60]. Chociaż nanonośniki mogą zmniejszyć dawki terapeutyczne i zwiększyć skuteczność leku, wysokie koszty związane z badaniami, rozwojem i zgodnością z przepisami mogą utrudniać rozwój [61]. Ich porównanie przedstawiono w tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Porównanie budowy i właściwości liposomów, nanocząstek lipidowych (SLN/NLC) oraz nanoemulsji stosowanych w systemach dermalnych

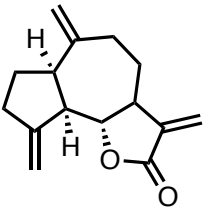
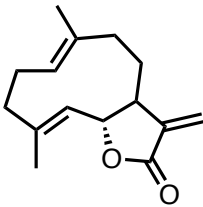
Właściwość	Liposomy	SLN / NLC	Nanoemulsje
Budowa			
Przepuszczalność	Średnia – zależna od fuzji dwuwarstwy fosfolipidowej z lipidami skóry	Niska – ograniczona przez stałą matrycę lipidową	Wysoka – mały rozmiar kropli sprzyja penetracji
Stabilność	Niska – fosfolipidy podatne na utlenianie i degradację	Wysoka – stałe lipidy zwiększają odporność na degradację	Średnia – wymaga emulgatorów i stabilizatorów
Biodostępność	Wysoka – ukierunkowane uwalnianie i dobra zgodność biologiczna	Średnia – powolne, kontrolowane uwalnianie substancji	Wysoka – szybkie uwalnianie i wchłanianie
Skalowalność	Niska – hydratacja filmu lipidowego, sonikacja, ekstruzja	Średnia – homogenizacja wysokociśnieniowa i mikroemulsyfikacja	Wysoka – prosta produkcja emulsji olej-woda
Typowe zastosowania	Witamina C (stabilność i penetracja), peptydy	Koenzym Q10, witamina E (stabilność i trwałość)	Retinol (zwiększona biodostępność, mniejsze podrażnienie)

4.2. Laktony seskwiterpenowe

4.2.1. Właściwości fizyczne laktonów seskwiterpenowych

Laktony seskwiterpenowe są bardzo rozpowszechnione w rozpowszechnione w gatunkach z rodzin roślin złożonych, czyli astrowatych (*Compositae*, *Asteraceae*), selerowatych, czyli baldaszkowatych (*Apiaceae*, *Umbelliferae*) oraz magnoliowatych (*Magnoliaceae*). Seskwiterpeny laktonowe zawierają liczne rośliny i warzywa (aster, stokrotka, seler, marchew, magnolia, tulipanowiec i wiele innych). Suszone korzenie *Saussurea lappa*, znane jako Mu-xiang, są powszechnie stosowane jako lek w Chinach, Japonii i Indiach) jako remedium na wiele dolegliwości.

Tabela 4.2. Porównanie właściwości fizycznych badanych laktonów seskwiterpenowych.

Właściwość	Lakton dehydrokustusowy	Kostunolid
Struktura		
Masa molowa [g/mol]	230,3	232,3
Temperatura topnienia [°C]	57-61	106-107
Lipofilowość (logS)	2,84-3,07 (średnia lipofilowość)	3,38-4,22 (wysoka lipofilowość)
Rozpuszczalność	nierozpuszczalny w wodzie, rozpuszczalny w DMSO i etanolu	nierozpuszczalny w wodzie, rozpuszczalny w DMSO, DMF i etanolu
Przechowywanie	2-8°C	2-8°C

Zgodnie z tabelą 4.2. lakton dehydrokustusowy i kostunolid to strukturalnie pokrewne laktony seskwiterpenowe o wysokiej lipofilowości i praktycznie zerowej rozpuszczalności w wodzie. Kostunolid wyróżnia się nieco wyższą masą, znacząco wyższą temperaturą topnienia oraz większą lipofilowością, co może wpływać na jego właściwości farmakokinetyczne i stabilność fizykochemiczną. Oba wymagają podobnych warunków przechowywania i rozpuszczalników organicznych do przygotowania próbek. Ponadto znacznie wyższa temperatura topnienia kostunolidu sugeruje silniejsze oddziaływania międzycząsteczkowe (np. bardziej regularna krystaliczna struktura, większa liczba wiązań wodorowych lub układów π - π) co będzie dalej przedmiotem dyskusji w analizie wyników badań DSC i XRD.

4.2.2. Właściwości biologiczne laktonów seskwiterpenowych

Kostunolid (K) i lakton dehydrokostusowy (L) są głównymi bioaktywnymi składnikami *S. lappa* i zbadano, iż oba związki mają szerokie spektrum potencjalnych aktywności biologicznych – przeciwnowotworowe [62], [63], przeciwzapalne [64], przeciwdrobnoustrojowe [65], przeciwgrzybicze [66] i aktywności przeciwwirusowe [67]. Dodatkowo mogą również rozszerzać oskrzela, poprawiać funkcję żołądka, obniżać ciśnienie krwi i łagodzić skurcze mięśni gładkich [68]. Z punktu widzenia przemysłu kosmetycznego, bardzo istotne są doniesienia o zdolności do hamowania komórkowej produkcji melaniny, co może czynić te związki chemiczne jako substancje aktywne kosmetyków wybielających skórę [69].

Laktyny seskwiterpenowe, takie jak kostunolid i lakton dehydrokostusowy, stanowią grupę związków o szerokim spektrum aktywności biologicznych. Ich bioaktywność wynika z obecności reaktywnej grupy α -metyleno- γ -laktonowej, która umożliwia tworzenie wiązań kowalencyjnych z grupami tiolowymi ($-SH$) białek, modyfikując tym samym kluczowe szlaki sygnalizacyjne komórki (mechanizm addycji Michaela). Niestety zarówno kostunolid, jak i lakton dehydrokostusowy są bardzo słabo wchłaniane po podaniu doustnym z powodu ich słabej rozpuszczalności w wodzie [70], warto jest wykorzystać ich zdolność do rozpuszczania w tłuszczach oraz inne drogi podania np. przezskórną. Kostunolid i lakton dehydrokostusowy mogą znaleźć zastosowanie nie tylko w farmakologii, ale również w kosmetologii i dermatologii, zwłaszcza w preparatach o działaniu przeciwstarzeniowym, przeciwzapalnym i rozjaśniającym skórę.

Zarówno kostunolid, jak i lakton dehydrokostusowy wykazują silne działanie przeciwzapalne, wynikające głównie z hamowania aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. DHE blokuje fosforylację kinazy IKK β , uniemożliwiając degradację inhibitora I κ B α , co skutkuje zahamowaniem translokacji NF- κ B do jądra i spadkiem ekspresji mediatorów zapalenia, takich jak TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2 i iNOS. Kostunolid wykazuje podobny efekt, a ponadto hamuje szlaki MAPK (ERK1/2, JNK, p38), ograniczając produkcję prostaglandyn i tlenku azotu (NO) w keratynocytach oraz makrofagach [71]. Dzięki tym właściwościom laktyny seskwiterpenowe stanowią obiecujące składniki kosmetyków łagodzących, przeciwrumieniowych i po-zabiegowych, wspierających regenerację skóry po ekspozycji na czynniki drażniące lub UV.

Kostunolid i lakton dehydrokostusowy wykazują również działanie antyoksydacyjne poprzez aktywację jądrowego czynnika związanego z czynnikiem erytroidalnym 2 Nrf2 (Nrf2, ang. *nuclear factor erythroid-2 related factor*) [72], [73]. Aktywowany Nrf2 zwiększa ekspresję enzymów detoksykacyjnych i antyoksydacyjnych, co prowadzi do ograniczenia stresu oksydacyjnego indukowanego przez promieniowanie UV, ozon i wolne rodniki tlenowe. Dzięki temu kostunolid i lakton dehydrokostusowy mogą potencjalnie pełnić funkcję związków przeciwstarzeniowych, chroniących komórki skóry przed fotostarzeniem i degradacją kolagenu. Ich mechanizm działania jest zbliżony do naturalnych induktorów szlaku Nrf2, takich jak sulforafan czy kurkumina.

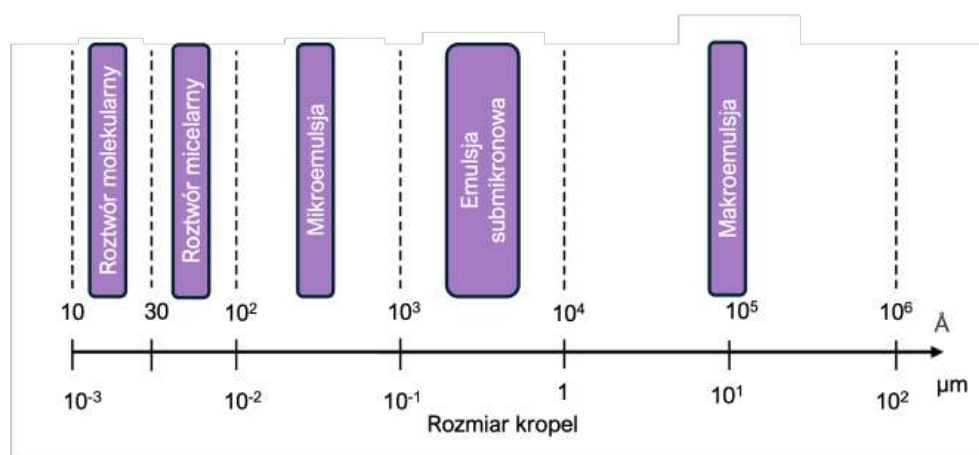
Kostunolid i lakton dehydrokostusowy wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii Gram-dodatnich, m.in. *Staphylococcus aureus* i *Propionibacterium acnes*, oraz grzybów *Candida albicans* [74], [75]. Działanie to wiąże się z zaburzeniem integralności błony komórkowej, hamowaniem biosyntezy białek oraz modulacją metabolizmu lipidowego drobnoustrojów. W rezultacie związki te mogą być stosowane w kosmetykach o działaniu oczyszczającym, przeciwtrądzikowym i przeciwłupieżowym, zapewniając jednocześnie efekt przeciwzapalny.

Badania dotyczące kostunolidu i laktonu dehydrokostusowego skupiały się na określeniu ich aktywności biologicznej przez działanie bezpośrednie na określony typ komórek, bez projektowania bardziej zaawansowanych systemów dostarczania leków. Prace badawcze w tym temacie mogą znacząco wpłynąć na ich potencjał aplikacyjny, zwłaszcza w przypadku produktów rozjaśniających przebarwienia, z którymi zmagają się osoby starsze, osoby w rejonach bardziej nasłonecznionych, a także w terapii zaburzeń hiperpigmentacyjnych.

4.3. Emulsje kosmetyczne

Emulsja to heterogeniczna mieszanina składająca się z co najmniej jednej niemieszającej się cieczy drobno zdyspergowanej w postaci kropelek, z których każda ma średnicę większą niż $0,1\ \mu\text{m}$. Dodanie elementów takich jak: emulgatory, drobno rozdrobnione cząstki (nanocząstki lub mikrocząstki), związki powierzchniowo czynne itp. mogą pomóc tym układom stać się bardziej stabilnymi. W 1972 r. IUPAC-IUB przedstawił definicję emulsji, która uchwyciła zrozumienie: "W emulsji kropelki cieczy i/lub ciekłe kryształy są rozproszone w cieczy". Mikro- i makroemulsje zostały zdefiniowane przez M. K. Sharme i D. O. Shah [76], którzy rozróżnili je na podstawie stabilności i wielkości.

Emulsje można podzielić na kategorie w oparciu o ich skład, wielkość zdyspergowanych kropelek i charakter ich stabilizacji. Każdy rodzaj emulsji charakteryzuje się unikalnymi cechami, które wpływają na ich zastosowanie. Biorąc pod uwagę średni rozmiar kropelek można wyróżnić: makroemulsje ($d_i > 1\ \mu\text{m}$), emulsje submikronowe ($0,1\ \mu\text{m} < d_i < 1\ \mu\text{m}$), mikroemulsje ($0,01 < d_i < 0,1\ \mu\text{m}$) [77], co przedstawiono na rys. 4.8, przy czym granice zakresów rozmiarów tych emulsji mogą się nieco różnić.



Rys. 4.8. Zakresy rozmiarów cząstek i kropli w różnych typach układów dyspersyjnych stosowanych w formułacjach kosmetycznych i farmaceutycznych

4.3.1. Rodzaje emulsji

Makroemulsje

Konwencjonalne emulsje składają się z kropelek oleju rozproszonych w wodzie (O/W) lub kropelek wody rozproszonych w oleju (W/O), stabilizowanych przez środki powierzchniowo czynne, które zmniejszają napięcie międzyfazowe między niemieszającymi się fazami, zapobiegając koalescencji kropelek [78]. Rozmiar kropli w konwencjonalnych emulsjach zazwyczaj waha się od $0,1$ do $100\ \mu\text{m}$, a na ich stabilność duży wpływ mają takie czynniki jak stężenie środka powierzchniowo czynnego, rozkład wielkości kropli oraz właściwości fizykochemiczne fazy rozproszonej i ciągłej [79]. Emulsje te są niestabilne termodynamicznie, niemniej jednak ich stabilność kinetyczna może zmieniać się w szerokim zakresie (np. niektóre emulsje nie rozdzielają się przez kilka lat).

W praktyce stabilność emulsji jest zapewniana przez wprowadzanie do dyspersji różnego rodzaju emulgatorów, które adsorbując się w warstwie powierzchniowej, zmniejszają napięcie lub tworzą barierę strukturalno-mechaniczną, która zapobiega zbliżaniu się kropeł do siebie [80].

Emulsje te są szeroko stosowane w produktach spożywczych, kosmetykach i farmaceutykach ze względu na ich zdolność do kapsułkowania i dostarczania zarówno związków hydrofobowych, jak i hydrofilowych. Dodatkowo należy wskazać, że szerokie zastosowanie w kosmetologii znajdują emulsje typu W/O. Stabilność kinetyczna rozcieńczonych tego typu emulsji jest proporcjonalna do lepkości ośrodka ciągłego i odwrotnie proporcjonalna do kwadratu promienia cząstek i odwrotnie proporcjonalna do kwadratu promienia cząstki, a w przypadku układów stężonych jest niewielka. Stabilność agregacyjna, tj. odporność na koagulację jest określona przez całkowitą energię interakcji kropli, która jest sumą energii odpychania podwójnych warstw elektrycznych i przyciągania van der Waalsa.

Emulsje Pickeringa

Emulsje Pickeringa są wyjątkowe, ponieważ są stabilizowane przez cząstki stałe, a nie tradycyjne środki powierzchniowo czynne [81]. Cząstki te adsorbują się na granicy faz olej-woda, tworząc mechaniczną barierę, która zapobiega koalescencji kropeł, prowadząc do wysoce stabilnych emulsji. Na stabilność i zachowanie emulsji Pickeringa znaczący wpływ ma rozmiar, kształt i właściwości powierzchniowe cząstek stabilizujących, które mogą być materiałami nieorganicznymi, takimi jak krzemionka, lub organicznymi, takimi jak celuloza [82].

Emulsje Pickeringa są coraz częściej badane pod kątem zastosowań w dostarczaniu leków, nauce o żywności i syntezie materiałów ze względu na ich bardzo dobrą stabilność i potencjał zmniejszenia zużycia środków powierzchniowo czynnych.

Wiele parametrów wpływa na wydajność emulsji Pickeringa. Zarówno jednorodna prędkość mieszania, jak i czas wpływają na wielkość kropli podczas przygotowywania emulsji. Udział objętościowy oleju ma znaczący wpływ na formę morfologiczną emulsji [83]. Stosunek objętościowy fazy olejowej do wodnej ma wpływ na strukturę emulsji, np. wartość pH fazy wodnej wpływa na ładunek powierzchniowy cząstek i rodzaj emulsji Pickeringa [84].

Emulsje wielokrotne

Emulsje wielokrotne to złożone układy, w których emulsje są zagnieżdżone w innych emulsjach, takich jak woda w oleju w wodzie (W/O/W) lub olej w wodzie w oleju (O/W/O). Systemy te pozwalają na enkapsulację i kontrolowane uwalnianie substancji, co czyni je cennymi w dostarczaniu leków, nauce o żywności i kosmetykach [85]. Jednak ich złożoność stanowi również poważne wyzwanie dla stabilności i charakterystyki, ponieważ emulsje te są wrażliwe na warunki środowiskowe, a utrzymanie stabilności zarówno wewnętrznych, jak i zewnętrznych powierzchni rozdziału faz wymaga starannego doboru środków powierzchniowo czynnych i stabilizatorów.

4.3.2. Stabilność i mechanizmy stabilizacji emulsji

Jednym z kluczowych parametrów decydujących o jakości i funkcjonalności emulsji jest jej stabilność. Oznacza ona zdolność układu do zachowania niezmiennych właściwości fizykochemicznych (takich jak średnia i rozkład wielkości kropeł, zawartość fazy rozproszonej czy lepkość) w czasie przechowywania, niezależnie od działania czynników zewnętrznych. Stabilność emulsji stanowi zatem podstawowy warunek jej przydatności użytkowej.

Trwałość układów zdyspergowanych zależy od wielu czynników fizykochemicznych, do których należą m.in.: napięcie międzyfazowe na granicy ciecz–ciecz, wielkość i dystrybucja kropeł fazy rozproszonej, rodzaj i ilość zastosowanego emulgatora lub ich mieszaniny, ciśnienia Laplace’a i osmotyczne, stosunek lepkości oraz gęstości faz, a także potencjał zeta i gęstość ładunku powierzchniowego. Na stabilność istotny wpływ mają również warunki środowiskowe, takie jak temperatura, pH czy obecność elektrolitów [86], [87].

Wybór emulgatorów do stabilizacji emulsji jest przeprowadzany przy użyciu półempirycznych skal równowagi hydrofilowo-lipofilowej (HLB, ang. *Hydrophilic-Lipophilic Balance*). Tabela 4.3 pokazuje wpływ rodzaju środka powierzchniowo czynnego, określonego przez charakterystyczną liczbę HLB, na rodzaj utworzonej emulsji. Wybierając środek powierzchniowo czynny o wymaganej liczbie HLB, zasadniczo możliwe jest tworzenie emulsji zarówno typu bezpośredniego (o/w), jak i odwrotnego (w/o). Aby ustabilizować wiele emulsji, zwykle stosuje się kombinację faz dwóch emulgatorów o różnych indeksach HLB. Należy jednak pamiętać, że takie zalecenia są przybliżone, ponieważ warunki tworzenia emulsji i specyficzna struktura chemiczna cząsteczki środka powierzchniowo czynnego mają ogromne znaczenie [88].

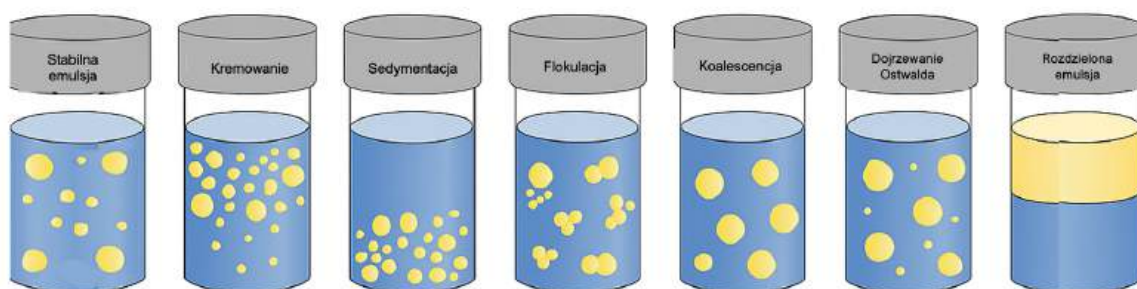
Tabela 4.3. Zależność pomiędzy wartością HLB a rozpuszczalnością emulgatora i typem tworzonej emulsji

HLB	Rozpuszczalność	Typ emulsji
0-4	Niedyspergowalny	W/O
~6	Niska dyspersja	
8	Niestabilna nieprzezroczysta dyspersja	środek zwilżający
10	Stabilna nieprzezroczysta dyspersja	O/W
12	Półprzezroczysty roztwór	
14-16	Przezroczysty roztwór	Solubilizatory i detergenty

W przypadku emulsji zarówno prostych, jak i wielokrotnych, obserwuje się te same procesy destabilizacji:

- migrację kropeł, prowadzącą do lokalnych zmian stężenia emulsji (sedymentacja, śmietankowanie),
- zmiany wielkości kropeł wskutek flokulacji, koalescencji lub fragmentacji,
- inwersję faz,
- transport masy w układzie, obejmujący procesy takie jak solubilizacja, starzenie Ostwalda czy tzw. *compositional ripening* (starzenie wynikające z obecności kilku składników w układzie).

Przykłady takich zachowań pokazano na rys. 4.9.



Rys. 4.9. Schematyczne przedstawienie głównych mechanizmów destabilizacji emulsji [89]

Mechanizmy destabilizacji mają szczególne znaczenie nie tylko podczas procesu wytwarzania emulsji, ale również w trakcie jej przechowywania i transportu, podczas których produkt może być narażony na zmiany temperatury (zamrażanie, ogrzewanie) czy odwodnienie. Ich konsekwencją może być całkowity rozdział faz [90].

Badania nad metodami poprawy stabilności emulsji oraz nad poznaniem mechanizmów ich destabilizacji prowadzone są intensywnie od wielu lat [91], [92]. Najczęściej stosowaną strategią stabilizacji jest wprowadzenie do układu odpowiednich związków pełniących funkcję stabilizatorów struktury, obok klasycznych emulgatorów redukujących napięcie międzyfazowe.

Aby przeciwdziałać procesom destabilizacji, stosuje się różnorodne podejścia:

1. Użycie mieszanin związków powierzchniowo czynnych o różnym charakterze (anionowym, kationowym, niejonowym lub amfoterycznym), co pozwala na uzyskanie synergicznego efektu stabilizującego.
2. Wzmacnianie granic międzyfazowych (wewnętrznej/membranowej oraz membranowej/zewnętrznej) poprzez dobór emulgatorów o zróżnicowanych wartościach HLB, co sprzyja stabilizacji mechanicznej układu.
3. Stabilizację elektrostatyczną, osiąganą przez zastosowanie emulgatorów anionowych w fazie przewodzącej, prowadzącą do powstania podwójnej warstwy elektrycznej, która zapobiega zlewaniu się kropeł poprzez ich wzajemne odpychanie.
4. Stabilizację steryczną, wynikającą z wprowadzenia do układu nierozpuszczalnych cząstek stałych (znacznie mniejszych niż średnica kropeł) lub polimerów amfifilowych, które tworzą przestrzenną barierę zapobiegającą koalescencji.

4.3.3. Charakterystyka rozkładu wielkości kropeł w układach rozproszonych

Układy zdyspergowane zazwyczaj charakteryzują się polidispersyjnością, czyli obecnością cząstek o zróżnicowanych rozmiarach. Oznacza to, że w emulsjach występuje szerokie spektrum średnic kropeł, a ich rozkład może przyjmować różne formy – od jednomodalnych i symetrycznych (rozkład normalny) lub niesymetrycznych (logarytmiczno-normalny), aż po silnie polidispersyjne układy o złożonej strukturze rozkładu [91]. Zazwyczaj jednak, po dłuższym czasie trwania procesu homogenizacji lub działania sił ścinających, układ dąży do osiągnięcia rozkładu jednomodalnego, co świadczy o ustabilizowaniu się procesu dyspersji.

W początkowych etapach emulgowania, gdy dominującym zjawiskiem jest koalescencja (czyli łączenie się mniejszych kropeł w większe przy niewielkich prędkościach ścinania i niskim udziale fazy rozproszonej), rozkład wielkości kropeł często ma charakter bimodalny. Pierwsze maksimum takiego rozkładu odpowiada populacji kropeł pierwotnych, natomiast drugie – większym kroplom powstałym w wyniku ich zlewania [94].

Obecnie w badaniach stosuje się analizator Mastersizer, który wykorzystuje zjawisko rozpraszania światła laserowego do określania rozkładu wielkości cząstek w badanej próbce. W trakcie pomiaru zawieszina cząstek przepływa przez skupioną wiązkę lasera, co powoduje, że każda cząstka wchodzi w interakcję z padającym światłem. Urządzenie wyposażone jest w źródła światła o długościach fal 488 nm i 633 nm, zestaw detektorów oraz układ dyspersyjny z pompką, mieszadłem i sondą ultradźwiękową, umożliwiającą rozbijanie aglomeratów. W wyniku tego oddziaływania cząstki rozpraszają światło pod różnymi kątami, a kąt rozproszenia zależy od ich rozmiaru – mniejsze cząstki rozpraszają światło pod większymi kątami, natomiast większe cząstki – pod mniejszymi. Układ optyczny analizatora, wyposażony w zestaw precyzyjnych detektorów fotometrycznych, rejestruje natężenie światła rozproszonego w różnych kierunkach. Zebrane dane są następnie przetwarzane przez oprogramowanie urządzenia, które – na podstawie teorii Mie (opisującej rozpraszanie światła przez cząstki o rozmiarach porównywalnych z długością fali) – oblicza rozkład wielkości cząstek w badanym układzie. Oprogramowanie analizuje rozkład intensywności światła według teorii Mie, dzięki czemu można określić frakcję cząstek w przedziale od 0,02 do 2000 μm [95].

Jednym z najistotniejszych parametrów określających właściwości użytkowe emulsji jest lepkość, definiowana jako opór wewnętrzny cieczy wobec przepływu warstw płynu względem siebie. W praktyce laboratoryjnej wykorzystuje się do jej pomiaru lepkościomierze rotacyjne (wiskozymetry), które umożliwiają szybkie i precyzyjne wyznaczanie lepkości dynamicznej badanych układów [96]. Zasada działania urządzenia polega na pomiarze momentu oporu, jaki ciecz stawia obracającemu się wrzecionu. Po umieszczeniu wrzeciona w próbce i uruchomieniu napędu elektrycznego, urządzenie rejestruje siłę oporu, a następnie przelicza ją na wartość lepkości, a wynik pojawia się bezpośrednio na wyświetlaczu urządzenia.

4.3.4. Zastosowanie emulsji w przemyśle kosmetycznym

W zależności od proporcji fazy rozproszonej oraz rodzaju emulsji, poszczególne preparaty mogą być przeznaczone do odmiennych zastosowań kosmetycznych. Zestawienie tych zależności przedstawiono w tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Zastosowanie różnych typów emulsji w formulacjach kosmetycznych w zależności od zawartości fazy rozproszonej

Rodzaj emulsji	Zawartość fazy rozproszonej	Przykładowe zastosowanie
O/W	poniżej 20–30% wag.	Emulsje olej w wodzie o niższej zawartości fazy rozproszonej są stosowane głównie w lekkich preparatach, takich jak kremy nawilżające, kremy pod makijaż, balsamy do ciała, maseczki, kremowe szampony, dezodoranty czy niektóre odżywki do włosów.
O/W	powyżej 20–30% wag.	Gęstsze emulsje O/W wykorzystuje się w kremach o uniwersalnym zastosowaniu, w produktach typu <i>cold cream</i> , kremach nocnych i pod oczy, a także w mleczkach kosmetycznych i wybranych odżywkach do włosów.
W/O	20–40% wag.	Emulsje typu woda w oleju, zawierające większy udział fazy tłuszczowej, stosowane są w bogatych kremach tłustych, ochronnych, nocnych, pod oczy, uniwersalnych, w preparatach do masażu oraz w mleczkach przeznaczonych do demakijażu.

4.4. Żele

Żele to półstałe układy stosowane miejscowo lub przezskórnio, zbudowane z ciekłej fazy unieruchomionej w matrycy polimerowej. Mają gładką konsystencję i przezroczysty lub półprzezroczysty wygląd, co ułatwia ich równomierne rozprowadzanie na dużych powierzchniach skóry.

W zależności od składu i rodzaju fazy ciekłej żele dzieli się na hydrożele, organożele i oleożele. Podstawowa różnica między oleożelami, hydrożelami i organożelami polega na rodzaju fazy ciekłej (olej, woda lub rozpuszczalnik organiczny) oraz użytych składnikach sieciujących. Różnice te determinują ich właściwości fizykochemiczne i zakres zastosowań w farmacji, kosmetologii i inżynierii biomateriałów [97].

4.4.1. Hydrożele

Hydrożele stanowią trójwymiarowe sieci polimerowe silnie uwodnione, zdolne do wchłaniania i zatrzymywania dużych ilości wody, przy jednoczesnym zachowaniu swojej struktury. Materiały te, zbudowane z hydrofilowych łańcuchów polimerowych, mogą występować jako żele koloidalne, w których woda pełni funkcję ośrodka dyspersyjnego [98]. Najczęściej przyjmuje się, że hydrożel to usieciowany polimer, który pęcznieje w wodzie, ale nie ulega jej rozpuszczeniu. Dzięki wysokiej zawartości wody oraz elastyczności zbliżonej do tkanek biologicznych, materiały te zyskały duże znaczenie w naukach biomedycznych, farmacji, kosmetologii i inżynierii materiałowej [99].

Zdolność do pochłaniania wody wynika z obecności grup hydrofilowych w strukturze polimeru, natomiast odporność na rozpuszczanie zapewniają wiązania sieciujące pomiędzy łańcuchami. Do grupy hydrożeli zalicza się zarówno materiały naturalne, jak i syntetyczne. W ostatnich dekadach obserwuje się stopniowe zastępowanie hydrożeli naturalnych syntetycznymi, które cechują się dłuższą trwałością, większą wytrzymałością mechaniczną i możliwością modyfikacji strukturalnej. Polimery syntetyczne posiadają dobrze określoną budowę, co umożliwia kontrolę nad ich biodegradowalnością i funkcjonalnością [100].

Hydrożele można podzielić według kilku kryteriów jak przedstawiono w tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Klasyfikacja hydrożeli według pochodzenia, składu, struktury i właściwości fizykochemicznych na podstawie [101], [102]

Kryterium podziału	Rodzaje	Opis / Przykłady
Pochodzenie	Naturalne	Kolagen, żelatyna, skrobia, alginian, agaroza
	Syntetyczne	Polimeryzowane chemicznie, o kontrolowanej strukturze
Skład polimerowy	Homopolimerowe	Z jednego monomeru; różny stopień usieciowania
	Kopolimerowe	Dwa lub więcej monomerów; struktura blokowa/losowa
	IPN / pół-IPN	Dwie przenikające się sieci (pełne lub częściowe)
Struktura fizyczna	Amorficzne	Bez uporządkowania krystalicznego
	Półkrystaliczne	Obszary krystaliczne + amorficzne
	Krystaliczne	Regularna struktura przestrzenna
Rodzaj usieciowania	Chemiczne	Trwałe wiązania kowalencyjne
	Fizyczne	Oddziaływania jonowe, wodorowe, hydrofobowe
Ładunek elektryczny	Niejonowe	Brak ładunku
	Jonowe	Zawierają grupy kationowe lub anionowe
	Amfolytyczne	Zawierają grupy kwasowe i zasadowe
	Zwitterjonowe	Każda jednostka ma ładunek + i –

Współczesne definicje opisują hydrożele jako układy wieloskładnikowe składające się z trójwymiarowej sieci polimerowej i wody wypełniającej przestrzeń między makrocząsteczkami. Ilość zatrzymanej wody zależy od rodzaju polimeru, gęstości usieciowania oraz charakteru wiązań sieciowych. W stanie spęczniałym zawartość wody w hydrożelu może przewyższać masę suchego polimeru wielokrotnie.

Hydrożele mogą być syntetyzowane różnymi metodami chemicznymi. Najczęściej stosuje się reakcje polimeryzacji i jednoczesnego sieciowania monomerów wielofunkcyjnych lub procesy wieloetapowe, w których najpierw wytwarza się polimer z aktywnymi grupami funkcyjnymi, a następnie poddaje się go usieciowaniu. Dzięki temu można kontrolować takie właściwości, jak gęstość sieci, biodegradowalność, elastyczność czy reakcja na bodźce chemiczne i biologiczne [103].

W zależności od rodzaju hydrożelu, poszczególne preparaty mogą być przeznaczone do odmiennych zastosowań kosmetycznych. Zestawienie tych zależności przedstawiono w tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Zastosowanie różnych typów hydrożeli w formulacjach kosmetycznych na podstawie [104], [105], [106]

Rodzaj hydrożelu	Mechanizm działania	Przykładowe zastosowanie
Hydrożele naturalne	Tworzą elastyczne sieci o dużej zdolności wiązania wody; poprawiają nawilżenie i elastyczność skóry	Żele nawilżające, maski hydrożelowe, preparaty po opalaniu, kosmetyki regenerujące
Hydrożele syntetyczne	Stabilne sieci polimerowe o kontrolowanej lepkości i uwalnianiu substancji aktywnych	Żele utrwalające włosy, preparaty ochronne, dermokosmetyki z substancjami czynnymi
Hydrożele hybrydowe (kompozytowe)	Synergiczne połączenie właściwości naturalnych i syntetycznych; poprawa stabilności i komfortu aplikacji	Maski biocelulozowe, żele liftingujące, preparaty przeciwstarzeniowe
Hydrożele fizycznie usieciowane	Rewersyjne oddziaływania wodorowe i jonowe; reagują na zmiany środowiskowe	„Inteligentne” żele w kremach aktywowanych ciepłem skóry, systemy chłodzące
Hydrożele chemicznie usieciowane	Trwała, stabilna sieć o wysokiej odporności na temperaturę i starzenie	Plastry kosmetyczne, opatrunki hydrożelowe, maski regenerujące
Hydrożele nanokompozytowe	Zawierają nanocząstki aktywne o działaniu przeciwbakteryjnym i fotoprotekcyjnym	Kosmetyki ochronne, przeciwtrądzikowe, fotoprotekcyjne i przeciwstarzeniowe
Hydrożele termoczułe i pH-czułe	Odwracalna zmiana stanu (żół-żel) pod wpływem temperatury lub pH skóry	Żele pielęgnacyjne aktywujące się w kontakcie z ciałem, preparaty do skóry wrażliwej

4.4.2. Oleożele

Oleożele to półstałe lipidy otrzymywane w wyniku przekształcenia ciekłych olejów w struktury żelowe, bez konieczności ich chemicznej modyfikacji czy uwodornienia. Proces ten polega na rozproszeniu niewielkiej ilości substancji strukturotwórczych (oleożelatorów) w ciekłym oleju, co prowadzi do powstania fazy o konsystencji żelu [107]. Technologia ta umożliwia szerokie wykorzystanie olejów roślinnych bogatych w nienasycone kwasy tłuszczowe przy jednoczesnym zachowaniu fizycznych i funkcjonalnych właściwości tłuszczów stałych. Co więcej, oleożele wykazują doskonałą zdolność do przenoszenia i stabilizowania substancji bioaktywnych, które mogą być w nich zamknięte w uporządkowanej matrycy lipidowej. Dzięki temu chronią one delikatne związki przed degradacją w trakcie produkcji,

przechowywania, a także w procesie uwalniania [108]. Oleożele można podzielić według kilku kryteriów jak przedstawiono w poniższej tabeli 4.7.

Tabela 4.7. Klasyfikacja oleożeli według użytego oleożelatora, mechanizmu tworzenia żelu i sposobu otrzymywania na podstawie [109], [110], [111]

Kryterium podziału	Rodzaje	Opis
Rodzaj oleożelatora	Woski naturalne	Tworzą sztywne sieci, wysoka zdolność wiązania oleju, stabilne w szerokim zakresie T
	Monoglicerydy i diglicerydy	Dobra stabilność termiczna i reologiczna, łatwe przetwarzanie
	Etyloceluloza	Termoodwracalne żele, duża elastyczność, wysoka odporność mechaniczna
	Sterole i fitosterole	Biokompatybilne, bioaktywne, ograniczona twardość
	Krzemionka koloidalna	Nieorganiczny żelator fizyczny, wysoka stabilność termiczna i reologiczna, dobra przezroczystość układów
	Białka i polipeptydy	Dobra biokompatybilność, słaba odporność cieplna
Mechanizm tworzenia żelu	Krystalizacja lipidów	Sieci stabilne, ale zależne od tempa chłodzenia
	Samoporządkowanie supramolekularne	Elastyczne, odwracalne struktury, wrażliwe na temperaturę
	Usieciowanie polimerowe	Wysoka wytrzymałość i stabilność długoterminowa
	Sieciowanie cząstek nieorganicznych	Powstaje trójwymiarowy szkielet fizyczny; brak krystalizacji, wysoka stabilność termiczna i przezroczystość
Sposób otrzymywania	Metoda bezpośrednia	Ogrzewanie oleju z żelatorem i kontrolowane chłodzenie
	Metoda pośrednia	Tworzenie żelu z emulsji lub hydrożelu i usunięcie fazy wodnej

Zastosowanie oleożeli wzbogaconych w bioaktywne składniki umożliwia opracowanie zdrowszych produktów spożywczych, które wspierają ogólną kondycję organizmu i mogą przyczyniać się do profilaktyki chorób cywilizacyjnych.

Dzięki swojej specyficznej budowie oraz właściwościom lipofilowym oleożele mogą znacząco zwiększać wchłanianie substancji czynnych przez skórę i poprawiać ich biodostępność. W porównaniu z tradycyjnymi zawiesinami lub żelami, formułacje oleożelowe potrafią zwiększyć przyswajalność leków hydrofobowych nawet ponad czterokrotnie. Przykładowo, w badaniu nad olmesartanem medoksomilu (OLM), po

24 godzinach uwolnienie substancji z zawiesiny i żelu wynosiło odpowiednio 23,75% i 20,11%, podczas gdy z formułacji oleożelowej – aż 100%. Tak wysoka efektywność wynikała z działania składników żelu, m.in. surfaktantów i oleju lawendowego, które zwiększały rozpuszczalność substancji czynnej [112].

W zależności od rodzaju oleożelu, poszczególne preparaty mogą być przeznaczone do odmiennych zastosowań kosmetycznych i farmaceutycznych. Zestawienie tych zależności przedstawiono w tabeli 4.8.

Tabela 4.8. Zastosowanie typów oleożeli w formułacjach kosmetycznych na podstawie [113]

Rodzaj oleożelu	Mechanizm działania	Przykładowe zastosowanie
Oleożele woskowe	Struktura tworzona przez krystalizację naturalnych wosków (np. pszczelego, kandelilowego, karnauba). Zwiększają lepkość fazy olejowej i nadają stabilność mechaniczną	Pomadki ochronne, balsamy do ust, maści, kremy barierowe, preparaty ochronne dla skóry suchej i popękanej
Oleożele na bazie kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych	Samoodrganizacja cząsteczek w struktury włókniste lub krystaliczne; tworzą termoodwracalne sieci żelowe	Kremy odżywcze, emulsje bezwodne, podkłady, szminki, preparaty ochronne UV
Oleożele krzemionkowe	Sieciowanie fizyczne przez oddziaływania van der Waalsa między cząstkami SiO ₂ w oleju; tworzenie przestrzennej struktury retencyjnej dla lipidów	Żele transdermalne, maści lecznicze, żele przeciwzapalne, systemy kontrolowanego uwalniania leków lipofilowych
Oleożele polimerowe	Polimery rozpuszczalne w olejach (np. poliizobutylen, polietylen, poliakrylany) tworzą trójwymiarową sieć usieciowaną	Maści dermatologiczne, żele analgetyczne, systemy przenoszenia substancji czynnych w formułacjach transdermalnych
Oleożele oparte na surfaktantach i ko-surfaktantach	Tworzenie struktury żelowej w wyniku samoodrganizacji micelarnej i solubilizacji w układach olejowych	Kremy lekkie bez wody, preparaty przeciwtrądzikowe, kosmetyki z witaminami lipofilowymi (A, E)
Oleożele z biopolimerami	Tworzenie sieci przez wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe między łańcuchami biopolimeru a lipidami	Naturalne kosmetyki typu „clean beauty”, maski lipidowe, emulsje z olejami roślinnymi, maści ziołowe
Oleożele nanokompozytowe	Struktura wzmacniana przez nanocząstki (np. Ag, ZnO, TiO ₂ , liposomy); poprawa stabilności, aktywności biologicznej i ochrony przed UV	Kremy przeciwsłoneczne, preparaty przeciwzapalne, kosmetyki o działaniu przeciwstarzeniowym i antybakteryjnym

4.6. Badanie uwalniania substancji aktywnych z emulsji i żeli

Bardzo istotną cechą formulacji kosmetycznej jest możliwość wykorzystania ich struktury do zamykania substancji aktywnych (jednej lub kilku różnych, czystych lub w nanocząstkach lipidowych), w każdej z faz formulacji lub w fazach wybranych, a następnie ich uwalniania w miejscu działania. Szybkość i charakter procesu uwalniania zależą też od tego, w której fazie lub fazach znajduje się substancja stabilizująca (lipofilowe surfaktanty używane w fazie olejowej, a hydrofilowe w fazie wodnej) lub mieszanina różnych stabilizatorów, a także ich wzajemne oddziaływania [114].

Skuteczność przenikania substancji przez barierę skórną zależy od wielu zmiennych, zarówno biologicznych, jak i chemiczno-fizycznych. Do najważniejszych należą: stan i kondycja skóry, właściwości fizykochemiczne związku aktywnego, rodzaj użytego nośnika lub podłoża dermatologicznego, a także obecność substancji wspomagających przenikanie. Proces ten może być dodatkowo modyfikowany metodami fizykalnymi (opisanymi już wcześniej), które zwiększają przepuszczalność skóry i ułatwiają transport aktywnych składników. W przypadku kosmetyków dąży się zwykle do ograniczenia wchłaniania składników czynnych wyłącznie do powierzchniowych warstw naskórka, gdyż ich zadaniem jest przede wszystkim pielęgnacja i ochrona skóry, a nie działanie ogólnoustrojowe. Substancje mogą wówczas adsorbować się na powierzchni skóry, głównie w warstwie rogowej. Jeśli jednak cząsteczki przenikają biernie w głąb naskórka, mamy do czynienia z procesem absorpcji, natomiast ich dotarcie do skóry właściwej określa się mianem penetracji.

W celu oceny procesu uwalniania substancji aktywnych z emulsji i żeli wykorzystuje się zarówno metody *in vitro*, jak i *ex vivo*, które pozwalają na ilościowe określenie dynamiki dyfuzji składników czynnych z formulacji do środowiska zewnętrznego. Najczęściej stosowaną techniką jest metoda dyfuzji przez membranę z wykorzystaniem aparatu łopatkowego (tzw. metoda dyfuzji pionowej) [115]. Układ taki składa się z komory donorowej, w której umieszcza się badaną formulację, oraz komory akceptorowej wypełnionej medium o właściwościach zbliżonych do płynu międzykomórkowego. Pomiedzy nimi znajduje się membrana półprzepuszczalna (z celulozy regenerowanej, poli(tetrafluoroetyleny) lub błon biologicznych). W ustalonych odstępach czasu pobiera się próbki z fazy akceptorowej i analizuje je metodami spektrofotometrycznymi lub chromatograficznymi, najczęściej przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, ang. *High-Performance Liquid Chromatography*). Umożliwia to określenie szybkości uwalniania, całkowitej ilości dyfundującej substancji oraz opracowanie profili kinetycznych. W badaniach pomocniczych stosuje się również testy membran syntetycznych o różnym stopniu przepuszczalności, które pozwalają symulować zachowanie substancji w różnych warunkach środowiskowych. Dodatkowo, coraz częściej wykorzystuje się techniki zautomatyzowane, umożliwiające ciągły pomiar uwalniania w czasie rzeczywistym, co pozwala na lepszą ocenę mechanizmu dyfuzji i wpływu struktury formulacji na biodostępność składników aktywnych.

4.7. Antyoksydacyjne właściwości substancji aktywnych

Reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*) i inne wolne rodniki powstają nieustannie w skórze pod wpływem metabolizmu mitochondrialnego, promieniowania UV, zanieczyszczeń powietrza i dymu tytoniowego. Nadmiar ROS inicjuje peroksydację lipidów błonowych, utlenianie białek i uszkodzenia DNA, co skutkuje fotostarzeniem, zaburzeniami bariery naskórkowej, przebarwieniami i przewlekłym stanem zapalnym skóry [116], [117]. W kontekście dermokosmetyków oznacza to, że antyoksydanty są jedną z nielicznych klas substancji aktywnych, dla których istnieje dobrze udokumentowany mechanizm działania i korelacja z efektami klinicznymi: zmniejszenie rumienia po UV, spadek markerów stresu oksydacyjnego, poprawa jednolitości kolorytu i elastyczności skóry [118].

Mechanistycznie przeciwutleniacze działają poprzez:

- przechwytywanie rodników (donacja atomu wodoru lub elektronu),
- chelatowanie metali przejściowych katalizujących reakcje Fentona,
- wygaszanie tlenu singletowego
- indukcję endogennych szlaków obronnych, głównie Nrf2/Keap1 (HO-1, NQO1, GSH).

W kosmetykach dobór antyoksydantu musi uwzględniać hydro- i lipofilowość formulacji, stabilność (pod względem światła, tlenu i pH), zgodność z nośnikiem (emulsje, liposomy, SLN/NLC, nanoemulsje) oraz bezpieczeństwo. Zwykle łączy się mieszanki antyoksydantów, aby wykorzystać synergię działania i regenerację form zredukowanych [119].

W przemyśle kosmetycznym potrzebujemy szybkich metod do:

- screeningu składnika kosmetycznego (poziom składnika, surowiec roślinny, ekstrakt),
- porównywania form (wolna substancja a w formie enkapsulowanej),
- monitoringu stabilności (utlenianie w czasie przechowywania),
- uzasadnienia deklaracji (wspierających badania *ex vivo/in vivo*).

Ponieważ testy komórkowe i badania kliniczne są kosztowne, testy chemiczne *in vitro* stanowią pierwszy, niezbędny etap oceny potencjału przeciwutleniającego. Opierają się one na dwóch dominujących mechanizmach: przeniesienia atomu wodoru (HAT, ang. *Hydrogen Atom Transfer*) oraz przeniesienia pojedynczego elektronu (SET, ang. *Single Electron Transfer*) [120].

Najczęściej stosowane testy chemiczne (HAT/SET) w kosmetologii:

- Test z rodnikiem DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) należy do najbardziej klasycznych i prostych metod oznaczania właściwości antyoksydacyjnych. Mechanizm reakcji opiera się głównie na mechanizmie SET, a częściowo także na HAT. Stabilny rodnik DPPH• o barwie purpurowej (maksimum absorpcji 517 nm) ulega redukcji po reakcji z przeciwutleniaczem, co prowadzi do odbarwienia roztworu i spadku absorbancji. Stopień odbarwienia jest wprost proporcjonalny do zdolności badanej substancji do neutralizacji wolnych rodników [121].

Zaletą tej metody jest prostota, niski koszt i możliwość analizy szerokiego zakresu związków, zarówno syntetycznych, jak i pochodzenia naturalnego. Wadą natomiast jest użycie organicznych rozpuszczalników (np. metanolu, etanolu), które nie odzwierciedlają warunków fizjologicznych oraz ograniczona czułość wobec związków hydrofilowych [122].

- Test ABTS (2,2'-azyno-bis(3-etylo-benzotiazolino-6-sulfonian)) jest jedną z najbardziej uniwersalnych metod oznaczania aktywności antyoksydacyjnej, działającą zarówno w środowisku wodnym, jak i organicznym. Mechanizm reakcji opiera się na redukcji kationorodnika ABTS^{•+}, otrzymanego w wyniku utlenienia ABTS nadsiarczanem potasu. Zmiana barwy roztworu z zielononiebieskiej na bezbarwną mierzona jest spektrofotometrycznie przy 734 nm. W przeciwieństwie do testu DPPH, metoda ABTS może być stosowana do związków zarówno hydrofilowych, jak i lipofilowych, co czyni ją szczególnie użyteczną w badaniach kosmetyków i ekstraktów roślinnych [123], [124].

Zaletą testu jest jego uniwersalność, wysoka powtarzalność i możliwość standaryzacji, jednak wadą pozostaje długi czas przygotowania roztworu i jego ograniczona stabilność. W praktyce kosmetologicznej metoda ABTS jest szeroko stosowana do oceny potencjału przeciwutleniającego ekstraktów roślinnych i surowców stosowanych w kremach oraz preparatach przeciwstarzeniowych.

- Test siły przeciwutleniającej redukcji żelaza (FRAP, ang. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) opiera się na zdolności przeciwutleniaczy do redukcji kompleksu jonów żelaza(III)–TPTZ (2,4,6-tri(2-pirydylo)-s-triazyna) do formy żelaza(II)–TPTZ o intensywnie niebieskiej barwie. Mechanizm reakcji jest typowym przykładem mechanizmu SET, a pomiar prowadzony jest przy długości fali 593 nm w kwaśnym środowisku (pH ≈ 3,6). Test pozwala ocenić zdolność badanych substancji do oddawania elektronów i określenia ich potencjału redukcyjnego [125].

Metoda charakteryzuje się wysoką czułością i prostotą, dlatego znajduje zastosowanie zarówno w analizie ekstraktów roślinnych, jak i w ocenie aktywności antyoksydacyjnej gotowych formułacji kosmetycznych. W kontekście preparatów do pielęgnacji skóry, wyniki FRAP często korelują z zawartością związków fenolowych i polifenolowych o właściwościach stabilizujących emulsje lipidowe [126].

- Metoda Folina–Ciocâlțu (F-C) służy do oznaczania całkowitej zawartości związków fenolowych (TPC, ang. *Total Phenolic Content*), które odpowiadają za dużą część aktywności przeciwutleniającej ekstraktów roślinnych i surowców kosmetycznych. Zasada metody opiera się na redukcji kompleksów molibdenowo–wolframowych w odczynniku F–C przez fenole w środowisku zasadowym, co prowadzi do powstania intensywnie niebieskiego roztworu o maksimum absorpcji przy 765 nm [127], [128].

Choć metoda F-C nie mierzy bezpośrednio aktywności antyoksydacyjnej, pozwala na określenie potencjału przeciwutleniającego pośrednio poprzez zawartość związków fenolowych. W kosmologii znajduje zastosowanie do standaryzacji ekstraktów roślinnych i surowców naturalnych, które stanowią składniki preparatów o działaniu ochronnym i przeciwstarzeniowym.

Wyniki uzyskane metodami DPPH, ABTS i FRAP wyraża się zazwyczaj w ekwiwalentach troloksu (TEAC, ang. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), natomiast w teście Folina–Ciocâlteu – w ekwiwalentach kwasu galusowego (GAE, ang. *Galic Acid Equivalent*). Wysoka wartość TEAC oznacza większą zdolność neutralizacji wolnych rodników i większy potencjał aplikacyjny substancji w kosmetykach przeciwstarzeniowych i ochronnych [118].

W badaniach klinicznych i *ex vivo* wykazano, że miejscowe antyoksydanty:

- zmniejszają rumień posłoneczny i markery uszkodzeń oksydacyjnych,
- wspierają barierę naskórkową (ochrona lipidów SC przed peroksydacją),
- poprawiają jednorodność kolorytu (mniejsza oksydacja melaniny i stan zapalny),
- działają synergistycznie z filtrami UV, przechwytyjąc wolne rodniki generowane przez promieniowanie oraz z retinoidami, łagodząc oksydacyjny komponent podrażnienia [3,5].

W dokumentacji R&D i podparciu twierdzeń marketingowych przydatny jest pakiet dowodowy: testy chemiczne (ABTS/DPPH/FRAP) oraz testy komórkowe (ROS, Nrf2), a także badania instrumentalne na skórze.

Podsumowując, wszystkie metody pomiaru zdolności antyoksydacyjnej, w tym testy DPPH, ABTS, Folina-Ciocâlteu oraz FRAP oceniają właściwości neutralizacyjne różnych substancji w potencjalnych surowcach kosmetycznych. Każda z tych metod charakteryzuje się swoimi zaletami i ograniczeniami, związanymi z pH, temperaturą i specyficznością. Należy wskazać na znaczenie kompleksowej oceny aktywności antyoksydacyjnej dla lepszego zrozumienia mechanizmów starzenia skóry oraz dla rozwoju skutecznych strategii przeciwdziałających tym procesom [129].

4.8. Badania biofizycznych parametrów skóry

W diagnostyce stanu skóry człowieka stale poszukuje się skutecznych i powtarzalnych metod umożliwiających ocenę jej podstawowych parametrów fizjologicznych. Stosowane techniki pomiarowe pozwalają nie tylko określić typ skóry, ale także ocenić wpływ stosowanych preparatów kosmetycznych. Badania te są niezbędnym elementem procesu dopuszczania nowych receptur do obrotu – każdy produkt kosmetyczny musi zostać przebadany pod kątem skuteczności działania oraz bezpieczeństwa użytkowania [130]. Testy prowadzi się na grupach ochotników, w ściśle określonym przedziale czasu oraz na wybranym fragmencie skóry, co umożliwia porównanie wyników przed i po aplikacji kosmetyku.

Pomiary parametrów biofizycznych związanych z funkcją bariery skórnej są prowadzone za pomocą nieinwazyjnych narzędzi [131] wymienione na rys. 4.10.

CORNEOMETER® CM 825 –
korneometr



TEWAMETER® TM 300 – tewametr



MEXAMETER MX® 18 – meksametr



SKIN-COLORIMETER® CL 400 –
kolorymetr



VISIOLINE® VL 650



VISIOSCAN® VC 98 USB



Rys. 4.10. Przedstawione metody badania parametrów skóry firmy Courage-Khazaka GmbH[131]

4.8.1. Analiza nawilżenia skóry

Stopień nawilżenia skóry stanowi kluczowy czynnik determinujący jej właściwości fizyczne, mechaniczne i estetyczne. Na proces utrzymania odpowiedniej zawartości wody w skórze wpływają przede wszystkim naskórek oraz skóra właściwa, których struktura i funkcje są ze sobą ściśle powiązane [132].

Poziom nawilżenia warunkują takie elementy, jak płaszcz wodno-lipidowy, naturalny czynnik nawilżający (NMF, ang. *Natural Moisturizing Factor*) oraz ogólny stan bariery naskórkowej. Choć stosowanie kosmetyków nawilżających wspomaga utrzymanie odpowiedniej wilgotności skóry, nie jest to działanie wystarczające — równie istotne jest odpowiednie nawodnienie organizmu od wewnątrz, przy czym przeciętne zapotrzebowanie dorosłego człowieka wynosi około 1,5 litra wody dziennie. Odpowiednie uwodnienie skóry nie tylko zapewnia jej elastyczność i zdrowy wygląd, ale również umożliwia prawidłowy przebieg wielu reakcji biochemicznych zachodzących w tkankach, w tym procesów enzymatycznych wymagających środowiska wodnego [130].

Za utrzymanie właściwego poziomu nawilżenia w warstwie rogowej naskórka odpowiada NMF — kompleks substancji higroskopijnych, które wiążą i zatrzymują wodę. NMF występuje wyłącznie w warstwie rogowej i stanowi mieszaninę związków takich jak: aminokwasy (ok. 40%), kwas piroglutaminowy i jego sole (ok. 12%), mocznik (ok. 7%), amoniak, kwas moczowy, glukozamina, kreatynina (ok. 1,5%) oraz sole kwasów organicznych (mlekowego, cytrynowego, mrówkowego). Związki te powstają w wyniku rozpadu białka filagryny, syntetyzowanej w warstwie ziarnistej naskórka. Produkcja NMF jest procesem zależnym od wilgotności względnej środowiska — jego synteza nasila się w warunkach wysokiej wilgotności, natomiast może być ograniczona przez działanie promieniowania UV oraz środków powierzchniowo czynnych, które uszkadzają barierę lipidową skóry [130].

Drugim kluczowym elementem odpowiadającym za utrzymanie nawilżenia skóry jest bariera lipidowa, stanowiąca swoiste „spoiwo międzykomórkowe” (cement lipidowy) pomiędzy korneocytami. Jeśli zawartość NMF jest obniżona, a cement lipidowy ulega rozluźnieniu, dochodzi do wzrostu TEWL, czyli zwiększonego parowania wody z powierzchni skóry. W efekcie dochodzi do odwodnienia naskórka, co objawia się jego szorstkością, ściągnięciem i utratą elastyczności [133]. Dobór odpowiedniego nośnika kosmetycznego ma znaczenie dla skuteczności penetracji: w przypadku skóry tłustej lepiej sprawdzają się hydrożele i roztwory wodne, natomiast dla skóry suchej — emulsje i oleje.

Corneometer® CM 825 służy do pomiaru poziomu nawilżenia w obrębie warstwy rogowej naskórka. Zasada działania urządzenia opiera się na pomiarze zmian pojemności elektrycznej wynikających z zawartości wody w skórze. Wraz ze wzrostem uwodnienia maleje opór elektryczny, a rośnie przewodnictwo [134]. Wyniki przedstawiane są w jednostkach względnych — wyższe wartości odpowiadają lepszemu nawilżeniu skóry, proponowane interpretacje wyników dotyczące stanu skóry przedstawiono w tabeli 4.9. Na poprawność pomiaru wpływa wiele czynników, m.in. czystość i przygotowanie badanego miejsca. Obecność makijażu, resztek kremów czy silikonowych filmów ochronnych może zaniżać

wartości pomiarowe. Korneometr wykorzystuje się przede wszystkim do oceny różnicy stopnia nawilżenia skóry przed i po zastosowaniu preparatu kosmetycznego. Zaletą urządzenia jest łatwa obsługa, nieinwazyjność oraz niskie koszty eksploatacji [135].

Tabela 4.9. Propozycja producenta interpretacji wyników korneometru dla skóry w normalnych warunkach (20°C i 40-60% wilgotności powietrza) [131].

Wewnętrzna strona przedramienia [j.u]	Interpretacja wyników
< 30	Skóra bardzo sucha
30 – 40	Skóra sucha
> 40	Skóra wystarczająco nawilżona

Tewameter® TM 300 umożliwia określenie intensywności parowania wody z powierzchni skóry, czyli tzw. transepidermalnej utraty wody (TEWL). Parametr ten odzwierciedla szczelność bariery naskórkowej i stan jej funkcjonalności [136].

Urządzenie składa się z cylindrycznej sondy wyposażonej w dwa czujniki – higrometr i termometr – mierzące odpowiednio wilgotność i temperaturę powietrza. Na podstawie różnicy tych wartości program wylicza poziom TEWL. Wysokie wartości świadczą o osłabionej barierze skórnej, często towarzyszącej stanom zapalnym lub przesuszeniu skóry. Pomiaru powinny być wykonywane w stabilnych warunkach laboratoryjnych – zmiany temperatury, wilgotności czy wcześniejszy wysiłek fizyczny mogą istotnie wpłynąć na wynik. U osób starszych lub z uszkodzonym naskórkiem obserwuje się zwykle wyższe wartości TEWL, co wskazuje na obniżoną zdolność skóry do zatrzymywania wody [137]. Proponowane interpretacje wyników dotyczące stanu skóry przedstawiono w tabeli 4.10.

Zaletami pomiaru w otwartej komorze jest to, że metoda ta nie wymaga długiego czasu oczekiwania na wyniki, pozwala na ciągłą ocenę TEWL bez wpływania na powierzchnię skóry, mały rozmiar głowicy niweluje wpływ ruchu powietrza wewnątrz sondy, a także ułatwia użytkowanie przyrządu, a kalibracja jest łatwa do wykonania w każdym momencie [138].

Tabela 4.10. Propozycja interpretacji wyników tewametu w jednostkach umownych dla zdrowej skóry w normalnych warunkach (20°C i 40-60% wilgotności powietrza) [131]

Wartość TEWL [g/h/m²]	Interpretacja wyników
0-10	Skóra w stanie bardzo dobrym
10-15	Skóra w stanie dobrym
15-25	Skóra w stanie w normie
25-30	Skóra w stanie pogorszonym
Powyżej 30	Skóra w stanie krytycznym

4.8.2. Analiza kolorytu skóry

Mexameter® MX 18 umożliwia szybki i precyzyjny pomiar dwóch kluczowych parametrów wpływających na koloryt skóry – poziomu melaniny oraz stopnia zaczerwienienia. Działanie urządzenia opiera się na zasadzie absorpcji światła. Sonda emituje promieniowanie o trzech określonych długościach fali, a odbiornik rejestruje ilość światła odbitego od powierzchni skóry. Na podstawie uzyskanych danych fotodetektor oblicza zawartość pigmentu melaninowego oraz stopień zaczerwienienia wynikający z obecności hemoglobiny [139]. Urządzenie jest szeroko stosowane w badaniach dermatologicznych i kosmetycznych, m.in. do oceny reakcji skóry na kosmetyki, w testach klinicznych dotyczących alergii, w diagnostyce czerniaka, a także do analizy koloru blizn.

Promieniowanie w zakresie 568 nm odpowiada za ocenę stopnia zaczerwienienia (związanej z obecnością oksyhemoglobiny), natomiast długości 660 nm i 880 nm służą do określenia poziomu melaniny w naskórku. Wyniki przedstawiane są w postaci dwóch niezależnych wskaźników – zawartości melaniny oraz stopnia zaczerwienienia, które pozwalają na ilościowe określenie intensywności jej pigmentacji.

Skin-Colorimeter® CL 400 służy do pomiaru barwy skóry z wykorzystaniem technologii odbicia światła. Wyniki rejestrowane są w systemie xyz, a następnie przeliczane na standardowe wartości L^* a^* b^* oraz RGB, co umożliwia obiektywną ocenę zmian kolorytu skóry. Sonda urządzenia emituje jednolite, białe światło LED, które rozprasza się równomiernie na powierzchni skóry. Zebrane odbite światło analizowane jest przez czujnik RGB, co pozwala określić stopień jasności, nasycenia i barwy. Najczęściej stosowanym systemem opisu barwy w dermatologii i kosmetyce jest przestrzeń barw CIE $L^*a^*b^*$, w której:

- L^* oznacza jasność skóry (oś czarno-biała); wyższa wartość L^* odpowiada jaśniejszej cerze,
- a^* odnosi się do osi zielono-czerwonej i jest wskaźnikiem rumienia (im wyższa wartość a^* , tym większy stopień przekrwienia skóry),
- b^* opisuje oś niebiesko-żółtą i najczęściej wiązana jest z poziomem pigmentacji skóry (melaniny).

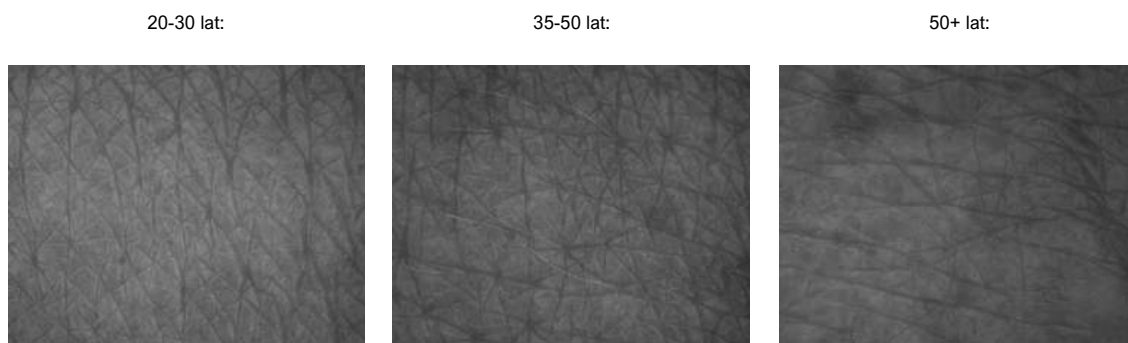
Kolorymetr znajduje zastosowanie w ocenie skuteczności produktów kosmetycznych – zwłaszcza kremów przeciwsłonecznych, samoopalaczy, preparatów rozjaśniających i makijażowych. W dermatologii wykorzystywany jest do monitorowania plam pigmentacyjnych, przebarwień posłonecznych oraz zmian chorobowych skóry [140].

4.8.3. Analiza topografii skóry

Visioscan® VC 98 to urządzenie pozwalające ocenić mikrostrukturę powierzchni naskórka, w tym gładkość, suchość i głębokość zmarszczek. Pomiar odbywa się przy użyciu miniaturowej wysokorozdzielczej kamery wideo przeznaczonej do bezpośredniego obrazowania powierzchni skóry. Uzyskany obraz przenoszony jest na monitor komputera, gdzie analizuje się morfologię powierzchni skóry w wysokiej rozdzielczości. Visioscan® VC 98 to urządzenie stosowane, w szczególności do

oznaczania poziomu suchości i gładkości skóry. Urządzenie rejestruje czarno-białe obrazy o dużej precyzji, a równomierne oświetlenie badanego obszaru zapewnia pierścieniowa świetlówka UVA umieszczona wokół obiektywu [141].

Linie skórne pojawiające się na powierzchni skóry można sklasyfikować jako pierwotne lub drugorzędne. Tworzą one na powierzchni skóry strukturę podobną do sieci – linie mogą łączyć się w trójkąty, kwadraty lub inne wielokąty. Można zaobserwować na rys. 4.11, że linie pierwotne i drugorzędne są bardziej gęste w młodszym wieku, co skutkuje większą liczbą zamkniętych wielokątów, zaś wiekiem liczba powstałych wielokątów zmniejsza się [142].



Rys. 4.11. Obrazy skóry ochotników należących do różnych grup wiekowych

Podczas badania topografii skóry analizowana jest tzw. powierzchnia żywej skóry (SELS, ang. *Surface Evaluation of Living Skin*), w której skład wchodzi takie parametry jak: zmarszczki (SEw), szorstkość (SEr), gładkość (SEsm) i złuszczenie (SEsc) [143], [144] opisane poniżej:

- SEr nazywany szorstkością to parametr opisujący stosunek ilości ciemnych pikseli będących poza progiem w stosunku do całego obrazu. Im więcej ciemnych punktów względem ogólnej szorstkości tym SEr wyższe. Niższa wartość SEr świadczy o tym, że skóra jest zdrowsza, ponieważ jak już wyżej wspomniano skóra młoda charakteryzuje się bardzo mocno rozwiniętą siatką linii na swojej powierzchni, więc ciemniejszych obszarów będzie więcej niż w przypadku skóry dojrzałej.
- SEsm nazywany gładkością to średnia szerokość otrzymanego na podstawie analizy zdjęcia histogramu. Zdrowa, gładka skóra pozbawiona jest głębokich bruzd oraz martwego, łuszczącego się naskórka, które na uzyskanym zdjęciu odpowiadają za dwie skrajne barwy: czerń i biel. W przypadku tego parametru, pożądane są więc wyniki o jak najmniejszych rozbieżnościach prowadzące do zawężenia skali. Im gładsza skóra tym węższy histogram, za czym idzie niższa wartość parametru SEsm.
- SEw mówi o średniej ilości zmarszczek pionowych oraz poziomych oraz ich średniej szerokości. Wartość parametru wzrasta wraz z ilością i szerokością zarejestrowanych przez aparaturę zmarszczek.
- SEsc jest parametrem złuszczenia, mówiącym o procentowej ilości jasnych pikseli w stosunku do całego obrazu. Suchy naskórek odpowiada za jasne odcienie na otrzymanym na drodze badania obrazie.

Im więcej suchego naskórka tym więcej jasnego koloru – tym wyższa wartość parametru, tym nawilżenie skóry niższe.

4.8.4. Analiza makrorzeźby skóry

Urządzenie Visioline® VL 650 służy do pomiaru makrorzeźby skóry, czyli trwałych bruzd i zmarszczek mimicznych, np. tzw. „kurzych łapek”. Pomiar polega na wykonaniu silikonowej repliki powierzchni skóry widocznej. Po zmieszaniu składników silikonowych z katalizatorem i stwardnieniu odlewu, próbka trafia do komory pomiarowej aparatu [145].

Źródło światła o kącie padania 35° oświetla próbkę, a kamera rejestruje obraz cieni i wypukłości. Analiza poziomu szarości i rozkładu cieni pozwala na określenie głębokości oraz liczby zmarszczek. Metoda ta jest szczególnie przydatna w badaniach skuteczności kosmetyków przeciwzmarszczkowych [146].

Szczegółowa analiza zacienionych obszarów polega na ocenie ich ilości, rozmiaru i powierzchni, a także różnic w odcieniu szarości [147]. Im ciemniejsza, bardziej rozległa ciemna plama tym zmarszczka w danym miejscu jest głębsza i większa. Urządzenie pozwala wyznaczyć dla badanego obszaru skóry takie parametry jak:

- liczba i kształt zmarszczek,
- długość i głębokość zmarszczek,
- całkowita powierzchnia zmarszczek.

Wartości te mogą odnosić się dla ogółu zarejestrowanych zmarszczek obliczając ich ogólny lub średni udział na badanym obszarze lub mogą posłużyć do analizy pojedynczej bruzdy. Tym sposobem oprogramowanie na podstawie obliczeń umożliwia wierne odwzorowanie trójwymiarowego obrazu uchwyconej zmarszczki [148].

Urządzenie zapewnia wysoką powtarzalność i precyzję pomiarów, dzięki czemu stanowi cenne narzędzie w badaniach nad efektywnością preparatów przeciwstarzeniowych i regeneracyjnych.

5. Cel pracy

Przedmiotem przeprowadzonych badań były wybrane laktony seskwiterpenowe – kostunolid oraz lakton dehydrokustusowy – ze względu na ich różnorodne właściwości biologiczne (szczegółowo omówione w dalszej części rozprawy). Uwzględniając zależność działania substancji aktywnych od drogi ich podania, skoncentrowano się na analizie transportu przezskórnego, który dzięki licznym zaletom stanowi istotną alternatywę dla innych dróg aplikacji, a jednocześnie determinuje potencjalne zastosowania w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym.

Z uwagi na ograniczoną efektywność przenikania wielu substancji przez barierę warstwy rogowej skóry, opracowano nośniki w postaci nanocząstek lipidowych, do których zaincorporowano wybrane substancje aktywne.

Głównym celem badań było otrzymanie, zbadanie oraz optymalizacja właściwości fizykochemicznych formułacji zawierających wybrane laktony seskwiterpenowe, wykazujące potencjalnie interesujące właściwości rozjaśniające przebarwienia, wybielające oraz przeciwzapalne, istotne z punktu widzenia zastosowań farmaceutycznych i kosmetycznych. Wpływ substancji aktywnych określono poprzez ocenę działania preparatów w postaci emulsji i układów żelowych, zawierających badane związki zarówno w formie inkorporowanej do nanocząstek lipidowych, jak i w formie niezawierającej nośnika.

6. Metodyka pracy

6.1. Preparatyka nanocząstek lipidowych

Przed przystąpieniem do syntezy nanocząstek lipidowych (SLN) wybrano stały lipid, który byłby kompatybilny ze składnikami aktywnymi, ponieważ to właśnie matryca lipidowa nośników ma kluczowe znaczenie dla stabilności SLN. Do eksperymentu wybrano następujące lipidy stałe:

- Compritol® 888 ATO (dibehenian glicerolu), Gattefossé (Lyon, Francja),
- Precirol® ATO 5 (distearynian glicerolu), Gattefossé (Lyon, Francja),
- Softisan® 601 (mono- i distearynian glicerolu) IOI Oleo GmbH (Hamburg, Niemcy),
- Imwitor® 900 K (monostearynian glicerolu), IOI Oleo GmbH (Hamburg, Niemcy).

W celu sprawdzenia kompatybilności rozpuszczono 10 mg substancji aktywnej w 1 g badanego lipidu i podgrzano powyżej temperatury topnienia odpowiedniego lipidu. Po schłodzeniu obserwowano homogeniczność mieszaniny po 72 godzinach.

Po wyborze najbardziej odpowiedniego lipidu przystąpiono do syntezy nanocząstek lipidowych za pomocą dwóch metod:

- homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco (HPH),
- emulgowania bazującą na emulsji wielokrotnej.

Preparatyka nanocząstek lipidowych, poddawanych badaniom w ramach niniejszej pracy doktorskiej obejmowała przygotowanie trzech rodzajów dyspersji opisanych w tabeli 6.1:

- dyspersja nanocząstek lipidowych niezainkorporowanych substancją aktywną (dyspersja 1, dyspersja 4),
- dyspersja nanocząstek lipidowych inkorporowanych kostunolidem (dyspersja 2, dyspersja 5),
- dyspersja nanocząstek lipidowych inkorporowanych laktonem dehydrokustusowym (dyspersja 3, dyspersja 6).

Tabela 6.1. Skład chemiczny dyspersji nanocząstek lipidowych przygotowanych w ramach realizowanych badań

Dyspersja	Nazwa handlowa składnika	Producent składnika	Ilość [% wag., ± 0,01]
Dyspersja 1 (HPH) SLN	Softisan® 601*	Sasol	5
	Tween® 80*	Sigma-Aldrich	1
	Woda Milli-Q® Plus	-	94
Dyspersja 2 (HPH) N-K	Softisan® 601*	Sasol	5
	Tween® 80*	Sigma-Aldrich	1
	Woda Milli-Q® Plus	-	93,9
	Kostunolid	Biopurify Phytochemicals Ltd.	0,1
Dyspersja 3 (HPH) N-L	Softisan® 601*	Sasol	5
	Tween® 80*	Sigma-Aldrich	1
	Woda Milli-Q® Plus	-	93,9
	Lakton dehydrokostusowy	Biopurify Phytochemicals	0,1
Dyspersja 4 (W/O/W) M-SLN	Softisan® 601*	Sasol	5
	Tween® 80*	Sigma-Aldrich	1
	Woda Milli-Q® Plus	-	93
	Izopropanol	Sigma-Aldrich	1
Dyspersja 5 (W/O/W) M-NK	Softisan® 601*	Sasol	5
	Tween® 80*	Sigma-Aldrich	1
	Woda Milli-Q® Plus	-	92,9
	Izopropanol	Sigma-Aldrich	1
	Kostunolid	Biopurify Phytochemicals	0,1
Dyspersja 6 (W/O/W) M-NL	Softisan® 601*	Sasol	5
	Tween® 80*	Sigma-Aldrich	1
	Woda Milli-Q® Plus	-	92,9
	Izopropanol	Sigma-Aldrich	1
	Kostunolid	Biopurify Phytochemicals	0,1

*Handlowo dostępne produkty zawierają:

Softisan® 601– tristéarynian glicerolu, dipalmitynian glicerolu, monostéarynian glicerolu, mieszanina nasyconych mono-, di- i triglicerydów kwasów tłuszczowych (C12–C18), w tym głównie kwasu laurynowego, mirystynowego, palmitynowego i stéarynowego

Tween® 80 – Monooleinian polioksyetylenosorbitolu

Preparatyka nanocząstek lipidowych metodą homogenizacji wysokociśnieniowej na gorąco (HPH)

Sporządzono fazę lipidową przez dyspersję odpowiedniej ilości substancji aktywnej w stałym lipidzie Softisan® 601 (lub sam lipid w przypadku dyspersji 1 i 4). W osobnym naczyniu przygotowano fazę wodną, odważając i łącząc niejonowy emulgator Tween® 80 z wodą Milli-Q® Plus. Obie fazy utrzymywano w temperaturze 50°C (powyżej punktu topnienia Softisan® 601, wynoszącego 40–45°C), po czym je połączono i poddano wstępnemu homogenizowaniu przy 10 000 obr./min przez 90 s za pomocą urządzenia Ultra-Turrax® T25 (Ystral GmbH D-7801). Uzyskaną kremową makroemulsję następnie homogenizowano w homogenizatorze wysokociśnieniowym Panda Plus 2000 (GEA) pod ciśnieniem 300 bar przez minutę 6.1).



Rys. 6.1. Homogenizator Panda Plus 2000 (firmy GEA)

Preparatyka nanocząstek lipidowych metodą emulgowania bazującą na emulsji wielokrotnej (W/O/W).

W szklanej zlewce umieszczono odważony Softisan® 601 i substancję aktywną (lub sam lipid w przypadku dyspersji 1 i 4), które ogrzano do temperatury 50°C. Jednocześnie, w kolejnej zlewce umieszczono niewielką ilość wody Milli-Q® Plus wraz z Tween® 80 i izopropanolem, które również ogrzano do temperatury 50°C. Następnie, przygotowaną fazę wodną dodano do fazy tłuszczowej, cały czas intensywnie mieszając powstającą emulsję z wykorzystaniem homogenizatora wysokotnątowego Ultra-Turrax® T25 Digital Homogenizer (Ystral GmbH D-7801) przy prędkości 24 000 rpm przez około minutę. Kolejno, otrzymaną emulsję W/O dodano do 500 ml wody o temperaturze 4°C intensywnie mieszając za pomocą mieszadła magnetycznego IKA® C-MAG MS przy prędkości 300–350 rpm, aż do całkowitego ochłodzenia układu (około 30 minut).

Do dalszych badań używano zarówno wodnych dyspersji otrzymanych nanocząstek oraz poddanych liofilizacji w liofilizatorze Lyovac GT2e (Steris), zgodnie z przyjętą procedurą laboratoryjną.

6.2. Charakterystyka fizykochemiczna uzyskanych dyspersji nanocząstek lipidowych

W celu kompleksowej oceny właściwości otrzymanych nanocząstek lipidowych przeprowadzono szereg badań fizykochemicznych oraz analitycznych, obejmujących zarówno ocenę efektywności enkapsulacji substancji aktywnych, jak i charakterystykę strukturalną oraz stabilności uzyskanych układów. Opracowane formułacje lipidowe poddano analizie z wykorzystaniem technik wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), dynamicznego i elektroforetycznego rozpraszania światła (DLS, ELS), transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC) oraz dyfrakcji promieni rentgenowskich (XRD). Zastosowane metody umożliwiły określenie stopnia inkorporacji laktonów seskwiterpenowych w strukturze nanocząstek lipidowych, ich wielkości, polidispersyjności, potencjału elektrokinetycznego, a także ocenę morfologii i właściwości polimorficznych matrycy lipidowej. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do oceny przydatności otrzymanych nanonośników jako potencjalnych systemów dostarczania substancji biologicznie czynnych.

Badanie stabilności otrzymanych nanocząstek lipidowych (metoda dynamicznego i elektroforetycznego rozpraszania światła)

Stabilność dyspersji nanocząstek lipidowych oceniano przy użyciu aparatu Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) (rys 6.2). Pomiar wykonywano po odpowiednim przygotowaniu próbek (100 μ l dyspersji rozcieńczano w 25 ml wody destylowanej), ustalając współczynnik załamania światła dla każdej badanej matrycy lipidowej za pomocą refraktometru Refracto 30 PX/GS (Mettler Toledo). Badania obejmowały pomiary podstawowych parametrów fizykochemicznych, w tym średniej wielkości cząstek (Z-Ave), wskaźnika polidispersyjności (Pdl) oraz potencjału elektrokinetycznego (ZP).



Rys. 6.2. Aparat Zetasizer Nano ZS (firmy Malvern Instruments) i refraktometr Refracto 30 PX/GS (firmy Mettler Toledo)

Analizę przeprowadzano w temperaturze pokojowej po 24 godzinach od otrzymania dyspersji nanocząstek lipidowych (dzień 1), po 7 dniach (dzień 7) oraz po 30 dniach przechowywania (dzień 30). Dla każdej próbki wykonano trzy pomiary, a uzyskane wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne wraz z odchyleniami standardowymi.

Charakterystyka matrycy lipidowej otrzymanych nanocząstek lipidowych (transmisyjna mikroskopia elektronowa)

Morfologię oraz kształt nanocząstek lipidowych analizowano pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego Hitachi HT7700 pracującego przy napięciu przyspieszającym 40 lub 120 kV. Próbkę do analizy przygotowywano poprzez naniesienie dyspersji nanocząstek lipidowych na siatki miedziane, a następnie kontrastowano je 2% roztworem kwasu szczawiowego. Obserwacji dokonano w temperaturze pokojowej. Pomiar wykonywano w Centrum Badań Organizmów Kwarantannowych i Inwazyjnych w Instytucie Ochrony Roślin w Poznaniu.

Charakterystyka matrycy lipidowej otrzymanych nanocząstek lipidowych (skaningowa kalorymetria różnicowa)

Właściwości polimorficzne matrycy lipidowej badano z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej DSC 8500 (PerkinElmer). Pomiar wykonywano w Pracowni Analizy Termicznej Centrum Zaawansowanych Technologii UAM (CZT UAM) w Poznaniu. Próbkę umieszczano w aluminiowych naczynkach o pojemności 40 μ l i analizowano po wcześniejszej kalibracji urządzenia zgodnie z procedurą producenta.

Pomiar DSC prowadzono w sposób stopniowy, podgrzewając próbki od 20 °C do 130 °C w przepływie azotu (20 ml/min) z szybkością skanowania 5 °C/min. Następnie próbki utrzymywano w temperaturze 130 °C przez 1 minutę, po czym schładzano je do 20 °C w identycznych warunkach. Dla każdej próbki procedurę przeprowadzano w trzech powtórzeniach, a uzyskane dane przedstawiano w formie krzywych DSC. Na ich podstawie wyznaczano temperatury charakterystyczne oraz entalpię reakcji przemian polimorficznych.

Charakterystyka matrycy lipidowej otrzymanych nanocząstek lipidowych (dyfrakcja promieni rentgenowskich)

Analizę stopnia krystaliczności i identyfikację odmian polimorficznych matrycy lipidowej w nanocząstkach lipidowych przeprowadzono metodą dyfrakcji rentgenowskiej proszkowej, wykorzystując dyfraktometr D8 Advance z monochromatorem Johanssona (Bruker). Pomiary wykonano w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej (ŚLUACH) na Wydziale Chemii UAM. Próbkę przygotowano poprzez nałożenie dyspersji nanocząstek na szkiełka pomiarowe i wysuszenie w temperaturze pokojowej. Następnie prowadzono analizę w zakresie kątów $2\theta = 10\text{--}60^\circ$ za pomocą skanera z szybkością 5°/minutę, uzyskując dyfraktogramy pozwalające na ocenę struktury krystalicznej lipidowej matrycy nośnika.

Badanie efektywności enkapsulacji laktonów seskwiterpenowych w otrzymanych nanocząstkach lipidowych

Efektywność enkapsulacji kostunolidu i laktonu dehydrokustusowego w uzyskanych nanocząstkach lipidowych oceniano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV-Vis, wykorzystując system Varian 920-LC (Agilent Technologies), wyposażonego w automatyczny podajnik próbek oraz dozownik (rys. 6.3).



Rys. 6.3. Wysokosprawny chromatograf cieczowy Varian 920-LC (firmy Agilent Technologies)

Oznaczenia chromatograficzne polegały na ilościowym określeniu stężenia nieenkapsulowanych laktonów seskwiterpenowych obecnych w zewnętrznej fazie wodnej formułacji, niezwiązanych z matrycą lipidową. Procedura obejmowała następujące etapy:

I. Sporządzanie krzywych kalibracyjnych laktonów seskwiterpenowych

W pierwszej kolejności ustalono czasy retencji oznaczanych związków czynnych, po czym odczytano pola powierzchni pików (A) odpowiadających kolejnym stężeniom wzorców kostunolidu i laktonu dehydrokustusowego. Powierzchnia pików jest proporcjonalna do ilości substancji obecnej w próbce. Na tej podstawie sporządzono wykresy kalibracyjne, przedstawiające zależność pomiędzy polem powierzchni pików a stężeniem badanych laktonów seskwiterpenowych rozpuszczonych w etanolu.

II. Przygotowanie próbek dyspersji nanocząstek lipidowych do analizy chromatograficznej

Do analizy pobierano 1 ml badanej dyspersji nanocząstek lipidowych, którą umieszczano w probówkach Eppendorf Tubes® (rys. 6.4) i wirowano przez 30 minut w wirówce MPW-350R z częstotliwością obrotów 3000 rpm (rys 6.4). Następnie usuwano fazę wodną z nad osadu, dodawano 9 ml etanolu i ponownie wytrząsano próbki przez około 5 minut. Uzyskane roztwory przesączało przez filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,45 μm , a następnie w ilości 1,5 ml przenoszono do fiolek szklanych przeznaczonych do analizy HPLC (rys 6.4).



Rys. 6.4. Probówka Eppendorf Tubes® z uzyskaną dyspersją, wirówka laboratoryjna MPW-350R (firmy MPW Med. Instruments) oraz roztwór poddawany analizie HPLC po przesączeniu przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 μm .

III. Przeprowadzenie analizy chromatograficznej

Fiolki zawierające próbki z fazy wodnej poddawano analizie chromatograficznej w automatycznym podajniku próbek. Pomiar prowadzono zgodnie z warunkami opisanymi w tabeli 6.2. Każdą próbkę analizowano trzykrotnie, a wyniki przedstawiano jako wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi. Dodatkowo, w ramach walidacji metody, określono parametry granicę wykrywalności LOD (ang. *limit of detection*) oraz granicę oznaczalności LOQ (ang. *limit of quantification*).

Tabela 6.2. Warunki analizy chromatograficznej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC)

Kolumna	TSKgel ODS-100Z, 5 μm , 100 Å, 250 mm x 4,6 mm
Faza ruchoma	Wodny roztwór kwasu trifluorooctowego TFA (0,1%): acetonitryl (30:70)
Natężenie przepływu fazy ruchomej [cm^3/min]	1
Objętość dozowanych próbek [μL]	5
Detektor	UV
Analityczna długość fali [nm]	220
Całkowity czas analizy [min.]	11

IV. Oznaczanie ilościowe nieenkapsulowanych laktonów seskwiterpenowych w zewnętrznej fazie wodnej

Stężenia kostunolidu oraz laktonu dehydrokustusowego oznaczano na podstawie krzywych kalibracyjnych uzyskanych w ramach uprzednio zwalidowanej metody HPLC. Wyniki wyrażano jako procentową wartość nieenkapsulowanych substancji aktywnych w stosunku do całkowitej ilości laktonów seskwiterpenowych, zgodnie ze wzorem:

$$EE(\%) = \frac{\text{całkowita ilość substancji aktywnej} - \text{ilość niezakapsułkowanej substancji aktywnej}}{\text{całkowita ilość substancji aktywnej}} \times 100$$

6.3. Preparatyka formulacji kosmetycznych

Preparatyka formulacji kosmetycznych, poddawanych badaniom w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej obejmowała przygotowanie czterech rodzajów podłoży kosmetycznych:

- emulsja O/W otrzymywana metodą „na zimno,
- emulsja O/W otrzymywana metodą „na gorąco”,
- oleożel,
- hydrożel.

Wymienione formulacje kosmetyczne przygotowano zgodnie z opisanymi poniżej procedurami. Proces przebiegał w analogiczny sposób dla podłoży niezawierających oraz zawierających substancje aktywne w postaci laktonów seskwiterpenowych (kostunolidu i laktonu dehydrokustusowego). W tabeli 6.3 przedstawiono szczegółowy skład podłoży kosmetycznych, w której przedstawiono skład chemiczny wszystkich przygotowanych formulacji kosmetycznych.

Formulacje kosmetyczne bazowe:

Preparatyka formulacji 1 (emulsji O/W otrzymywana metodą „na zimno”)

Do zlewki odważono składniki fazy tłuszczowej – Creagel® oraz Alphaflow®, które wymieszano za pomocą szklanej bagietki. Następnie, dodawano wodę demineralizowaną przy intensywnym mieszaniu aż do uzyskania odpowiedniej konsystencji. Dodano konserwant Microcare DB® i otrzymaną formulację zhomogenizowano za pomocą homogenizatora YellowLine DI 25 (IKA).

Tabela 6.3. Skład chemicznych otrzymanych formułacji kosmetycznych

Formulacja kosmetyczna	Nazwa handlowa składnika	Producent składnika	Ilość [% wag., ± 0,01]
 Emulsja O/W otrzymana metodą „na zimno” (E1)	Creagel® EZ 7*	Creations Couleur	7,5
	Alphaflow® 20*	Creations Couleur	12,75
	Woda demineralizowana	–	79,25
	Microcare® DB*	Thor GmbH	0,5
 Emulsja O/W otrzymana metodą „na gorąco” (E2)	Olej z pestek brzoskwini	Zrób Sobie Krem	7,5
	Masło Shea	Zrób Sobie Krem	5
	Alkohol cetylowy	Sigma-Aldrich	2
	Poliakrylan sodu	Sigma-Aldrich	2
	Woda dejonizowana	–	83
	Microcare® DB*	Thor GmbH	0,5
 Oleożel (O)	Olej z pestek brzoskwini	Zrób Sobie Krem Kosmetyki Naturalne	95,2
	Aerosil® 200*	Evonik Industries	5,7
	Tween® 80*	Sigma-Aldrich	1
	Microcare® DB*	Thor GmbH	0,5
 Hydrożel (H)	Guma ksantanowa	Biomus	3
	Gliceryna	Sigma-Aldrich	4
	Woda dejonizowana	–	92,5
	Microcare® DB*	Thor GmbH	0,5

*Handlowo dostępne produkty zawierają:

Creagel® EZ 7 – poliakrylamid, uwodorniony polidecen, eter laurylowy polioksyetylenu

Alphaflow® 20 – uwodorniony polidecen

Microcare® DB – alkohol benzylowy, kwas dehydrooctowy

Aerosil® 200 – krzemionka koloidalna

Tween® 80 – Monooleinian polioksyetylenosorbitolu

Preparatyka formulacji 2 (emulsji O/W otrzymywana metodą „na ciepło”)

Do zlewki odważono składniki fazy tłuszczowej – olej z pestek brzoskwini, masło shea i alkohol cetylowy, które podgrzewano do 50°C (w celu stopienia stałych składników stopienia) i wymieszano za pomocą szklanej bagietki. Następnie, dodawano podgrzaną do tej samej temperatury wodę demineralizowaną. Stopniowo przy intensywnym mieszaniu dodawano poliakrylan sodu aż do uzyskania odpowiedniej konsystencji i na koniec dodano konserwant Microcare DB®. Otrzymaną formulację zhomogenizowano za pomocą homogenizatora YellowLine DI 25 (IKA).

Preparatyka formulacji 3 (oleożelu)

Do zlewki odważono olej z pestek brzoskwini oraz Tween® 80 i wymieszano za pomocą szklanej bagietki. Następnie, stopniowo przy intensywnym mieszaniu dodawano Aerosil 200® aż do uzyskania odpowiedniej konsystencji i na koniec dodano konserwant Microcare DB®. Otrzymaną formulację zhomogenizowano za pomocą homogenizatora YellowLine DI 25 (IKA).

Preparatyka formulacji 4 (hydrożelu)

Do zlewki odważono wodę oraz glicerynę, które podgrzano do temperatury 35°C i wymieszano za pomocą szklanej bagietki. Następnie, stopniowo przy intensywnym mieszaniu dodawano gumę ksantanową aż do uzyskania odpowiedniej konsystencji i na koniec dodano konserwant Microcare DB®. Otrzymaną formulację zhomogenizowano za pomocą homogenizatora YellowLine DI 25 (IKA).

Formulacje kosmetyczne z substancjami aktywnymi:

Wykonano formulacje kosmetyczne z 0,5% wag. dodatkiem substancji aktywnych – kostunolidu (K) lub laktonu dehydrokustusowego (L) z pewnymi zmianami składu:

W emulsji 1 (E1) i 2 (E2) zmniejszając fazę wodną do 78,75% wag. (E1) i do 82,5% wag. (E2) oraz w hydrożelu do 92% wag., natomiast w oleożelu zmniejszając zawartość oleju z pestek brzoskwini do 94,7% wag.

Formulacje kosmetyczne ze stabilnymi nanocząstkami lipidowymi (SLN) inkorporowanymi substancjami aktywnymi:

Wykonano formulacje kosmetyczne z dodatkiem substancji aktywnych – kostunolidu (K) lub laktonu dehydrokustusowego (L) w postaci zainkorporowanej w nanocząsteczkę lipidową z pewnymi zmianami składu:

W emulsji 1 (E1) i 2 (E2) zastępując wodę demineralizowaną na wodną dyspersję nanocząstek lipidowych, natomiast w oleożelu (O) zmniejszając zawartość oleju z pestek brzoskwini 88% wag. przez dodatek 5% wag. zliofilizowanych nanocząstek lipidowych.

6.4. Charakterystyka fizykochemiczna badanych formułacji kosmetycznych

Ocenie poddano właściwości fizykochemiczne badanych formułacji kosmetycznych, obejmujące m.in. pomiar pH, lepkości oraz analizę wielkości cząstek. Dodatkowo weryfikowano ich stabilność za pomocą testu wirówkowego. Celem badań było śledzenie zmian zachodzących w czterech rodzajach formułacji, które przechowywano przez 90 dni w trzech temperaturach: 4°C, 25°C i 40°C.

Oznaczanie wartości pH otrzymanych formułacji kosmetycznych

Do pomiaru pH użyto urządzenia EcoSense® pH 10 pH/Temperature Meter, Pen Style (VMR International) przedstawionego na rys. 6.5. Sprzęt został wcześniej skalibrowany przy użyciu standardowych roztworów buforowych o pH 4,01; 7,00 i 10,01. Następnie przygotowano roztwory wodne badanych formułacji (0,5 g próbki rozpuszczone w 10 ml wody destylowanej).

Pomiar polegał na zanurzeniu elektrody w próbce do momentu, aż wskazania na wyświetlaczu ustabilizowały się. Badania prowadzono w temperaturze pokojowej w dniu sporządzenia preparatu (dzień 0) oraz po 90 dniach (dzień 90). Każdą próbkę analizowano trzykrotnie, a z uzyskanych wyników obliczano średnią i odchylenie standardowe.

Badanie lepkości otrzymanych formułacji kosmetycznych

Lepkość preparatów określano przy użyciu rotacyjnego wiskozymetru RC02 (Rheotec) przedstawionego na rys. 6.5. Na początku dobierano odpowiednie wrzeciono oraz prędkość pomiarową – zaczynając od najniższych obrotów i stopniowo je zwiększając. Próbki umieszczano w wąskich pojemnikach, które pozwalały na właściwe zanurzenie wrzeciona. Pomiar wykonano w temperaturze pokojowej zarówno w dniu przygotowania formułacji (dzień 0), jak i po 90 dniach (dzień 90), stosując wrzeciono R4. Każdą próbę analizowano trzykrotnie, a uzyskane dane uśredniano i obliczano odchylenie standardowe.

Badanie rozkładu wielkości cząstek otrzymanych formułacji kosmetycznych (technika dyfrakcji laserowej)

Analizę rozkładu wielkości cząstek w badanych układach kosmetycznych przeprowadzono z wykorzystaniem analizatora Mastersizer 2000 (Malvern) przedstawionego na rys. 6.5. Przed przystąpieniem do pomiarów dokonano odpowiedniego doboru parametrów optycznych próbki, obejmujących absorpcję promieniowania (dla badanych formułacji przyjęto wartość ok. 0,001 [–]) oraz współczynnik załamania światła (RI, ang. refractive index), określony przy użyciu refraktometru Refracto 30 PX/GS (Mettler Toledo). Pomiar polegał na zdyspergowaniu 0,1 g formułacji kosmetycznej w 800 ml wody destylowanej, przy zastosowaniu mieszała pracującego z częstotliwością obrotów 1500 rpm. W trakcie procesu kontrolowano wartość obskuracji, utrzymując ją na poziomie 5%. Ocenę rozkładu wielkości cząstek prowadzono w temperaturze pokojowej w dniu sporządzenia formułacji (dzień 0) oraz po 90 dniach przechowywania (dzień 90). Dla każdej próbki wykonano trzy pomiary, uzyskując krzywe rozkładu cząstek oraz

wartości parametru $d(0,9)$. Następnie obliczono średnie arytmetyczne oraz odchylenia standardowe uzyskanych wyników.



Rys. 6.5. Aparatura stosowana do oceny pH (EcoSense® pH 10 pH/Temperature Meter, Pen Style (firmy VMR International)), lepkości rotacyjnej (wiskozymetr RC02 firmy Rheotec) i rozkładu wielkości cząstek (Mastersizer 2000, firmy Malvern Instruments Ltd)

Badanie stabilności otrzymanych formułacji kosmetycznych (test wirówkowy)

Stabilność układów kosmetycznych oceniano za pomocą testu wirówkowego, wykorzystując laboratoryjną wirówkę MPW-350R (MPW Med. Instruments). Próbkę formułacji umieszczano w probówkach Eppendorf Tubes® 3810X o pojemności 1,5 ml, a następnie poddawano działaniu siły odśrodkowej. Pomiar polegał na umieszczeniu probówek w wirniku kątowym i wirowaniu przez 10 minut z częstotliwością obrotów 4000 rpm. Test prowadzono w temperaturze pokojowej w dniu przygotowania próbek (dzień 0), po 7 dniach (dzień 7), po 30 dniach (dzień 30), po 60 dniach (dzień 60) oraz po 90 dniach przechowywania (dzień 90). Dla każdej formułacji procedurę wykonano jednokrotnie, a następnie dokonano wizualnej oceny układów pod kątem ewentualnych objawów destabilizacji, takich jak rozwarstwienie czy zmiany jednorodności.

Badanie stabilności chemicznej wybranych laktonów seskwiterpenowych w otrzymanych formulacjach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Stabilność chemiczną kostunolidu i laktonu seskwiterpenowego zawartych w badanych formulacjach kosmetycznych oceniano w ramach opracowania metody umożliwiającej zarówno jakościowe, jak i ilościowe oznaczanie tych związków w produktach kosmetycznych. Analizy prowadzono z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego Varian 920-LC (Agilent Technologies), wyposażonego w automatyczny podajnik próbek oraz dozownik (rys. 6.5) Chromatograficzne oznaczanie laktonów seskwiterpenowych polegało na odpowiednim przygotowaniu próbek formulacji zawierających badane substancje czynne, a następnie ich rozdziale chromatograficznym na kolumnie analitycznej z użyciem detektora UV-Vis.

Procedura obejmowała następujące etapy:

I. Przygotowanie próbek formulacji kosmetycznych do analizy chromatograficznej

W celu przygotowania próbek do analizy odważano 0,1 g badanej formulacji kosmetycznej, po czym dodawano 10 ml wody destylowanej i intensywnie wytrząsano przez około 5 minut. Uzyskane roztwory przesączało przez filtry strzykawkowe o średnicy porów $0,45\ \mu\text{m}$, a następnie w objętości 1,5 ml przenoszono do szklanych fiolek przeznaczonych do analizy HPLC (rys. 6.6).

II. Przeprowadzenie analizy chromatograficznej

Przygotowane wcześniej roztwory wzorcowe oraz próbki formulacji kosmetycznych umieszczano w automatycznym podajniku próbek chromatografu. Analizy prowadzono w warunkach opisanych w tabeli 6.2. Każdą próbkę poddawano serii trzech powtórzeń pomiarowych, a otrzymane dane wykorzystano do obliczenia średnich arytmetycznych oraz wartości odchyłeń standardowych.

III. Oznaczanie jakościowe laktonów seskwiterpenowych w badanych formulacjach kosmetycznych

Identyfikację badanych laktonów seskwiterpenowych przeprowadzono poprzez porównanie czasów retencji wzorców kostunolidu i laktonu dehydrokostusowego z chromatogramami uzyskanymi dla próbek kosmetycznych. Polegało to na odczytaniu czasów retencji pików odpowiadających wzorcom oraz zestawieniu ich z czasami retencji pików przypisanych laktonom obecnym w analizowanych formulacjach. Dzięki temu potwierdzono specyficzność zastosowanej metody analitycznej. Oznaczenia jakościowe przeprowadzono zarówno w dniu przygotowania próbek (dzień 0), jak i po 90 dniach przechowywania (dzień 90).

IV. Oznaczanie ilościowe laktonów seskwiterpenowych w badanych formulacjach kosmetycznych

Zawartość kostunolidu i laktonu dehydrokustusowego w analizowanych formulacjach kosmetycznych określono przy zastosowaniu metody standardu zewnętrznego, wykorzystując uprzednio sporządzone krzywe kalibracyjne. Wartości pól powierzchni pików chromatograficznych uzyskanych dla badanych próbek zestawiono z odpowiednimi krzywymi kalibracyjnymi, co pozwoliło na obliczenie stężeń poszczególnych laktonów seskwiterpenowych zgodnie z równaniem prostej regresji. Oznaczenia ilościowe przeprowadzono zarówno w dniu przygotowania próbek (dzień 0), po 30 dniach (dzień 30), po 60 dniach (dzień 60) oraz po 90 dniach przechowywania (dzień 90).

Badanie efektywności uwalniania laktonów seskwiterpenowych z otrzymanych formulacji kosmetycznych

Ocenę efektywności uwalniania laktonów seskwiterpenowych z badanych formulacji kosmetycznych przeprowadzono z zastosowaniem aparatu typu 708-DS (Agilent Technologies Inc.). Analizę uwalniania laktonów seskwiterpenowych przeprowadzono według procedury obejmującej następujące etapy:

I. Przygotowanie płynu akceptorowego

Jako medium zastosowano odpowiednio dobrany roztwór buforowy o charakterze analitycznym (pH w zakresie 5,4–5,9), sporządzony na bazie roztworu fosforanowego o pH 5,8. Najpierw przygotowano wodny roztwór KH_2PO_4 o stężeniu 0,2 M (rozpuszczając 32,5 g KH_2PO_4 w 1000 ml wody destylowanej), a następnie sporządzono roztwór NaOH o stężeniu 0,2 M (8 g NaOH w 1000 ml wody). Bufor uzyskano poprzez zmieszanie roztworów KH_2PO_4 i NaOH w proporcjach niezbędnych do uzyskania pożądanego pH.

II. Przygotowanie roztworów wzorcowych do sporządzenia krzywej kalibracyjnej

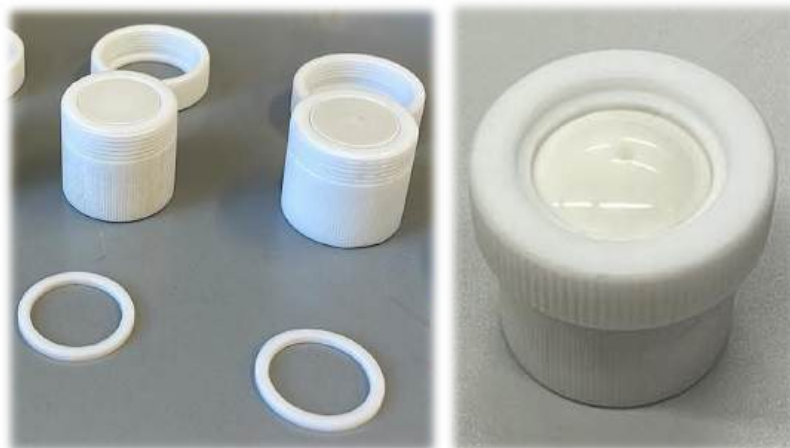
W pierwszym etapie sporządzono roztwory kostunolidu i laktonu dehydrokustusowego o stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ w mieszaninie buforu fosforanowym o pH 5,8 i etanolu (zmieszane w stosunku objętościowym 65:35). Następnie, stosując metodę kolejnych rozcieńczeń, przygotowano zestaw roztworów wzorcowych o stężeniach: 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 7; 10; 20 oraz 30 $\mu\text{g/ml}$. Każdy roztwór przesączono przez filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,45 μm , a następnie w ilości 1,5 ml przeniesiono do szklanych fiolek przeznaczonych do analizy HPLC.

III. Dobór membrany

W badaniach wykorzystano membrany z regenerowanej celulozy o średnicy 11,5 mm i nominalnej wartości odcięcia masy cząsteczkowej (MWCO) wynoszącej 12 000–14 000 Da. Przed zastosowaniem membrany kondycjonowano, zanurzając je na 3 godziny w medium akceptorowym.

IV. Przygotowanie próbek formulacji kosmetycznych

Próbki przygotowywano poprzez odważenie 1 g formulacji kosmetycznej i umieszczenie jej w odpowiedniej komorze aparatu (rys. 6.6). Komorę zamykano membraną, a następnie zakładano pierścień typu O-ring oraz nakrętkę zabezpieczającą, co zapobiegało wyciekom podczas analizy.



Rys. 6.6. Teflonowe komory ekstrakcyjne wykorzystywane w badaniach kinetyki uwalniania substancji aktywnych z formulacji kosmetycznych (przed napełnieniem formulacji kosmetyczną i po).

V. Przeprowadzenie analizy dostępności laktonów seskwiterpenowych w płynie akceptorowym

Analizę dostępności laktonów seskwiterpenowych przeprowadzono w komorach ekstrakcyjnych zawierających próbki badanych formulacji kosmetycznych. Komory umieszczono w szklanych naczyniach wypełnionych wcześniej przygotowanym medium akceptorowym (rys. 6.7). Badania prowadzono w warunkach określonych w tabeli 6.4., powtarzając procedurę trzykrotnie dla każdej próbki w celu zapewnienia powtarzalności wyników.



Rys. 6.7. Teflonowe komory ekstrakcyjne w trakcie badania w aparacie łopatkowym Varian Vankel 7010. (firmy Agilent Technologies).

Tabela 6.4. Warunki badania efektywności uwalniania substancji aktywnych z formulacji kosmetycznych

Temperatura łaźni wodnej	36,6 ± 0,5 °C
Prędkość obrotowa łopatek	100 rpm
Czas trwania analizy	30 godzin

VI. Oznaczanie laktonów seskwiterpenowych w płynie akceptorowym

Zarówno analiza jakościowa, jak i ilościowa laktonów seskwiterpenowych została przeprowadzona metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, zgodnie z wcześniej opisanymi procedurami analitycznymi w tabeli 6.2.

VII. Pobieranie próbek płynu akceptorowego do analizy chromatograficznej

Pobieranie próbek prowadzono poprzez odjęcie 1 ml płynu akceptorowego ze szklanego naczynia znajdującego się nad komorą ekstrakcyjną, w której umieszczono badaną formulację kosmetyczną. Następnie próbki przesączało przez filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,45 µm i przenoszono do szklanych fiolek przeznaczonych do analizy HPLC. Procedurę pobierania wykonywano w odstępach czasowych: początkowo co 5 minut, 15 minut, 30 minut przez pierwsze 3 godzin badania uwalniania, a następnie w regularnych godzinnych interwałach czasowych przez 30 godzin.

VIII. Przeprowadzenie analizy chromatograficznej

Szklane fiołki zawierające przygotowane próbki płynu akceptorowego z oznaczanymi laktonami seskwiterpenowymi umieszczano w automatycznym podajniku próbek. Analizę chromatograficzną prowadzono w warunkach pomiarowych przedstawionych w tabeli 6.2. Każdą próbkę analizowano trzykrotnie, a z uzyskanych wyników obliczano wartości średnie oraz odchylenia standardowe.

IX. Oznaczanie jakościowe laktonów seskwiterpenowych w płynie akceptorowym

Procedurę opisano w rozdziale dotyczącym badania stabilności chemicznej wybranych laktonów seskwiterpenowych

X. Sporządzanie krzywych kalibracyjnych laktonów seskwiterpenowych

Procedurę opisano w rozdziale dotyczącym badania stabilności chemicznej wybranych laktonów seskwiterpenowych

XI. Obliczanie procentowej wartości stopnia uwalniania badanych laktonów seskwiterpenowych z formulacji kosmetycznych

Zawartość kostunolidu oraz laktonu dehydrokostusowego w próbkach płynu akceptorowego określano przy zastosowaniu metody standardu zewnętrznego, wykorzystując uprzednio sporządzone krzywe kalibracyjne. Uzyskane wartości stężeń przeliczano następnie na procentowy stopień uwalniania substancji z formulacji kosmetycznej, odnosząc go do całkowitej ilości laktonów seskwiterpenowych zawartych w danym preparacie kosmetycznym.

6.5. Badanie aktywności antyoksydacyjnej

Aktywność antyoksydacyjną badanych laktonów seskwiterpenowych oceniano przy wykorzystaniu kilku uzupełniających się metod analitycznych, umożliwiających wszechstronną charakterystykę ich właściwości przeciwutleniających. Dobór technik pozwalał zarówno na ocenę zdolności neutralizowania wolnych rodników, jak i na oznaczenie całkowitej zawartości związków fenolowych oraz potencjału redukcyjnego badanych substancji. Analizy przeprowadzono z użyciem spektrofotometru UV-Vis (rys. 6.8) w ściśle kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, stosując odpowiednie roztwory wzorcowe i krzywe kalibracyjne dla każdej z metod.



Rys. 6.8. Spektrofotometr UV-Vis Carry 50 (firmy Varian)

Wyznaczanie zdolności antyoksydacyjnych metodą DPPH

Aktywność antyoksydacyjną laktonów seskwiterpenowych oceniano z wykorzystaniem stabilnego rodnika DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl). Roztwór rodnika przygotowano w kolbie miarowej o pojemności 25 ml poprzez odważenie odpowiedniej ilości DPPH, a następnie dopełnienie metanolem do kreski. W celu przyspieszenia rozpuszczania kolbę umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na około 5 minut. Po uzyskaniu klarownego roztworu wykonano pomiar widma UV-Vis i wyznaczono długość fali odpowiadającą maksimum absorpcji ($\lambda_{\max}$), która została przyjęta jako długość analityczna. Spektrofotometr skalibrowano przy użyciu metanolu, po czym zmierzono absorbancję roztworu rodnika DPPH (A_0), wykorzystywaną w dalszych obliczeniach. Roztwór przechowywano w ciemnej kolbie w miejscu osłoniętym od światła.

W celu sporządzenia krzywej kalibracyjnej przygotowano roztwory wzorcowe troloksu o stężeniach 0,0025; 0,0075; 0,01; 0,02 oraz 0,03 mmol/dm³. Troloks, będący analogiem tokoferolu, rozpuszczano w wodzie, a pomiary prowadzono z wykorzystaniem spektrofotometru UV-Vis.

Roztwory laktonów seskwiterpenowych przygotowano poprzez odważenie 0,1 g odpowiednich substancji i rozpuszczenie ich w 10 ml etanolu. Otrzymane roztwory przesączano przez membrany filtracyjne o średnicy porów 0,45 µm. Do kuwety odmierzano 1,5 ml roztworu DPPH oraz 1,5 ml roztworu badanych laktonów seskwiterpenowych. Mieszaniny inkubowano w ciemności przez 30 minut, po czym rejestrowano absorbancję przy $\lambda = 517$ nm. Każdy pomiar wykonywano trzykrotnie, a wyniki przedstawiano jako średnie wartości absorbancji. Aktywność antyoksydacyjną wyrażano jako wartości równoważnika troloksu (TEAC) według wzoru:

$$TEAC \left[\frac{\mu\text{mol TE}}{g} \right] = \frac{\text{stężenie troloksu } [\mu\text{mol/L}]}{\text{stężenie próbki } [g/L]}$$

Oznaczanie zdolności antyoksydacyjnych metodą ABTS

W tej metodzie zastosowano kationorodnik ABTS (kwas 2,2-azynobis-3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy). Roztwór ABTS przygotowano poprzez rozpuszczenie 0,00406 g związku w 1 ml wody (7,4 mM), natomiast roztwór nadsiarczanu potasu sporządzono przez rozpuszczenie 0,007 g $K_2S_2O_8$ w 10 ml wody (2,6 mM). Oba roztwory zmieszano w stosunku objętościowym 1:1, tj. 1 ml roztworu ABTS i 1 ml roztworu nadsiarczanu, a następnie pozostawiono mieszaninę w ciemności na 16 godzin w celu pełnego wygenerowania kationorodnika, a następnie roztwór rozcieńczono 120 ml metanolu.

Dla stworzenia krzywej kalibracyjnej przygotowano roztwory troloksu w stężeniach: 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 i 0,4 mmol/dm³. Roztwór wyjściowy o stężeniu 1 mmol/dm³ uzyskano przez rozpuszczenie 0,00625 g troloksu w 25 ml metanolu.

Roztwory laktonów seskwiterpenowych przygotowano w sposób analogiczny jak w metodzie DPPH. Do kuwety dodawano 0,15 ml roztworu laktonów oraz 2,85 ml roztworu kationorodnika ABTS. Mieszaniny inkubowano w ciemności przez 6 minut, a następnie mierzono absorbancję przy $\lambda = 734$ nm. Dodatkowo rejestrowano wartość A_0 dla roztworu kontrolnego. Obliczenia prowadzono według wzoru:

$$TEAC \left[\frac{\mu\text{mol TE}}{g} \right] = \frac{\text{stężenie troloksu } [\mu\text{mol/L}]}{\text{stężenie próbki } [g/L]}$$

Oznaczanie całkowitej zawartości związków fenolowych metodą Folina–Ciocâlteu

W celu oznaczenia zawartości związków fenolowych w badanych laktonach zastosowano odczynnik Folina–Ciocâlteu, który zawiera mieszaninę wolframianu sodu, molibdenianu sodu, siarczanu litu, wody bromowej oraz stężonych kwasów — solnego i fosforowego(V). Jako wzorzec zastosowano kwas galusowy w postaci roztworu wyjściowego o stężeniu 300 mg/L uzyskano przez rozpuszczenie 0,0075 g kwasu galusowego w 25 ml metanolu, a następnie rozcieńczano go do uzyskania roztworów o stężeniach: 5; 10; 50; 100; 150; 200 i 225 mg/L.

Roztwory laktonów seskwiterpenowych przygotowano w sposób analogiczny jak w metodzie DPPH. Do 0,1 ml próbki dodawano 0,9 ml wody destylowanej oraz

0,1 ml odczynnika Folina–Ciocâlteu, po czym mieszaninę inkubowano przez 5 minut. Następnie dodawano 1 ml 7% roztworu Na_2CO_3 oraz 0,4 ml wody destylowanej, a absorbancję mierzono bezpośrednio po wymieszaniu przy $\lambda_{\text{max}} = 760 \text{ nm}$.

Oznaczanie zdolności antyoksydacyjnych metodą FRAP

Ostatnia zastosowana metoda opierała się na zdolności laktonów seskwiterpenowych do redukcji jonów żelaza(III) do żelaza(II) w środowisku kwaśnym przy użyciu odczynnika FRAP. Do przygotowania roztworów odczynnika sporządzono 40 mM roztwór HCl przez rozcieńczenie 0,855 ml stężonego HCl w 25 ml wody destylowanej, do którego dodano 0,0755 g odczynnika TPTZ. Następnie przygotowano 20 mM roztwór $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ poprzez rozpuszczenie 0,135 g substancji w 25 ml wody. Bufor octanowy o pH 3,6 stanowił trzeci składnik układu. Mieszaninę odczynnika uzyskano w stosunku objętościowym 10:1:1 (100 ml buforu, 10 ml roztworu TPTZ w HCl, 10 ml roztworu $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), a następnie ogrzano ją do 37°C do uzyskania jednolitego zabarwienia.

Dla kalibracji przygotowano roztwory troloksu o stężeniach 0,1; 0,3; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75 i 2 mmol/dm^3 , korzystając z roztworu macierzystego o stężeniu 2 mmol/dm^3 (0,012 g troloksu rozpuszczone w 25 ml metanolu). Roztwory laktonów seskwiterpenowych przygotowano w sposób analogiczny jak w metodzie DPPH. Do kuwety odmierzano 3,9 ml odczynnika FRAP oraz 0,1 ml roztworu laktonów, po czym inkubowano przez 30 minut i mierzono absorbancję przy $\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$.

6.6. Badanie efektywności działania otrzymanych preparatów kosmetycznych

Ocena efektywności działania opracowanych preparatów kosmetycznych obejmowała czterotygodniowe badania aplikacyjno-aparaturowe prowadzone w grupie 80 ochotniczek spełniających określone kryteria doboru. Pomiarów dokonywano w kontrolowanych warunkach klimatycznych, utrzymując stałą temperaturę oraz wilgotność powietrza w pomieszczeniach pomiarowych.

Badanie *in vivo* przeprowadzono zgodnie z *Uchwałą Komisji Bioetycznej* z dnia 17 lutego 2022r. i obejmowało następujące etapy:

- I. uzyskanie od ochotników świadomej zgody na udział w badaniu poprzez podpisanie stosownego dokumentu (załącznik nr 1) wraz z zgodą na przyjęcie warunków ubezpieczenia (załącznik nr 2) i przetwarzanie danych (załącznik nr 3),
- II. przeprowadzenie wywiadu dermatologicznego oraz wypełnienie kwestionariusza dotyczącego stanu zdrowia skóry, nawyków pielęgnacyjnych oraz występowania ewentualnych problemów dermatologicznych (Kwestionariusz wywiadu dermatologicznego (załącznik nr 4),
- III. przekazanie uczestnikom badań materiałów informacyjnych, obejmujących cel, harmonogram, zasady aplikacji preparatów oraz możliwe działania niepożądane (Materiały informacyjne dla ochotnika, załącznik nr 5),
- IV. przekazanie badanym odpowiednich próbek kosmetyków należących do kategorii produktów pielęgnacyjnych (rys. 6.9),



Rys. 6.9 Przygotowana część preparatów kosmetycznych dla ochotników

- V. poinstruowanie uczestników w zakresie prawidłowego stosowania kosmetyków — aplikacja wieczorna, na wyznaczone miejsca skóry (konkretne części dłoni),
- VI. przeprowadzenie badań aparaturowych skóry z wykorzystaniem odpowiednich urządzeń pomiarowych i wybranych parametrów skóry po

tygodniu aplikacji (tydzień 0/1), a następnie w kolejnych tygodniach trwania badania w określonych odstępach czasowych przedstawiono w tabeli 6.5 i 6.6.

Tabela 6.5. Zestawienie prowadzonych badań aplikacyjno-użytkowych z podziałem na tygodnie

Tydzień badań	Pomiar nawilżenia (Corneometer® CM 825)	Pomiar przeznaskórkowej utraty wody (TEWL) (Tewameter® TM 300)	Pomiar zawartości melaniny i poziomu zaczerwienienia (Mexameter® MX 18)	Pomiar kolorytu skóry (Colorimeter® CL 400)
0*	+	+	+	+
1	+	+	+	+
4	+	+	+	+
8	+	+	+	+

*(badanie kontrolne przed pierwszą aplikacją produktu)

Tabela 6.6. Zestawienie prowadzonych badań aplikacyjno-użytkowych (analizy topograficznej i makrorzeźby skóry) z podziałem na tygodnie

Tydzień badań	Pomiar parametrów topografii skóry (Visioscan® VC 98)	Pomiar parametrów makrorzeźby skóry (Visioline® VL 650)
0*	+	+
1	-	-
4	-	-
8	+	+

*(badanie kontrolne przed pierwszą aplikacją produktu)

- VII. przeprowadzenie ankiety końcowej w ósmym tygodniu jego trwania, w której uczestnicy wypełniali formularz oceny subiektywnej. Kwestionariusz zawierał pytania dotyczące właściwości pielęgnacyjnych oraz parametrów użytkowych testowanych preparatów kosmetycznych, ocenianych w pięciostopniowej skali (Formularz subiektywnej oceny testowanych kosmetyków, załącznik nr 6).

Nawilżenie skóry (Corneometer® CM 825)

Badanie poziomu nawilżenia naskórka za pomocą korneometru (Corneometer® CM 825, Courage+Khazaka electronic GmbH) polegało na przyłożeniu i dociśnięciu sondy korneometru do badanego obszaru skóry. Wykonano po 3 pomiary na każdym z obszarów, następnie obliczono średnią wartość oraz odchylenie standardowe. Badanie wykonywano w tygodniu 0, po pierwszym tygodniu, 4 tygodniach i 8 tygodniach stosowania preparatów kosmetycznych.

Poziom transepidermalnej utraty wody (Tewameter® TM 300)

Pomiar przeznaskórkowej utraty wody za pomocą tewametu (Tewameter® TM 300, Courage+Khazaka electronic GmbH) polegał na przyłożeniu głowicy sondy (sonda z głowicą otwartą) do badanego obszaru skóry. Wykonano po 20 pomiarów na każdym z obszarów, obliczono średnią wartość oraz odchylenie standardowe. Badanie wykonywano w tygodniu 0, po pierwszym tygodniu, 4 tygodniach i 8 tygodniach stosowania preparatów kosmetycznych.

Zawartość melaniny i zaczerwienienie skóry (Mexameter® MX 18)

Pomiar zawartości melaniny i poziomu zaczerwienienia polegał na przyłożeniu i dociśnięciu głowicy sondy meksametru (Mexameter® MX 18, Courage+Khazaka electronic GmbH) do badanego obszaru skóry. Wykonano po 3 pomiary na każdym z badanych obszarów, obliczono średnią zawartość melaniny oraz poziomu zaczerwienienia oraz odchylenie standardowe dla tych wartości. Badanie wykonywano w tygodniu 0, po pierwszym tygodniu, 4 tygodniach i 8 tygodniach stosowania preparatów kosmetycznych.

Parametry opisujące koloryt skóry (Colorimeter® CL 400)

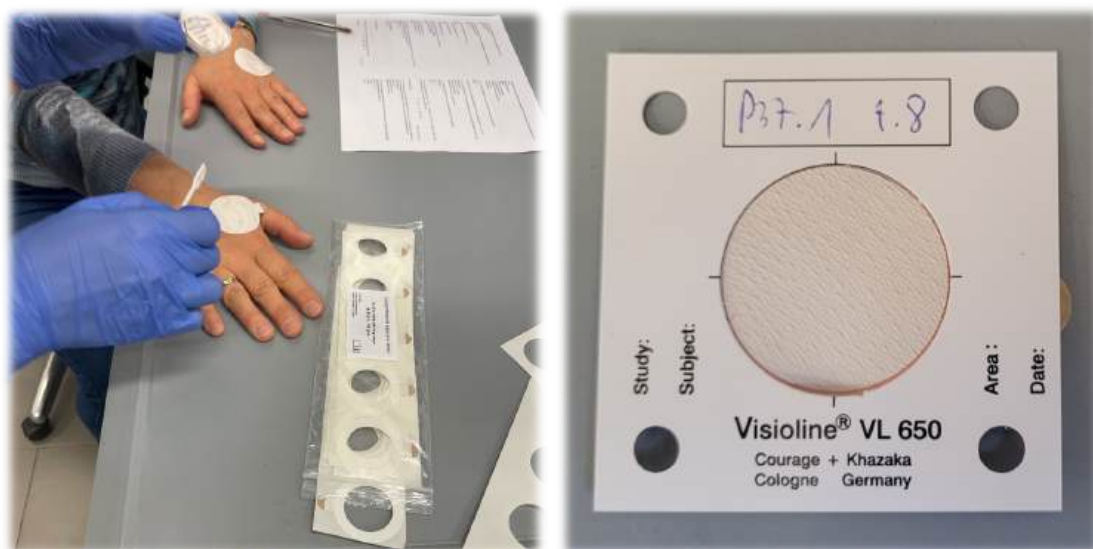
Pomiar kolorytu skóry za pomocą kolorymetru (Colorimeter® CL 400, Courage+Khazaka electronic GmbH) polegał na przyłożeniu i dociśnięciu głowicy sondy do badanego obszaru skóry. Wykonano po 3 pomiary na każdym z badanych obszarów, wyznaczono współczynniki L^* oraz a^* . Dla każdego ze współczynników obliczono średnią wartość oraz odchylenie standardowe. Badanie wykonywano w tygodniu 0, po pierwszym tygodniu, 4 tygodniach i 8 tygodniach stosowania preparatów kosmetycznych.

Parametry opisujące makrorzeźbę skóry (Urządzenie Visioline® VL 650)

Pomiar parametrów topografii skóry wykonano za pomocą urządzenia Visiocan® VC 98 (Courage+Khazaka electronic GmbH). Pomiary polegały na pionowym przyłożeniu sondy do wybranego obszaru skóry, wykonania obrazu i automatycznym przeliczeniu uzyskanych danych przez oprogramowanie instrumentu w celu otrzymania wskaźników topografii. Pomiary przeprowadzono przed rozpoczęciem aplikacji badanych preparatów (tydzień 0) oraz w końcowym etapie badania *in vivo* (tydzień 8); na każdym polu pomiarowym wykonywano trzy powtórzenia, z których obliczono średnie i odchylenia standardowe.

Parametry opisujące makrorzeźbę skóry (Urządzenie Visioline® VL 650)

Parametry makro-rzeźby skóry oceniano urządzeniem Visioline® VL 650 (Courage+Khazaka electronic GmbH) na podstawie silikonowych odlewów. Repliki przygotowywano przez przyklejenie papierowego pierścienia na oznaczonym fragmencie skóry, wymieszanie masy silikonowej (1,5 g) z trzema kroplami katalizatora, nałożenie powstałej masy do wnętrza pierścienia, odczekanie do związania i ostrożne zdjęcie pierścienia z odlewem (rys. 6.10). Otrzymane odlewy umieszczano na kartonowym podłożu pomiarowym i skanowano przy oświetleniu pod kątem 35°, a analizę wyników przeprowadzano z wykorzystaniem algorytmów opartych na zasadzie światłocienia. Badanie makrorzeźby wykonywano przed pierwszą aplikacją i w ostatnim tygodniu badania *in vivo* (tydzień 4), przy czym na każdym obszarze pomiarowym procedurę wykonywano jednokrotnie, a ostateczne wskaźniki obliczało oprogramowanie urządzeń.



Rys. 6.10. Przygotowanie silikonowych odlewów na dłoni ochotnika oraz uzyskana replika skóry

7. Wyniki badań i dyskusja

7.1. Preparatyka nanocząstek lipidowych

Przed przystąpieniem do syntezy nanocząstek lipidowych wybrano stały lipid, który byłby kompatybilny ze składnikami aktywnymi, ponieważ to właśnie matryca lipidowa nośników ma kluczowe znaczenie dla stabilności SLN. Po schłodzeniu obserwowano homogeniczność mieszaniny, a rezultaty po 72 godzinach eksperymentu przedstawiono w tabeli 7.1.

Tabela 7.1 Zestawienie przedstawiające otrzymane mieszaniny lipidów i substancji aktywnych

	Kostunolid	Lakton dehydrokostusowy
Compritol® 888 ATO		
Precirol® ATO 5		
Softisan® 601		
Imwitor® 900 K		

Na podstawie obserwacji końcowych wybrano Softisan® 601 do optymalizacji produkcji dyspersji nanocząstek lipidowych z wykorzystaniem metody HPH i metody wielokrotnego emulgowania. W efekcie otrzymano białą nanoemulsję typu O/W zawierającą stałe nanocząstki lipidowe (rys. 7.1)



Rys 7.1. Otrzymane dyspersje nanocząstek lipidowych

7.2. Charakterystyka fizykochemiczna uzyskanych dyspersji nanocząstek lipidowych

W tym rozdziale przedstawiono kompleksową ocenę właściwości fizykochemicznych otrzymanych dyspersji nanocząstek lipidowych, mającą na celu określenie ich wielkości, jednorodności, stabilności elektrokinetycznej oraz struktury matrycy lipidowej. Badania obejmowały pomiary dynamicznego rozpraszania światła (Z-Ave, Pdl) i potencjału zeta (ZP) w kolejnych punktach czasowych w celu oceny stabilności fizycznej układów, transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM) do weryfikacji morfologii oraz techniki analityczne — DSC i XRD — do identyfikacji właściwości polimorficznych i stopnia krystaliczności matrycy lipidowej. Ponadto oceniono efektywność enkapsulacji substancji aktywnych metodą HPLC, co pozwoliło powiązać zmiany parametrów fizykochemicznych z zawartością i rozmieszczeniem laktonów seskwiterpenowych w nośnikach. Uzyskane dane mają na celu ocenę przydatności opracowanych formułacji jako stabilnych systemów nośnikowych dla zastosowań kosmetycznych i farmaceutycznych.

Badanie stabilności otrzymanych nanocząstek lipidowych (metoda dynamicznego i elektroforetycznego rozpraszania światła)

Aby scharakteryzować właściwości fizykochemiczne przygotowanych stałych nanocząstek lipidowych (SLN) wykorzystano analizator Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Wielka Brytania). W ramach badań zarejestrowano:

- średnią średnicę cząstek (Z-Ave),
- wskaźnik polidispersyjności (Pdl),
- potencjał zeta (ZP).

Analizy dostępne w literaturze [149] wskazują, że właściwości matrycy lipidowej determinowane są nie tylko przez wybór konkretnego lipidu, lecz także przez jego udział procentowy oraz zastosowane surfaktanty. Spośród gruntownie przebadanych lipidów stałych Softisan® 601 okazał się najbardziej efektywny – jak zauważyli Almeida i Souto [150] jego względnie niska temperatura topnienia poprawia kompatybilność otrzymanej dyspersji w kontekście zastosowań kosmetycznych oraz sprzyja stabilności zamkniętego w nanocząstkach kostunolidu i lakonu dehydrokostosowego.

Ocena trwałości dyspersji była niezbędna ze względu na planowane zastosowanie SLN jako składnika formułacji kosmetycznej, a warunek podwyższonej temperatury (40 °C) odpowiadał testom starzeniowym preparatów kosmetycznych przeprowadzonych w dalszych etapach badań. Stabilność w czasie sporządzonych zawiesin SLN zbadano monitorując trzy kluczowe parametry: średnicę cząstek (Z Ave [nm]), wskaźnik polidispersyjności (Pdl [–]) oraz potencjał zeta (ZP [mV]). Pomiaram poddano próbki bezpośrednio po otrzymaniu nanocząstek (oznaczone jako dzień 0) oraz po 7 (dzień 7) i 30 (dzień 30) dniach przechowywania w temperaturze 40 °C. Wyniki dla nanocząstki zestawiono w tabelach 7.2 i 7.3.

Tabela 7.2. Parametry stabilności fizykochemicznej otrzymanych nanocząstek lipidowych otrzymanych metodą HPH

	Dzień 0			Dzień 7			Dzień 30		
Próbka	Z-Ave [nm]	PdI [-]	ZP [mV]	Z-Ave [nm]	PdI [-]	ZP [mV]	Z-Ave [nm]	PdI [-]	ZP [mV]
SLN	225,43 ± 0,52	0,408 ± 0,009	-20,0 ± 2,2	230,87 ± 2,52	0,419 ± 0,013	-15,3 ± 3,1	278,57 ± 1,95	0,447 ± 0,007	-13,1 ± 3,8
NK	215,37 ± 1,32	0,384 ± 0,013	-21,4 ± 4,1	233,07 ± 1,64	0,529 ± 0,024	-18,3 ± 2,2	378,70 ± 1,52	0,479 ± 0,009	-16,5 ± 3,5
NL	219,23 ± 0,97	0,415 ± 0,004	-20,4 ± 3,2	237,97 ± 1,33	0,442 ± 0,008	-19,9 ± 4,6	369,00 ± 2,32	0,435 ± 0,003	-18,3 ± 1,5

Tabela 7.3. Parametry stabilności fizykochemicznej otrzymanych nanocząstek lipidowych otrzymanych metodą emulsji wielokrotnej

	Dzień 0			Dzień 7			Dzień 30		
Próbka	Z-Ave [nm]	PdI [-]	ZP [mV]	Z-Ave [nm]	PdI [-]	ZP [mV]	Z-Ave [nm]	PdI [-]	ZP [mV]
M- SLN	372,72 ± 0,26	0,485 ± 0,006	-21,5 ± 2,6	333,40 ± 1,53	0,404 ± 0,008	-27,8 ± 1,9	440,97 ± 3,58	0,533 ± 0,014	-22,8 ± 2,2
M-NK	302,24 ± 0,45	0,505 ± 0,003	-21,1 ± 1,1	343,24 ± 1,47	0,433 ± 0,019	-23,8 ± 0,7	472,93 ± 2,53	0,491 ± 0,021	-30,2 ± 4,1
M-NL	555,71 ± 1,53	0,514 ± 0,016	-35,5 ± 2,8	865,12 ± 3,86	0,615 ± 0,022	-27,2 ± 1,6	1624,2 ± 5,53	0,928 ± 0,040	-29,9 ± 4,2

Analizując zmiany średnicy cząstek (Z-Ave) zauważamy wyraźne różnice zależne od metody przygotowania i obecności związku aktywnego. W układach otrzymanych metodą HPH cząstki były najpierw najmniejsze.

Dla próbki bez substancji aktywnych (SLN) średnica wzrosła nieznacznie o około 2,4% po 7 dniach, natomiast po 30 dniach przyrost wyniósł 23,6%, co wskazuje na umiarkowaną tendencję do powiększania się populacji cząstek. W nanocząstkach lipidowych zawierających kostunolid (N-K) obserwujemy znacznie silniejszy efekt – już po 7 dniach średnica wzrosła o 8,2%, a po miesiącu nastąpił duży przyrost rzędu 75,8%, co świadczy o intensywnej agregacji w tej konkretnej próbce. Dla nanocząstek lipidowych z laktonem dehydrokustusowym (N-L) wzrost był podobny do kostunolidu po 7 dniach (8,6%), a po 30 dniach średnica zwiększyła się o 68,3%.

W układach przygotowanych metodą emulsji wielokrotnej (W/O/W) cząstki były od początku większe i zachowywały się mniej stabilnie – próbka nanocząstek lipidowych bez substancji aktywnych (M-SLN) najpierw zmniejszyła średnicę o około 10,5%, by po 30 dniach zwiększyć ją o 18,3% względem wartości wyjściowej. Nanocząstki lipidowe z inkorporowanym kostunolidem (M-NK) wykazała przyrosty średnicy o 13,6% po 7 dniach i 56,5% po 30 dniach. Natomiast najbardziej dramatyczne zmiany dotyczyły nanocząstek z inkorporowanym laktonem dehydrokustusowym (M-NL) — średnica wzrosła o 55,7% już w ciągu 7 dni, a po 30 dniach osiągnęła wzrost rzędu 192,3%, co oznacza niemal trzykrotne zwiększenie rozmiaru i wskazuje na masową koalescencję/agregację.

Jeśli prześledzimy zmiany w polidispersyjności (Pdl), obraz jest spójny z obserwacjami dotyczącymi Z-Ave. Metoda HPH generowała bardziej jednorodne układy na starcie, z niewielkim pogorszeniem jednorodności po 30 dniach. W próbce bez substancji aktywnych (SLN) Pdl wzrosło nieznacznie o 2,7% po 7 dniach i o 9,6% po 30 dniach, co odzwierciedla umiarkowane poszerzenie rozkładu wielkości. W nanocząstkach lipidowych zawierających kostunolid (N-K) zauważono znaczące pogorszenia jednorodności — Pdl wzrosło o 37,8% już po 7 dniach i o 24,7% po 30 dniach, co skorelowane jest z dużym wzrostem średnicy. Nanocząstki lipidowe zawierające lakton dehydrokustusowy (N-L) wykazały jedynie łagodne zmiany Pdl (wzrost o 6,5% po 7 dniach i o +4,8% po 30 dniach).

W nanocząstkach uzyskanych metodą emulsji wielokrotnej (W/O/W) Pdl było od początku wyższe i w najbardziej problematycznej próbce (z laktonem dehydrokustusowym, M-NL) nastąpiło dramatyczne pogorszenie jednorodności — Pdl wzrosło o 19,7% po 7 dniach i aż o 80,5% po 30 dniach, potwierdzając silne rozwarstwienie populacji cząstek, pozostałe próbki uzyskane tą metodą (M-SLN, M-NK) wykazywały mniejsze fluktuacje Pdl, ale nadal pozostawały ogólnie bardziej heterogeniczne niż większość układów uzyskanych metodą HPH.

Ocena potencjału zeta (ZP) z perspektywy bezwzględnej wartości ładunku pokazuje dodatkowe mechanizmy destabilizacji. W układach otrzymanych metodą HPH obserwujemy systematyczne osłabienie ładunku elektrostatycznego. Dla próbki z nanocząstkami lipidowymi (SLN) niezawierającymi substancji aktywnych bezwzględna wartość |ZP| zmniejszyła się o około 23,5% po 7 dniach i o 34,4% po 30 dniach, zaś w próbce z kostunolidem (N-K) spadek wyniósł odpowiednio 14,5% i 22,9%. Taka redukcja ładunku elektrostatycznego zmniejsza siły odpychania między cząstkami i sprzyja ich łączeniu, co dobrze koreluje z obserwowanymi wzrostami Z-Ave i Pdl w układach otrzymanych metodą HPH.

W systemach W/O/W trend zmian ZP był bardziej zróżnicowany — w niektórych próbkach bezwzględna wartość ładunku się zwiększyła (np. próbka z kostunolidem (M-NK) wykazała wzrost |ZP| o 12,8% po 7 dniach i 43,1% po 30 dniach), co teoretycznie powinno poprawiać stabilność elektrostatyczną; mimo to w formule z laktonem (M-NL), pomimo początkowo bardzo wysokiego |ZP|, doszło do silnej destabilizacji, co sugeruje, że poza siłami elektrostatycznymi działają też inne mechanizmy (np. brak bariery sterycznej, zmiany w matrycy lipidowej lub koalescencja kropli).

Na zakończenie, łącząc wszystkie obserwacje, można stwierdzić, że metoda HPH powoduje wytwarzania najmniejszych i bardziej jednorodnych nanocząstek oraz

generalnie lepszą kontrolę nad ich parametrami w czasie. Metoda W/O/W z kolei generuje znacznie większe i bardziej heterogeniczne cząstki już na starcie, a obecność laktonu dehydrokostusowego prowadzi do dramatycznej destabilizacji, co w kontekście kosmetycznej formulacji czyni tę metodę mniej pożądaną lub może być użyteczna tylko tam, gdzie akceptowalne są znacznie większe i bardziej heterogeniczne cząstki.

Po porównaniu obu metod, do dalszych części badań w tej pracy nanocząstki lipidowe zostały otrzymywane metodą HPH.

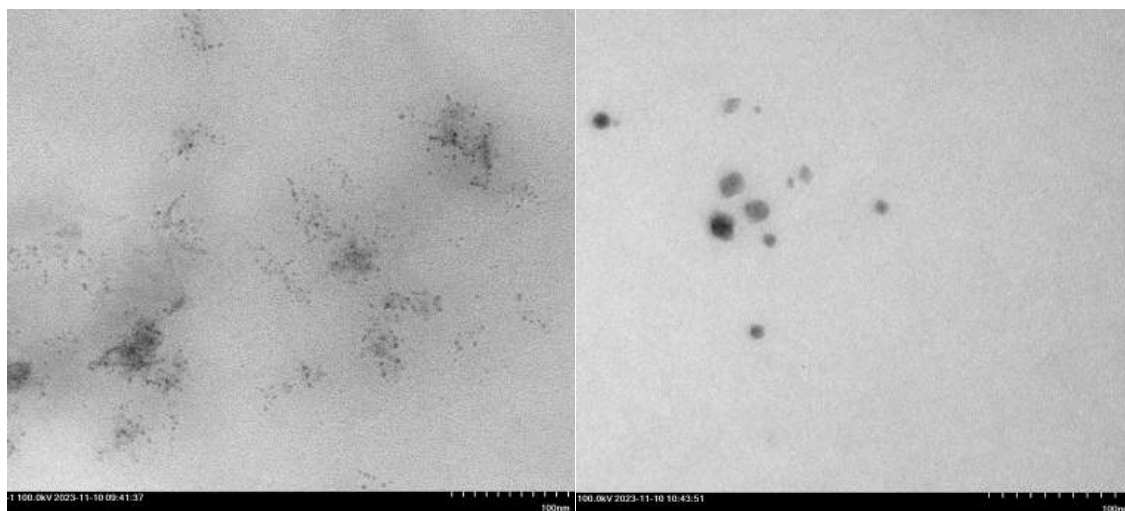
Charakterystyka matrycy lipidowej otrzymanych nanocząstek lipidowych (transmisyjna mikroskopia elektronowa)

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) stanowi jedną z kluczowych technik obrazowania stosowanych w badaniach nanostruktur wykorzystywanych w farmacji i kosmetologii. Umożliwia ona bezpośrednią obserwację morfologii, rozkładu wielkości, stopnia agregacji oraz struktury wewnętrznej nanocząstek z rozdzielczością rzędu pojedynczych nanometrów. W odróżnieniu od metod pośrednich, takich jak dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), TEM pozwala na uzyskanie informacji o kształcie i topografii cząstek, co ma szczególne znaczenie w ocenie stabilności formulacji i skuteczności procesów enkapsulacji substancji czynnych [151], [152].

Zastosowanie TEM w badaniach nanocząstek lipidowych umożliwia ocenę jakości ich formowania, stopnia homogeniczności oraz ewentualnych zmian morfologicznych zachodzących w trakcie procesów technologicznych, takich jak liofilizacja, rehydratacja czy krystalizacja [153]. Uzyskane obrazy dostarczają również cennych informacji na temat ewentualnej obecności faz amorficznych lub krystalicznych, pozwalając na ocenę wpływu warunków suszenia i obecności stabilizatorów na strukturę nośnika [154].

Technika TEM jest szczególnie przydatna w badaniach nanonośników substancji biologicznie czynnych, ponieważ umożliwia weryfikację skuteczności ich inkorporacji w matrycę lipidową oraz identyfikację zmian strukturalnych mogących wpływać na właściwości biologiczne, takie jak biodostępność czy profil uwalniania substancji czynnej [155].

Na rysunkach 7.2. i 7.3. przedstawiono obrazy TEM zarejestrowane dla układów zawierających kostunolidu (N-K) i lakton dehydrokostusowy (N-L).

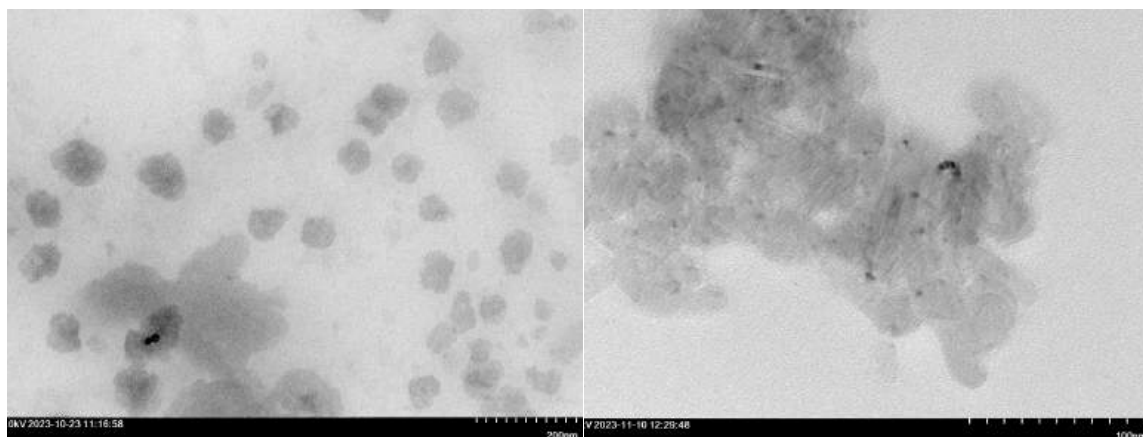


Rys. 7.2. Obrazy TEM nanocząstek lipidowych inkorporowanych kostunolidem (z lewej w formie wodnej dyspersji, a z prawej w formie zliofilizowanej). Skala 100 nm

Uzyskane wodne dyspersje nanocząstek z inkorporowanym kostunolidem charakteryzowały się dobrze zdefiniowaną, sferyczną morfologią, typową dla nanocząstek lipidowych (rys. 7.2). Obserwowano ich równomierne rozproszenie oraz zbliżony rozmiar, nieprzekraczający 20 nm. Jednorodne i gładkie powierzchnie sugerują skuteczną inkorporację kostunolidu w matrycę lipidową oraz dobrą stabilność układu. W stanie dyspersji nanocząstki zachowują pożądaną strukturę, co sprzyja ich wykorzystaniu jako nośników substancji biologicznie czynnych. Sferyczny kształt i brak aglomeracji świadczą o wysokiej jakości formulacji, a uzyskana morfologia jest korzystna z punktu widzenia kontroli uwalniania substancji aktywnej oraz jej penetracji przez skórę.

W próbkach liofilizowanych nanocząstek z inkorporowanym kostunolidem zaobserwowano silną aglomerację cząstek, tworzących zwarte, nieregularne skupiska, typowe dla nanomateriałów pozbawionych fazy ciekłej (rys. 7.2). Trudno było wyróżnić pojedyncze nanocząstki – wiele z nich wykazywało wzajemne zespolenie. Obserwowana tekstura może świadczyć o częściowej krystalizacji lipidów lub nierównomiernym przebiegu procesu liofilizacji.

Widoczne były również obszary amorficznych osadów, co może wskazywać na przemieszczenie substancji czynnej (kostunolidu) podczas suszenia. Tym samym można przypuszczać, że liofilizacja przeprowadzona bez odpowiednich krioprotektantów i stabilizatorów prowadzi do nieodwracalnych zmian morfologicznych, powodujących deformację struktur i pogorszenie redyspersywalności oraz biodostępności kostunolidu.



Rys. 7.3. Obrazy TEM nanocząstek lipidowych inkorporowanych laktonem dehydrokustusowym (z lewej w formie wodnej dyspersji, a z prawej w formie liofilizowanej; skala odpowiednio: 100 i 200 nm)

Na uzyskanym obrazie wodnej dyspersji nanocząstek z inkorporowanym laktonem dehydrokustusowym uzyskano cząstki o wyraźnie większych rozmiarach – średnia średnica wynosiła około 150 nm (rys. 7.3). Na obrazach TEM widoczne były nieregularne, wielopostaciowe agregaty, prawdopodobnie powstałe w wyniku rekrytalizacji lub ograniczonej rozpuszczalności laktonu w środowisku wodnym. Tego typu struktury mogą charakteryzować się obniżoną stabilnością koloidalną, co należy uwzględnić przy projektowaniu układów dostarczania tej substancji czynnej.

W przypadku formy liofilizowanej zaobserwowano obecność drobnych, rozproszonych skupień cząstek o średnicach rzędu kilku nanometrów. Taki rozkład może wskazywać na rozpad makrocząsteczek laktonu podczas procesu suszenia sublimacyjnego, prowadzący do powstawania amorficznych pozostałości.

Podsumowując, w przypadku nanocząstek lipidowych zawierających kostunolid, próbki zdyspergowane wykazywały wysoką jednorodność morfologiczną, charakteryzując się obecnością kulistych cząstek o średnicy poniżej 50 nm. Struktury te były dobrze rozproszone i miały gładką powierzchnię, co świadczy o skutecznej inkorporacji substancji czynnej oraz potencjalnej stabilności układu. Taka morfologia sprzyja kontrolowanemu uwalnianiu i skutecznej penetracji skórnej. Przeciwnie, próbki liofilizowane wykazywały silną aglomerację i nieregularną strukturę, z widocznymi fragmentami amorficznymi oraz śladami przemieszczenia substancji aktywnej. Może to świadczyć o niekorzystnym wpływie liofilizacji na morfologię i redyspergowalność cząstek w przypadku braku odpowiednich stabilizatorów. Z kolei analiza czystego laktonu kostunolidowego wykazała odmienny obraz morfologiczny. W próbkach zdyspergowanych zaobserwowano liczne, nieregularne aglomeraty o rozmiarach rzędu setek nanometrów, co sugeruje niską rozpuszczalność i tendencję do rekrytalizacji w środowisku wodnym. Tego typu struktury cechuje niska stabilność koloidalna. Natomiast forma liofilizowana zawierała oprócz dużych aglomeratów rozproszone drobne cząstki o średnicach kilku nanometrów, co może być wynikiem dezintegracji struktury laktonu w trakcie procesu suszenia sublimacyjnego i powstawania pozostałości amorficznych.

Ostatecznie, analiza potwierdza kluczowe znaczenie zarówno metody formulacji, jak i odpowiedniego doboru stabilizatorów i nośników, w kontekście zachowania pożądanej morfologii oraz potencjalnej biodostępności substancji aktywnych.

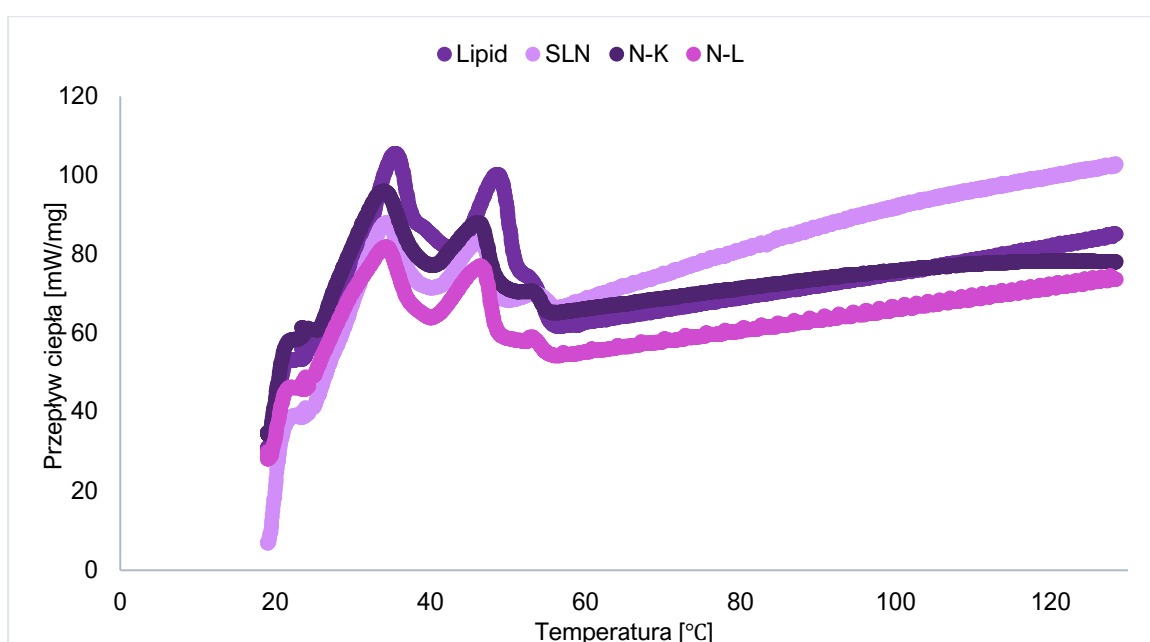
Charakterystyka matrycy lipidowej otrzymanych nanocząstek lipidowych (skaningowa kalorymetria różnicowa)

Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC) jest jedną z podstawowych metod stosowanych do analizy właściwości termicznych układów lipidowych i nanonośników substancji biologicznie czynnych. Technika ta umożliwia określenie temperatur przemian fazowych, entalpii topnienia oraz stopnia krystaliczności materiałów, a tym samym pozwala na ocenę wpływu procesu technologicznego, rodzaju lipidu i obecności substancji aktywnych na strukturę matrycy lipidowej [156], [157].

W kontekście nanocząstek lipidowych (SLN), analiza DSC jest kluczowa dla zrozumienia ich właściwości fizykochemicznych, ponieważ krystaliczność matrycy lipidowej w dużej mierze determinuje stabilność układu, zdolność inkorporacji substancji czynnej oraz profil jej uwalniania [158]. Obecność surfaktantów, homogenizacja wysokociśnieniowa oraz procesy chłodzenia mogą prowadzić do zaburzeń uporządkowania sieci krystalicznej lipidów, a z kolei dodatek substancji aktywnych może wprowadzać dodatkowe defekty w strukturze, prowadząc do częściowej amorfizacji matrycy [159].

Badania DSC pozwalają więc nie tylko na określenie czysto fizycznych parametrów, takich jak temperatura i entalpia topnienia, ale również na pośrednią ocenę interakcji pomiędzy składnikami formulacji oraz wpływu procesów technologicznych na morfologię lipidowego rdzenia. Uzyskane w ten sposób informacje są szczególnie istotne w projektowaniu stabilnych, kontrolowanie uwalniających się systemów nośnikowych dla substancji biologicznie czynnych, zwłaszcza w zastosowaniach dermatologicznych i kosmetycznych [160].

Na rys. 7.4 i 7.5 przedstawiono krzywe DSC zarejestrowane podczas ogrzewania i chłodzenia dla czystego lipidu (Softisan® 601), pustych nanocząstek lipidowych (SLN) oraz układów zawierających kostunolid (N-K) i lakton dehydrokostusowy (N L). W analizie uwzględniono również krzywe dla samych substancji aktywnych w celu oceny ich zachowania termicznego i ewentualnych interakcji z matrycą lipidową.



Rys. 7.4. Krzywe DSC podczas ogrzewania dla lipidu, nanocząstek lipidowych bez substancji aktywnej, nanocząstek lipidowych inkorporowanych kostunolidem i nanocząstek lipidowych inkorporowanych laktonem dehydrokostosowym

Porównanie krzywych DSC dla czystego lipidu i pustych nanocząstek (SLN) ujawnia obniżenie temperatury topnienia (T_{t1}) o ok. 1,7 °C oraz spadek entalpii ΔH_1 o ok. 16–20%. Zjawisko to jest charakterystyczne dla układów, w których w wyniku homogenizacji wysokociśnieniowej i obecności surfaktantu dochodzi do zaburzenia uporządkowania krystalicznego lipidów. Obserwowane obniżenie T_t i ΔH świadczy o częściowej amorfizacji matrycy lipidowej, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi [161].

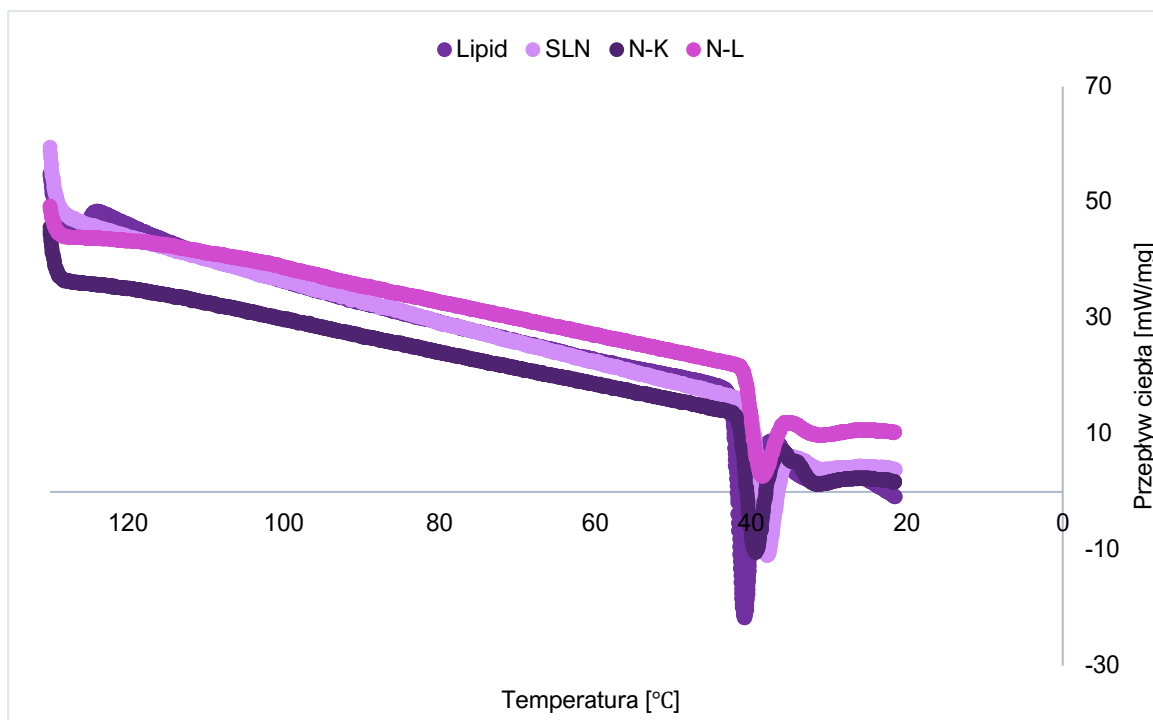
Dodatek substancji aktywnych – kostunolidu i laktonu dehydrokostosowego – prowadził do dalszych zmian w profilu termicznym. W przypadku próbki N-K temperatura topnienia obniżyła się o kolejne 0,6 °C, a ΔH spadło o ok. 9% względem nanocząstek lipidowych bez substancji aktywnej. Świadczy to o częściowej dezorganizacji sieci krystalicznej w obecności cząsteczek kostunolidu, które mogą lokalizować się w regionach amorficznych lub w defektach struktury lipidowej.

Jeszcze wyraźniejszy efekt zaobserwowano dla laktonu dehydrokostosowego. Próbka N-L wykazała przesunięcie T_t o dodatkowe 0,4 °C w dół i spadek entalpii o ponad 20% w stosunku do SLN-pusta. Oznacza to, że lakton silniej oddziałuje z matrycą lipidową, prowadząc do bardziej rozproszonego, mniej krystalicznego układu. Podobne obserwacje raportowano w literaturze [162] wskazując, że obecność związków hydrofobowych może zaburzać regularność sieci lipidowej, powodując obniżenie stopnia krystaliczności i entalpii topnienia.

Dla czystych substancji aktywnych (kostunolid i lakton dehydrokostosowy) zarejestrowano pojedyncze, ostre piki endotermiczne w zakresie ~61 °C, co odpowiada ich charakterystycznym punktom topnienia. Brak analogicznych sygnałów w krzywych dla K-SLN i L-SLN potwierdza, że substancje aktywne są całkowicie rozproszone lub amorfizowane w matrycy lipidowej, bez obecności krystalicznych domen. Wynik ten jest spójny z obserwacjami mikroskopowymi

i analizą XRD, które również nie wykazały wyodrębnionych faz krystalicznych substancji czynnych.

Podczas cyklu chłodzenia (rys. 7.5) zarejestrowano obniżenie temperatury krystalizacji oraz zmianę kształtu pików egzotermicznych dla próbek zawierających związki aktywne. Obserwowane spłaszczenie i poszerzenie pików wskazuje na tworzenie się mniej uporządkowanych form krystalicznych (polimorfów β'), co potwierdza tendencję do amorfizacji układu.



Rys. 7.5 Krzywe DSC podczas chłodzenia dla lipidu, nanocząstek lipidowych bez substancji aktywnej (SLN), nanocząstek lipidowych inkorporowanych kostunolidem i nanocząstek lipidowych inkorporowanych laktonem dehydrokustusowym

Poniżej zestawiono wyniki DSC dla czystego lipidu, pustego SLN oraz SLN załadowanych kostunolidem i laktonem dehydrokustusowym, a także krzywe dla samych związków aktywnych. Podano zarówno temperatury topnienia (T_i) wyznaczone z wierzchołków endoterm, jak i przybliżone wartości entalpii topnienia (ΔH) obliczone przez integrację obszaru pod pikami (wyrażone w J/g próbki) (tabela 7.4).

Tabela 7.4. Parametry termiczne badanych układów lipidowych: temperatury topnienia T_{t1}/T_{t2} i entalpie $\Delta H_1/\Delta H_2$

Próbka	T_{t1} [°C]	ΔH_1 [J/g]	T_{t2} [°C]	ΔH_2 [J/g]
Lipid	34,5	105	43,5	88
SLN	32,8	88	41,9	70
N-K	32,2	80	41,5	63
N-L	31,8	70	41,0	54
Kostunolid (sam)	—	—	61,2	65
Lakton (sam)	—	—	61,5	47

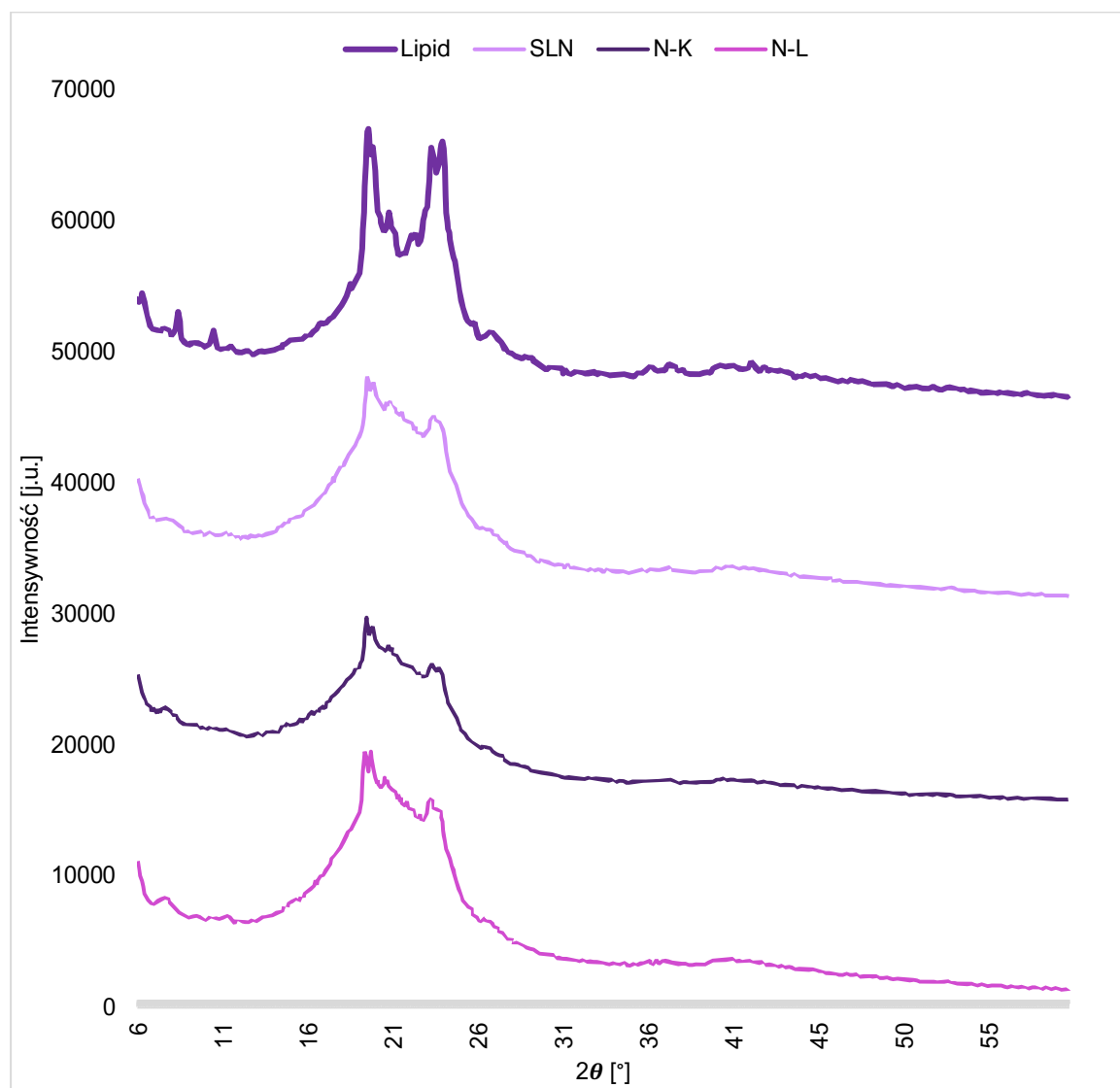
Z danych DSC wynika, że już sam proces formulacji SLN (homogenizacja w obecności Tween® 80) obniża temperatury topnienia i entalpie względem czystego lipidu, co świadczy o częściowej amorfizacji i spadku uporządkowania matrycy lipidowej. Dodatek substancji aktywnych pogłębia ten efekt: zarówno kostunolid, jak i – silniej – lakton dehydrokostusowy dodatkowo destabilizują sieć krystaliczną, prowadząc do dalszego obniżenia T_t i ΔH . Jednocześnie brak wyodrębnionych pików topnienia odpowiadających samym substancjom w krzywych SLN wskazuje na ich całkowite rozproszenie/amorfizację w nośniku lipidowym, co sprzyja stabilności układu oraz umożliwia bardziej przewidywalne, kontrolowane uwalnianie w planowanych zastosowaniach kosmetyczno-dermatologicznych.

Charakterystyka matrycy lipidowej otrzymanych nanocząstek lipidowych (dyfrakcja promieni rentgenowskich)

Dyfrakcja rentgenowska proszkowa (XRD) została wykorzystana do oceny uporządkowania wewnętrznego i polimorfizmu matrycy lipidowej badanych nanocząstek. Metoda umożliwia rozróżnienie faz amorficznych od krystalicznych oraz identyfikację charakterystycznych form triglicerydów (α , β' , β) na podstawie położenia i kształtu refleksów w zakresie 2θ , rejestrowanych przy promieniowaniu Cu K α ($\lambda = 1,5406$ Å). Porównanie widm układów nanocząstek lipidowych z inkorporowanymi substancjami aktywnymi z widmem czystego lipidu pozwala ocenić wpływ homogenizacji i inkorporacji substancji aktywnych na stopień krystaliczności: obniżenie intensywności i poszerzenie maksimów dyfrakcyjnych wskazuje na rozdrobnienie domen i częściową amorfizację. Uzyskane wyniki traktowano komplementarnie do DSC — przesunięcia i zmiany kształtu refleksów korespondują z depresją temperatur topnienia i spadkiem entalpii, wspólnie charakteryzując reorganizację lamelarną matrycy lipidowej. Dla ograniczenia artefaktów próbki analizowano jako jednorodne warstwy proszku/filmów o kontrolowanej wilgotności i stałych parametrach pomiaru (krok skanowania, prędkość, zakres 2θ). Dzięki temu XRD stanowi wiarygodne narzędzie

potwierdzające zmiany strukturalne zachodzące w wyniku formulacji i załadunku substancji biologicznie czynnych.

Z wykorzystaniem techniki XRD dokonano charakterystyki fazy krystalicznej lipidu widoczne na rys. 7.6 są dwa ostre odbicia przy około $2\theta \approx 21^\circ$ i $2\theta \approx 23,5^\circ$. Odpowiadają one uporządkowanej, półkrystalicznej strukturze mono-, di- i triacyloglicerydów (formy β'/β).



Rys. 7.6. Porównanie dyfraktogramów lipidu oraz badanych dyspersji nanocząstek lipidowych (dyfraktogramy przesunięte o stałą wartość jednostek 15000 umownych w stosunku do poprzedzającego dyfraktogramu)

Zaobserwowano dla czystych (nieinkorporowanych) cząstek obniżenie intensywności sygnałów o ok. 20–30 % w porównaniu z samym lipidem. Refleksy są nieco szersze, co wskazuje na zmniejszony rozmiar kryształów lipidowych i wzrost udziału fazy amorficznej. Należy zatem stwierdzić, że homogenizacja i rozdrabnianie lipidu w procesie przygotowania nanocząstek powodują częściową utratę krystaliczności – powstaje matryca o mieszanej (krystaliczno-amorficznej) strukturze. Z kolei wprowadzenie substancji aktywnych (kostunolidu i laktonu dehydrokostusowego) powoduje dalszy spadek intensywności, tj. dla SLN-K dalsze obniżenie intensywności o ~50 % względem SLN-puste, a w SLN-L największy

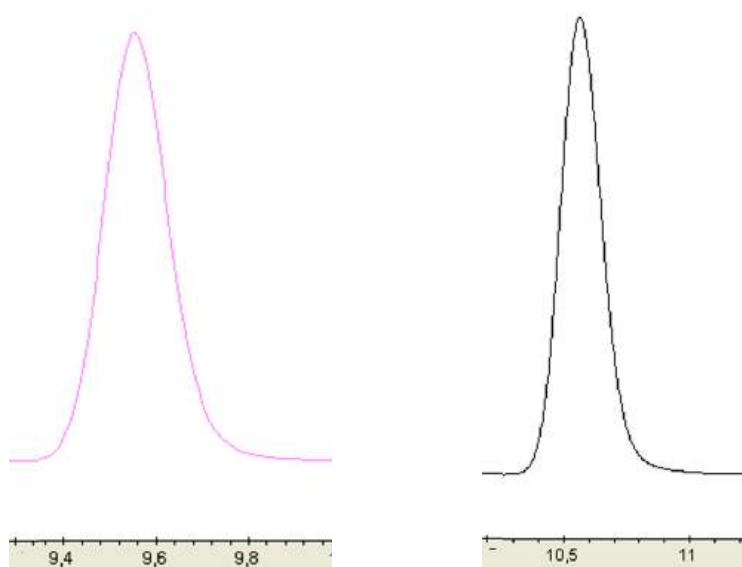
spadek — intensywność pików przy 21° maleje o ponad 70 %. Nie pojawiają się żadne dodatkowe refleksy charakterystyczne dla krystalicznego kostunolidu czy laktonu, zaś refleksy od fazy lipidowej stają się bardziej spłaszczone i szerokie, co jest typowe dla wzrostu zawartości fazy amorficznej. Tym samym można stwierdzić, że aktywne związki są równomiernie zatopione w lipidowej matrycy, utrudniając dalsze uporządkowanie cząsteczek lipidów. Nie obserwujemy odrębnych faz krystalicznych kostunolidu czy laktonu – najpewniej występują one w SLN w formie molekularnej lub amorficznej. Takie zmiany potwierdzają, że nanostruktura lipidowa skutecznie enkapsuluje i dysperguje związki w matrycy lipidowej, jednocześnie ograniczając ich rekrytalizację. Podobne obserwacje poczynili już Silva i Feng [163], [164].

Badanie efektywności enkapsulacji laktonów seskwiterpenowych w otrzymanych nanocząstkach lipidowych

Ocena efektywności enkapsulacji (EE) jest kluczowa przy doborze składu i warunków wytwarzania dyspersji nanocząstek lipidowych, ponieważ poziom włączenia substancji aktywnej do matrycy lipidowej bezpośrednio wpływa na stabilność formulacji, kinetykę uwalniania i spodziewany efekt biologiczny.

Badanie efektywności enkapsulacji laktonach seskwiterpenowych w syntetyzowanych nanocząstkach lipidowych obejmowało ilościowe oznaczenie ich niezainkorporowanej części znajdującej się w zewnętrznej fazie wodnej surfaktantu, z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w oparciu o nową, zwalidowaną metodę, opracowaną i scharakteryzowaną poniżej.

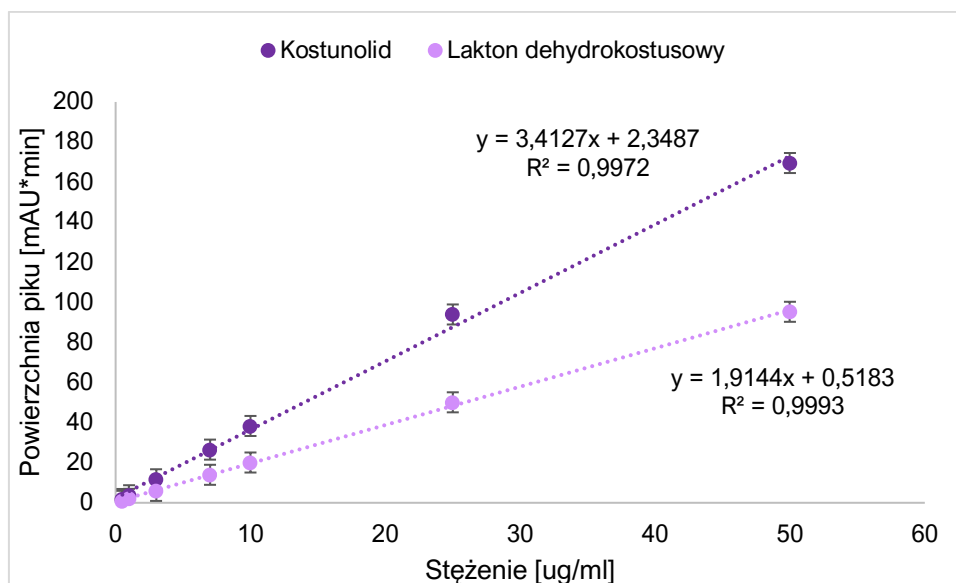
Na podstawie uzyskanych chromatogramów wyznaczono czasy retencji oznaczanych laktonów seskwiterpenowych – kostunolidu i laktonu dehydrokostusowego, wynoszące odpowiednio 9,55 min i 10,56 min (rys. 7.7).



Rys. 7.7. Wyznaczone czasy retencji kostunolidu i laktonu dehydrokostusowego na chromatogramach

W celu analizy ilościowej było sporządzenie krzywych kalibracyjnych dla kostunolidu oraz laktonu dehydrokostusowego, wykonanych na podstawie analizy

chromatograficznej przygotowanych w odpowiednim zakresie stężeń roztworów wzorcowych (rys. 7.8)



Rys. 7.8. Krzywe kalibracyjne dla badanych laktonów seskwiterpenowych rozpuszczonych w etanolu

Kolejno, dla każdej z przygotowanych krzywych kalibracyjnych wyznaczono równanie regresji liniowej oraz wartość współczynnika korelacji R^2 . Wartości obliczonych współczynników korelacji R^2 wyniosły dla kostunolidu i laktonu dehydrokostusowego, odpowiednio 0,9972 oraz 0,9993, mieszcząc się w zalecanym przedziale wartości 0,9–1,0, co wskazuje na szeroki zakres liniowości opracowanej metody. Ponadto, wysoka powtarzalność metody została zdeterminowana na podstawie uzyskanych wartości odchyłeń standardowych. Wyznaczone parametry walidacyjne opracowanej metody oznaczania laktonów seskwiterpenowych w formulacjach kosmetycznych kształtowały się na następującym poziomie: dla kostunolidu: LOD = 0,17 µg/ml; LOQ = 0,51 µg/ml, zaś dla laktonu dehydrokostusowego: LOD = 0,12 µg/ml; LOQ = 0,36 µg/ml.

Wyznaczono efektywność enkapsulacji (EE) obu badanych laktonów seskwiterpenowych w otrzymanych nanocząstkach lipidowych (EE obliczano jako procent substancji związanej w matrycy lipidowej względem całkowitej ilości dodanej do formulacji, po oddzieleniu frakcji wolnej przez wirowanie i ilościowym oznaczeniu zawartości wolnej frakcji metodą HPLC). Dla kostunolidu wyznaczono EE = 87,58%, natomiast dla laktonu dehydrokostusowego EE = 79,44%.

Różnica w uzyskanych wartościach EE jest zgodna z wynikami badań matrycy lipidowej i pomiarów fizykochemicznych. Brak wyraźnych pików topnienia odpowiadających substancjom aktywnym w krzywych DSC oraz brak odrębnych refleksów w dyfraktogramach XRD wskazują, że oba laktony zostały w dużej mierze rozproszone w matrycy lipidowej w formie molekularnej lub amorficznej — czynnik sprzyjający wysokiej enkapsulacji. Jednocześnie obserwowane różnice w stopniu zaburzenia matrycy (większe obniżenie temperatur topnienia i większy spadek entalpii dla próbki z laktonem) sugerują, że dehydrokostusowy silniej oddziałuje

z rdzeniem lipidowym, co może skutkować częściowym osłabieniem struktury nośnika i mniejszą retencją w porównaniu z kostunolidem.

Dane z pomiarów DLS (Z-Ave, Pdl) oraz zmiany potencjału zeta (ZP) również korelują z powyższym wnioskiem: próbki zawierające kostunolid wykazywały początkowo niższą tendencję do tworzenia dużych agregatów i korzystniejszy profil jednorodności, co wspiera wyższe EE; natomiast formułacje z laktonem cechowały się większym przyrostem średnicy i wyższą heterogenicznością, co może odpowiadać za nieco niższą wartość EE. Obrazy TEM potwierdziły te obserwacje — w preparatach HPH z kostunolidem widoczna była bardziej jednorodna populacja kulistych cząstek, podczas gdy w niektórych próbkach z laktonem obserwowano nieregularne skupiska i większe struktury.

7.3. Charakterystyka fizykochemiczna badanych formułacji kosmetycznych

W tym rozdziale zdefiniowano podstawowe parametry jakościowe opracowanych formułacji kosmetycznych: pH, lepkość, rozkład wielkości cząstek oraz stabilność fizyczną w teście wirowkowym. Pomiar pH służył weryfikacji zgodności preparatów z fizjologią skóry i ich bezpieczeństwa użytkowania, natomiast lepkość określała właściwości reologiczne decydujące o odczuciu sensorycznym i odporności na sedymentację/koalescencję. Analiza rozkładu wielkości cząstek pozwoliła ocenić jednorodność dyspersji i potencjalny wpływ na stabilność oraz biodostępność składników aktywnych. Test wirowkowy stanowił przyspieszoną próbę stabilności fizycznej, ujawniając tendencję do rozdziału faz, flokulacji lub sedymentacji w warunkach obciążenia mechanicznego. Zestaw tych oznaczeń daje spójny obraz jakości technologicznej preparatów i stanowi podstawę do dalszej optymalizacji składu.

pH przygotowanych formułacji kosmetycznych

pH jest jednym z kluczowych parametrów jakościowych preparatów dermokosmetycznych, determinującym ich zgodność ze skórą, stabilność fizykochemiczną oraz aktywność biologiczną zastosowanych substancji czynnych. Utrzymanie pH formułacji w zakresie fizjologicznym (zazwyczaj 4,5–6,8) jest niezbędne zarówno ze względów dermatologicznych, jak i technologicznych — wpływa na układ fazy wodnej, stabilność emulsji, właściwości reologiczne oraz potencjalne procesy degradacyjne. W przypadku układów zawierających związki wrażliwe chemicznie, takich jak laktony seskwiterpenowe, pH środowiska może dodatkowo oddziaływać na trwałość pierścienia laktonowego oraz jego reaktywność. Z tego względu ocena wpływu inkorporacji kostunolidu i laktonu dehydrokustusowego na odczyn różnych typów formułacji stanowi istotny etap ich charakterystyki technologicznej. W przypadku trzech otrzymanych układów oceniono wartości pH bezpośrednio po inkorporacji nanocząstek oraz po 90 dniach przechowywania w temperaturach 4 °C, 25 °C i 40 °C (tabela 7.5), aby określić wpływ substancji aktywnych na stabilność odczynu formułacji.

Tabela 7.5. Zmiany pH badanych formułacji kosmetycznych bazowych (E1, E2, O, H) oraz z dodatkiem laktonów seskwiterpenowych (-K) i (-L) w formie klasycznej przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych przez 90 dni

Rodzaj formułacji	Dzień 0	Temperatura 25°C	Temperatura 4°C	Temperatura 40°C
		Dzień 90	Dzień 90	Dzień 90
E1	6,76±0,03	6,73±0,03	6,80±0,01	6,76±0,02
E1-K	6,54 ±0,03	6,65 ±0,02	6,61 ±0,01	6,72 ±0,01
E1-L	6,66 ±0,02	6,67 ±0,01	6,76 ±0,01	6,64 ±0,02
E2	6,72 ± 0,02	6,74 ± 0,02	6,68 ± 0,03	6,65 ± 0,02
E2-K	6,43 ± 0,03	6,40 ± 0,02	6,38 ± 0,03	6,35 ± 0,02
E2-L	6,52 ± 0,02	6,48 ± 0,02	6,50 ± 0,03	6,47 ± 0,02
H	6,15 ± 0,02	6,14 ± 0,02	6,12 ± 0,03	6,09 ± 0,02
H-K	5,78 ± 0,03	5,66 ± 0,02	5,61 ± 0,03	5,52 ± 0,03
H-L	5,88 ± 0,02	5,80 ± 0,03	5,72 ± 0,02	5,65 ± 0,03
O	6,21 ± 0,02	6,18 ± 0,03	6,20 ± 0,02	6,19 ± 0,03
O-K	5,88 ± 0,03	5,92 ± 0,02	5,95 ± 0,02	5,91 ± 0,03
O-L	6,00 ± 0,02	5,97 ± 0,02	6,02 ± 0,02	5,98 ± 0,03

W analizowanych układach zaobserwowano, że dodatek laktonów seskwiterpenowych (-K) i (-L) prowadził do wyraźnego obniżenia wartości pH bezpośrednio po inkorporacji, przy czym skala zmian była zależna od rodzaju formułacji. W przypadku emulsji (E1 i E2) spadek pH wynosił odpowiednio około 0,2–0,3 jednostki, co odpowiada 3–4% względem wartości bazowych. Zarówno kostunolid, jak i lakton dehydrokustusowy dobrze integrowały się z fazą olejową układów emulsyjnych, a otrzymane formułacje zachowywały wartości pH w zakresie odpowiednim dermatologicznie. Nie obserwowano gwałtownych zmian odczynu po procesie przygotowania, co wskazuje na dobrą kompatybilność chemiczną laktonów z matrycą emulsyjną.

Inny charakter zmian odczynu stwierdzono w hydrożelach, które wykazywały wyraźnie większą wrażliwość na obecność substancji lipofilowych. Obniżenie pH po dodaniu kostunolidu (H-K) sięgało ok. 6%, a w przypadku laktonu dehydrokustusowego (H-L) ok. 4–5% względem formułacji bazowej. Zjawisko to można wiązać z ograniczoną rozpuszczalnością laktonów w środowisku hydrofilowym, miejscowym zakwaszeniem mikrośrodowiska oraz potencjalnymi

procesami hydrolizy pierścienia laktonowego w obecności wody. Wyniki te wskazują na niską kompatybilność laktonów seskwiterpenowych z matrycą hydrożelową, co może mieć znaczenie dla ich trwałości w takich układach.

Najmniejsze zmiany pH odnotowano w przypadku oleożeli zagęszczanych krzemionką koloidalną, w których obniżenie pH po dodaniu substancji aktywnych było ograniczone do ok. 0,2–0,3 jednostki. Oleożele są układami bezzwodnymi, co minimalizuje możliwość zachodzenia reakcji hydrolitycznych, a także zapewnia stabilne warunki mikrośrodowiska dla związków lipofilowych. Z tego względu stanowią one korzystną matrycę dla substancji takich jak kostunolid i lakton dehydrokustusowy pod względem stabilności odczynu.

Porównanie wszystkich formułacji wykazało ponadto, że kostunolid wywierał silniejszy wpływ na pH niż lakton dehydrokustusowy, niezależnie od typu układu. Może to wynikać z różnic w strukturze chemicznej, stopniu reaktywności pierścienia laktonowego oraz jego podatności na interakcje z komponentami fazy wodnej.

W celu poprawy stabilności fizykochemicznej oraz zbadania wpływu laktonów seskwiterpenowych na parametry odczynu formułacji, opracowano układy, w których kostunolid oraz lakton dehydrokustusowy zostały zaincorporowane w postaci stałych nanocząstek lipidowych (SLN) otrzymanych metodą HPH. Nośnik lipidowy oparto na Softisanie® 601 oraz surfaktancie Tween® 80, uzyskując stabilne dyspersje wodne dla układów emulsyjnych oraz liofilizaty wprowadzane do oleożeli. Dla celów porównawczych przygotowano również formułacje zawierające puste SLN (bez substancji aktywnych), co umożliwiło ocenę wpływu samego nośnika na właściwości fizykochemiczne.

W badaniach stabilności uwzględniono formułacje typu emulsji (E1 i E2) oraz oleożel (O). Hydrożel (H) został pominięty na dalszym etapie ze względu na stwierdzoną niestabilność pH i brak zgodności z laktonami seskwiterpenowymi w wersjach zawierających substancje w postaci wolnej. W przypadku trzech pozostałych układów oceniono wartości pH bezpośrednio po inkorporacji nanocząstek oraz po 90 dniach przechowywania w temperaturach 4°C, 25°C i 40°C (tabela 7.6), aby określić wpływ zarówno pustych, jak i SLN z substancjami aktywnymi na stabilność odczynu formułacji.

Tabela 7.6. Zmiany pH badanych formułacji kosmetycznych bazowych (E1, E2, O, H) oraz z dodatkiem nanocząstek lipidowych enkapsulowanych laktonami seskwiterpenowymi (-NK) i (-NL) przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych przez 90 dni

Rodzaj formułacji	Dzień 0	Temperatura 25°C	Temperatura 4°C	Temperatura 40°C
		Dzień 90	Dzień 90	Dzień 90
E1-SLN	6,64 ± 0,03	6,62 ± 0,02	6,65 ± 0,02	6,60 ± 0,03
E1-NK	6,50 ± 0,02	6,51 ± 0,02	6,53 ± 0,02	6,49 ± 0,03
E1-NL	6,57 ± 0,02	6,58 ± 0,01	6,60 ± 0,02	6,56 ± 0,02
E2-SLN	6,60 ± 0,02	6,58 ± 0,03	6,59 ± 0,02	6,55 ± 0,03
E2-NK	6,46 ± 0,02	6,45 ± 0,03	6,44 ± 0,02	6,42 ± 0,02
E2-NL	6,50 ± 0,02	6,49 ± 0,02	6,51 ± 0,02	6,48 ± 0,02
H-SLN	6,17 ± 0,02	6,16 ± 0,02	6,18 ± 0,02	6,16 ± 0,02
H-NK	5,99 ± 0,03	5,98 ± 0,02	6,00 ± 0,03	5,97 ± 0,02
H-NL	6,03 ± 0,02	6,02 ± 0,02	6,04 ± 0,02	6,01 ± 0,02
O-SLN(L)	6,64 ± 0,03	6,62 ± 0,02	6,65 ± 0,02	6,60 ± 0,03
O-NK(L)	6,50 ± 0,02	6,51 ± 0,02	6,53 ± 0,02	6,49 ± 0,03
O-NL(L)	6,57 ± 0,02	6,58 ± 0,01	6,60 ± 0,02	6,56 ± 0,02

(L) oznacza użycie nanocząstek lipidowych w formie liofilizowanej

Wprowadzenie pustych oraz aktywnych SLN do formułacji wpłynęło na wartości pH układów, jednak w znacznie mniejszym stopniu niż w przypadku bezpośredniej inkorporacji substancji w postaci wolnej. We wszystkich badanych systemach zmiany odczynu były niewielkie i mieściły się w zakresie dermatologicznie akceptowalnym (4,5–6,8). Co istotne, dodatek pustych SLN powodował umiarkowane obniżenie pH w porównaniu z formułacjami bazowymi, średnio o 0,1–0,2 jednostki, co można wiązać z lekko kwaśnym charakterem środowiska dyspersji SLN (Tween® 80, Softisan® 601). Zmiany te były stabilne w czasie przechowywania i nie wykazywały tendencji do dalszego obniżania odczynu.

Po wprowadzeniu SLN zawierających kostunolid lub lakton dehydrokostusowy obserwowano dodatkowe niewielkie obniżenie pH, zazwyczaj o 0,05–0,15 jednostki względem układów z pustymi cząstkami. Skala tych zmian była wyraźnie mniejsza niż w przypadku substancji wolnych, co sugeruje, że matryca lipidowa SLN częściowo ogranicza kontakt laktonów z wodnym środowiskiem formułacji i działa

stabilizująco na ich właściwości chemiczne. Różnice między kostunolidem a laktonem dehydrokustusowym utrzymywały się — kostunolid powodował nieco silniejsze zakwaszenie środowiska, co jest zgodne z obserwacjami dla układów zawierających substancję wolną.

W emulsjach (formulacje 1 i 2) zmiany pH po dodaniu pustych SLN były umiarkowane i stabilne przez cały okres przechowywania, natomiast dodatek aktywnych nanocząstek skutkował dodatkowymi spadkami rzędu 0,1–0,2 jednostki. Nie zaobserwowano gwałtownych zmian w czasie — różnice po 90 dniach nie przekraczały 0,05 jednostki w żadnym z warunków temperaturowych, co świadczy o dobrej stabilności emulsji zawierających SLN oraz o efektywnej ochronie substancji aktywnych w matrycy lipidowej. Niewielkie różnice pomiędzy formulacjami 1 i 2 mogą wynikać z odmiennego sposobu przygotowania (na zimno vs na ciepło), co może wpływać na strukturę fazy wodnej i interakcje międzyfazowe.

W oleożelu (formulacja 4) wprowadzenie pustych liofilizatów SLN praktycznie nie wpłynęło na pH, co jest zgodne z charakterem układu bezzwodnego. Dodatek aktywnych SLN powodował jedynie minimalne obniżenie wartości pH (0,15–0,2 jednostki) bez dalszych istotnych zmian w czasie przechowywania. Oleożele stanowiły najstabilniejsze środowisko spośród badanych — niezależnie od rodzaju SLN i temperatury, odczyn pozostawał praktycznie niezmienny.

Podsumowując, wyniki wskazują, że zastosowanie SLN jako nośnika dla laktonów seskwiterpenowych skutecznie ogranicza negatywny wpływ tych substancji na pH formulacji, jednocześnie nie powodując istotnej destabilizacji układów. Największe różnice względem baz odnotowano po dodaniu kostunolidu, natomiast lakton dehydrokustusowy wpływał słabiej. Emulsje wykazywały bardzo dobrą stabilność, a oleożele były praktycznie niewrażliwe na obecność zarówno pustych, jak i aktywnych SLN, co potwierdza ich potencjał jako matryc dla substancji lipofilowych.

Badanie lepkości otrzymanych formulacji kosmetycznych

Właściwości reologiczne preparatów kosmetycznych stanowią jeden z kluczowych parametrów charakteryzujących zarówno ich stabilność fizyczną, jak i percepcję sensoryczną podczas aplikacji. Lepkość oraz inne parametry reologiczne determinują m.in. rozprowadzalność produktu, jego odczuwalną konsystencję, szybkość uwalniania substancji czynnych oraz odporność na procesy destabilizacyjne, takie jak koalescencja, flokulacja czy kremowanie [165]. Analiza zmian lepkości w czasie przechowywania stanowi standardowy element oceny jakości i trwałości układów dyspersyjnych, a zmiany tego parametru mogą wskazywać na zachodzące w matrycy procesy restrukturyzacyjne [166]

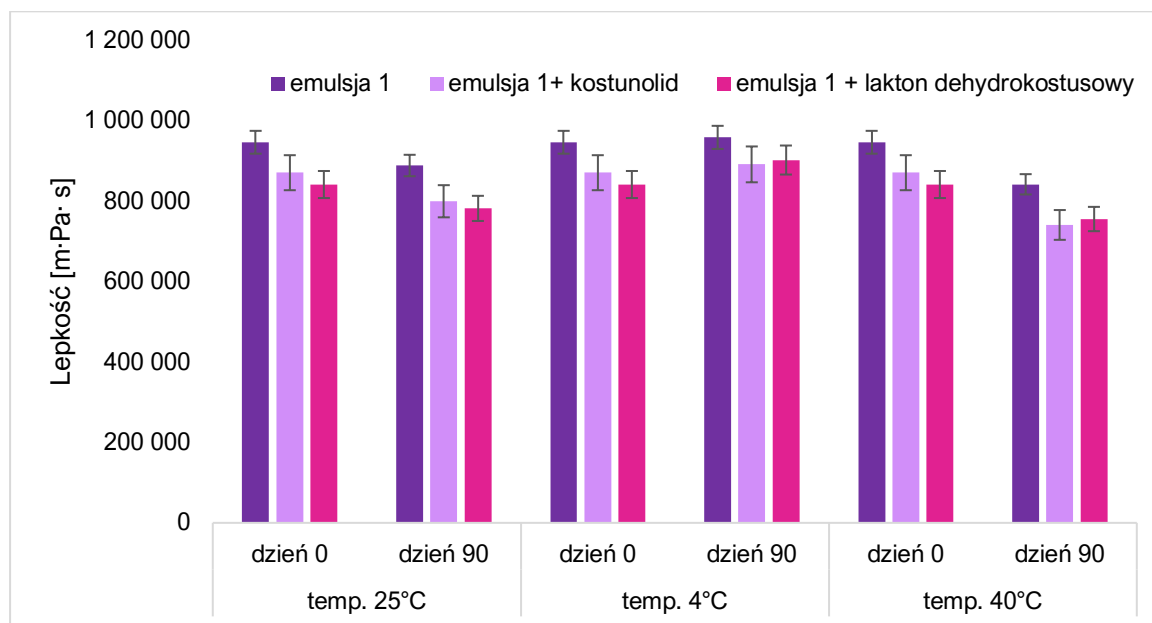
W szczególności emulsje kosmetyczne, ze względu na swoją dwufazową strukturę, są bardzo wrażliwe na czynniki zewnętrzne oraz obecność związków aktywnych, które mogą wpływać na ich organizację przestrzenną oraz właściwości reologiczne [167]

W niniejszych badaniach oceniono stabilność reologiczną czterech typów formulacji: emulsji typu O/W otrzymanej metodą na zimno (E1), emulsji typu O/W wytwarzanej metodą na ciepło (E2), oleożelu (O) oraz hydrożelu (H). Szczególną

uwagę zwrócono na wpływ wybranych laktonów seskwiterpenowych na właściwości układów w różnych warunkach przechowywania. Badania prowadzono bezpośrednio po przygotowaniu formulacji (dzień 0) oraz po 90 dniach przechowywania w temperaturze 4 °C, 25 °C i 40 °C.

Emulsja 1 (E1) została przygotowana metodą na zimno, tego typu emulsje charakteryzują się zwykle wysoką lepkością początkową oraz dobrą stabilnością reologiczną [168]. Początkowa lepkość emulsji bazowej wynosiła około 1×10^6 mPa·s (rys. 7.9), co jest wartością typową dla układów emulsyjnych zawierających sieci strukturalne stabilizowane polimerami lub zagęstnikami [78]. Dodatek kostunolidu (E1-K) oraz laktonu dehydrokustusowego (E1-L) spowodował zauważalne obniżenie lepkości początkowej o około 15% i 25% w porównaniu do emulsji bazowej. Efekt ten może wynikać z oddziaływania tych związków z matrycą emulsyjną, w szczególności z siecią tworzoną przez emulgator i fazę olejową. Substancje aktywne o charakterze lipofilowym mogą lokalizować się na granicy faz, zmieniając organizację micelną i wpływając na właściwości lepkością układu [169].

Po 90 dniach przechowywania zaobserwowano umiarkowany spadek lepkości we wszystkich próbach, przy czym największe zmiany wystąpiły w temperaturze 40°C. W przypadku emulsji bazowej spadek wyniósł ok. 10%, natomiast w układach zawierających kostunolid i lakton dehydrokustusowy wartości te były odpowiednio wyższe (12–15% i ok. 20%). Mniejsze różnice obserwowano dla temperatury chłodniczej (4°C), co jest zgodne z literaturą wskazującą na stabilizujący wpływ niższych temperatur, ograniczających mobilność cząsteczek i spowalniających procesy koalescencji [170].

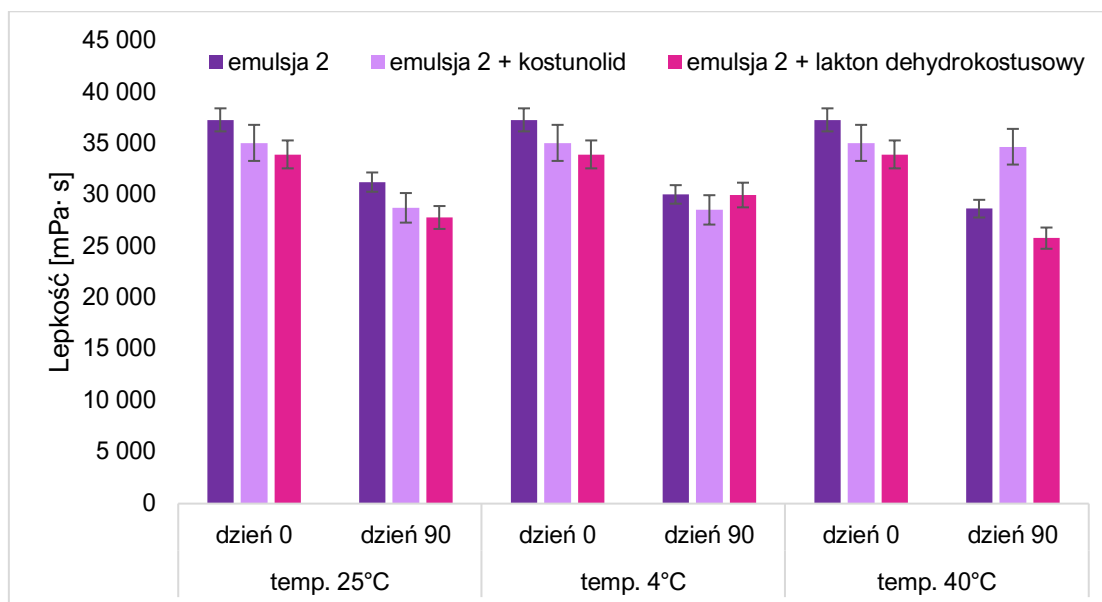


Rys. 7.9. Zmiany lepkości emulsji 1 z dodatkiem laktonów seskwiterpenowych przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych przez 90 dni

Zmiany lepkości potwierdzają, że obecność laktonów seskwiterpenowych wpływa nie tylko na początkową strukturę emulsji, ale także na jej długoterminową stabilność reologiczną.

Emulsja 2 (E2) została przygotowana metodą na ciepło, tego typu emulsje wykazują zwykle niższe wartości lepkości początkowej niż emulsje przygotowane metodą na zimno, jednak są stabilizowane przez sieci krystaliczne powstałe podczas chłodzenia fazy olejowej [171]. Początkowa lepkość emulsji bazowej wynosiła 37 300 mPa·s (rys. 7.10), co mieści się w typowym zakresie dla kosmetycznych emulsji typu O/W zawierających tłuszcze roślinne i alkohole tłuszczowe [172]. W trakcie przechowywania zaobserwowano stopniowy spadek lepkości — po 90 dniach wartości te zmniejszyły się odpowiednio o 16,23% w temperaturze 25°C, 19% w 4 °C oraz 23% w 40 °C. Trend ten jest zgodny z obserwacjami literaturowymi, które wskazują, że w emulsjach zawierających krystaliczne emolienty i tłuszcze roślinne struktura układu ulega z czasem częściowej reorganizacji, prowadząc do obniżenia lepkości [173].

Po dodatku laktonów seskwiterpenowych dalszy spadek lepkości względem emulsji bazowej – podczas rozpoczęcia badania lepkość emulsji 2 z dodatkiem kostunolidu (E2-K) była niższa o ok. 13, a emulsji 2 z dodatkiem laktonu dehydrokustusowego (E2-L) o ok. 20–25%. Efekt utrzymywał się po 90 dniach i nasilał przy 40 °C.



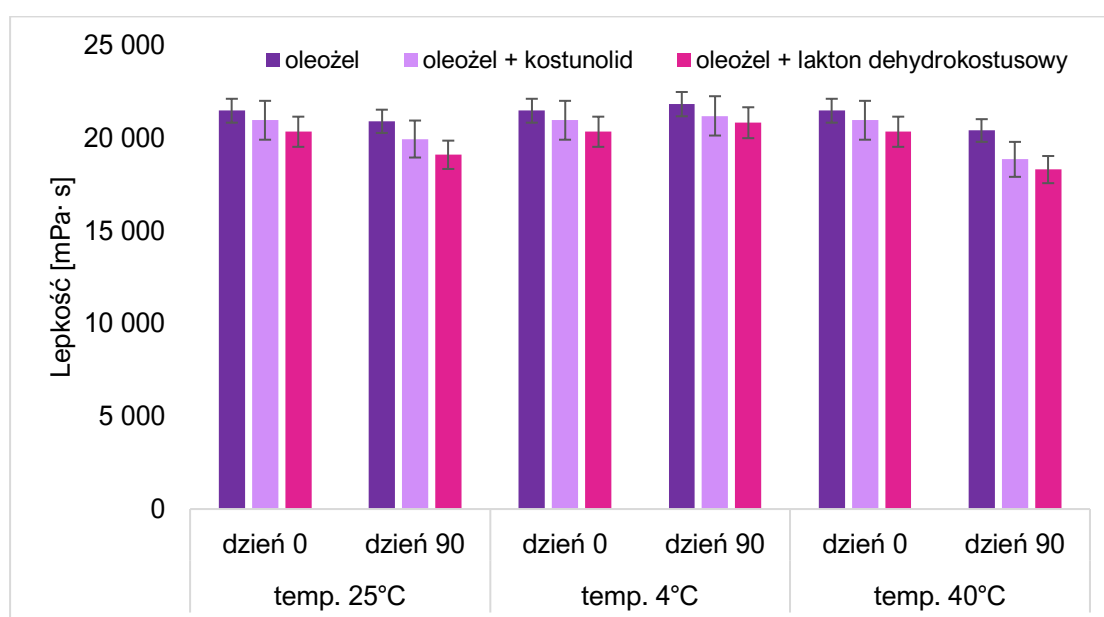
Rys. 7.10. Zmiany lepkości emulsji 2 z dodatkiem laktonów seskwiterpenowych przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych przez 90 dni

W przypadku oleożeli (O), lepkość jest determinowana głównie przez stopień usieciowania struktury przestrzennej tworzonej przez cząstki krzemionki w medium olejowym [174].

Początkowa lepkość bazowego oleożelu mieściła się w zakresie typowym dla układów kosmetycznych tego typu i wynosiła około 42 000 mPa·s. (rys. 7.11). W literaturze podkreśla się, że stabilność reologiczna oleożeli zależy zarówno od rodzaju zastosowanego oleju, jak i zawartości oraz morfologii krzemionki koloidalnej [175]

Po 90 dniach przechowywania zaobserwowano niewielkie spadki lepkości w formulacji bazowej, nieprzekraczające 10% w żadnym z badanych warunków temperaturowych, co wskazuje na stosunkowo dobrą stabilność sieci oleożelowej.

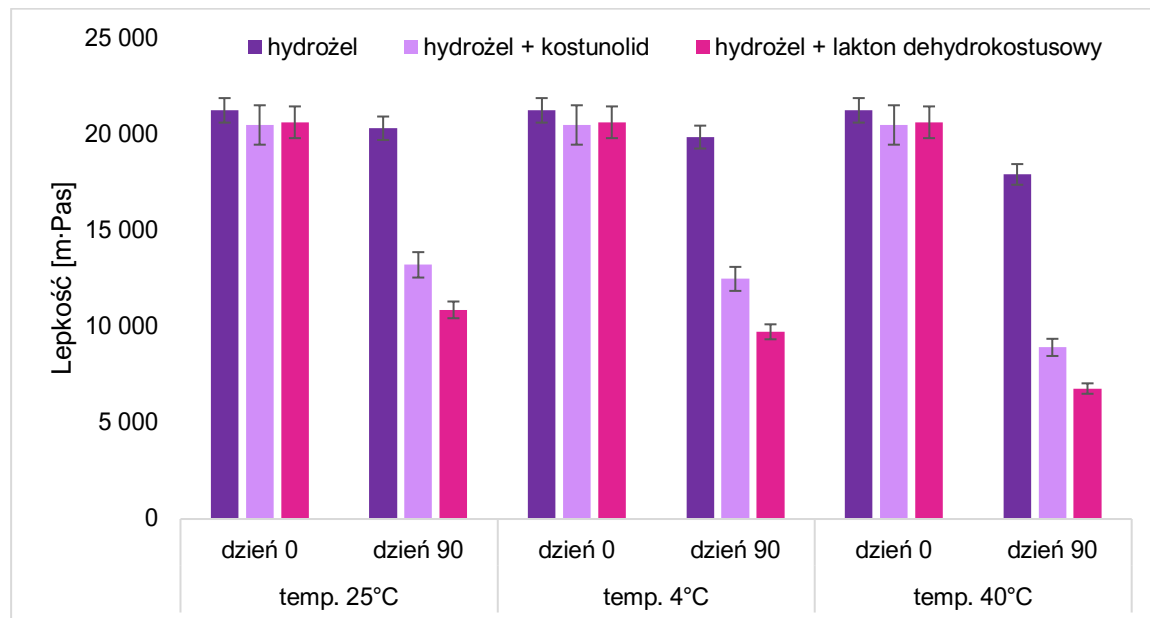
Wprowadzenie kostunolidu i laktonu dehydrokostusowego do struktury oleożelu spowodowało jednak wyraźne obniżenie wartości lepkości początkowej, odpowiednio o około 14% (O-K) i 22% (O-L) w stosunku do układu bazowego. Wyniki te sugerują, że obecność laktonów może zaburzać strukturę sieci krzemionkowej, prawdopodobnie poprzez częściową adsorpcję na powierzchni cząstek krzemionki, co zmienia charakter oddziaływań między nimi i prowadzi do osłabienia wiązań strukturalnych [176]. Po okresie przechowywania największe zmiany odnotowano dla próbek przechowywanych w podwyższonej temperaturze (40 °C), gdzie spadki lepkości sięgały 20–25%. W warunkach chłodniczych zmiany były znacznie mniejsze (8–12%), co sugeruje, że sieć oleożelowa jest wrażliwa głównie na czynniki termiczne, a nie na długotrwałe przechowywanie. Trendy te są zgodne z obserwacjami literaturowymi dla układów oleożelowych zawierających substancje lipofilowe [177].



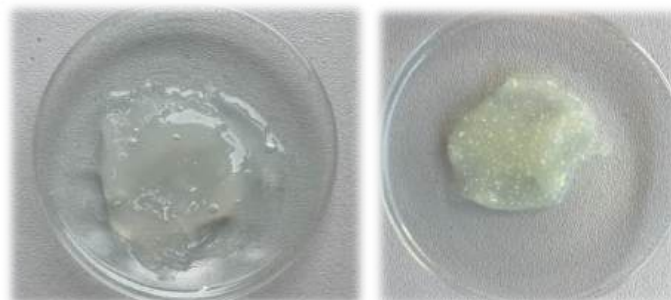
Rys. 7.11. Zmiany lepkości oleożeli z dodatkiem laktonów seskwiterpenowych przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych przez 90 dni.

W odróżnieniu od emulsji i oleożeli, hydrożele (H) wykazały najmniejszą stabilność spośród badanych układów. Formulacja bazowa początkowo charakteryzowała się bardzo wysoką lepkością około 21 000 mPa·s (rys. 7.12), co jest zgodne z charakterystyką roztworów/żeli ksantanowych w tym zakresie stężeń i z ich dobrze opisaną, silnie ścinaniowo-rozrzedzającą reologią [178]. Po trzymiesięcznym przechowywaniu lepkość hydrożelu bazowego obniżyła się umiarkowanie (ok. 4–15% w zależności od temperatury), co można wiązać z powolną relaksacją sieci polisacharydowej oraz wpływem temperatury na konformację i lepkość gumy ksantanowej [179]. Znacznie większe zmiany zaobserwowano natomiast w hydrożelach z laktonami seskwiterpenowymi: po 90 dniach w 40°C spadki lepkości sięgały odpowiednio 54% (kostunolid) i 66%, czemu towarzyszyła makroskopowa destabilizacja (precypitacja i żółtawe aglomeraty widoczne na rys. 7.13). Wskazuje to na niską kompatybilność związków silnie lipofilowych z hydrożelową matrycą wodną.

Literatura podkreśla, że hydrofobowe leki w hydrożelach wodnych mają tendencję do wytrącania się i zaburzania ciągłości sieci (o ile nie zastosuje się strategii solubilizacji, np. cyklodekstryn) [177]. W warunkach chłodniczych zmiany były mniejsze, ale nadal zauważalne zależnie od laktonu — co potwierdza wrażliwość układu na czynniki termiczne i powolne przemiany strukturalne [175].



Rys. 7.12. Zmiany lepkości hydrożeli z dodatkiem laktonów seskwiterpenowych przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych przez 90 dni



Rys. 7.13. Wygląd hydrożelu z dodatkiem kostunolidu bezpośrednio po preparatyce oraz przechowywanego w temperaturze 40°C przez 90 dni

Podsumowując, zarówno w przypadku oleożeli, jak i hydrożeli, wyniki jednoznacznie wskazują, że wprowadzenie kostunolidu i laktonu dehydrokostusowego prowadzi do obniżenia lepkości początkowej oraz przyspieszenia degradacji struktury w czasie przechowywania, szczególnie w warunkach podwyższonej temperatury. Zjawiska te należy wiązać z właściwościami fizykochemicznymi badanych laktonów, które jako związki lipofilowe mogą zaburzać sieci strukturalne zarówno w układach polisacharydowych, jak i w strukturach krzemionkowych. Emulsje typu O/W zachowały dobrą stabilność, natomiast wprowadzenie kostunolidu laktonu dehydrokostusowego powodowało umiarkowane obniżenie lepkości początkowej oraz nieznaczne osłabienie struktury w czasie przechowywania. W oleożelach laktony prowadziły do częściowego rozluźnienia sieci krzemionkowej, a w hydrożelach ksantanowych do znacznego spadku lepkości i utraty

jednorodności. Wyniki potwierdzają, że wpływ laktonów seskwiterpenowych na stabilność reologiczną jest zależny od typu układu, a największą trwałość wykazują emulsje.

Badanie rozkładu wielkości cząstek otrzymanych formułacji kosmetycznych (technika dyfrakcji laserowej)

Rozkład wielkości cząstek (PSD) stanowił kluczowy parametr oceny jednorodności i stabilności fizykochemicznej otrzymanych formułacji kosmetycznych. Pomiary wykonano techniką dyfrakcji laserowej w trybie objętościowym, analizując zmiany rozkładu oraz parametru $d(0,9)$ po 90 dniach przechowywania w temperaturach 4 °C, 25 °C i 40 °C. Wyniki zestawiono w tabeli 7.7.

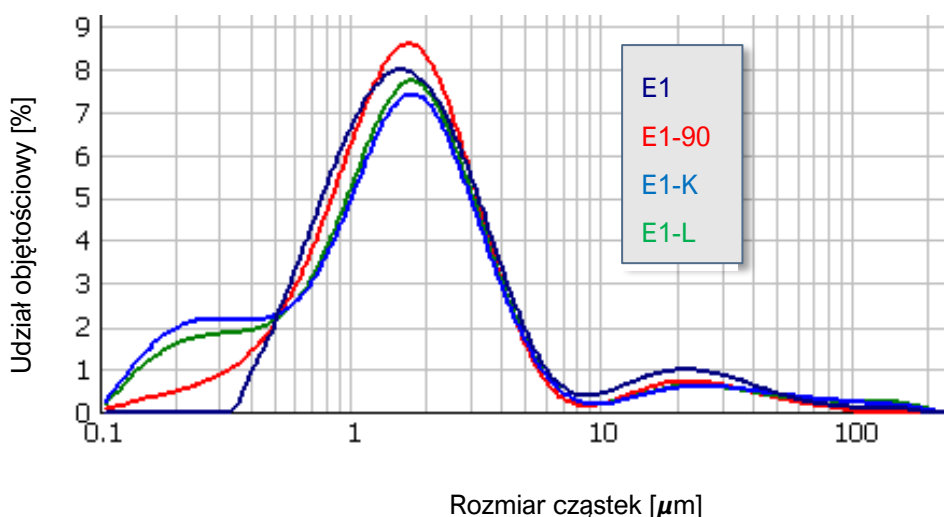
Tabela 7.7. Uzyskane wartości parametru $d(0,9)$ dla otrzymanych formułacji kosmetycznych

Rodzaj formułacji	Dzień 0	Temperatura 25°C	Temperatura 4°C	Temperatura 40°C
		Dzień 90	Dzień 90	Dzień 90
E1	5,867 ± 0,188	6,723 ± 0,235	8,923 ± 0,422	12,363 ± 0,781
E1-K	6,975 ± 0,212	8,103 ± 0,276	11,263 ± 0,560	15,642 ± 1,057
E1-L	7,800 ± 0,256	10,962 ± 0,424	15,431 ± 0,886	20,865 ± 1,430
E2	6,784 ± 0,214	8,537 ± 0,382	11,236 ± 0,673	6,784 ± 0,214
E2-K	7,109 ± 0,231	9,048 ± 0,406	12,371 ± 0,721	7,109 ± 0,231
E2-L	8,318 ± 0,278	10,923 ± 0,547	14,847 ± 0,987	8,318 ± 0,278
H	305,842 ± 0,912	345,913 ± 1,210	382,467 ± 1,752	446,128 ± 2,486
H-K	328,719 ± 1,024	375,284 ± 1,432	415,906 ± 1,985	482,773 ± 2,731
H-L	335,206 ± 1,087	392,458 ± 1,571	440,993 ± 2,176	508,614 ± 2,964
O	85,237 ± 0,412	90,118 ± 0,505	114,672 ± 1,238	134,905 ± 1,764
O-K	95,084 ± 0,538	110,356 ± 0,742	125,741 ± 1,389	145,982 ± 2,041
O-L	100,193 ± 0,611	130,447 ± 1,105	145,628 ± 1,672	165,319 ± 2,315

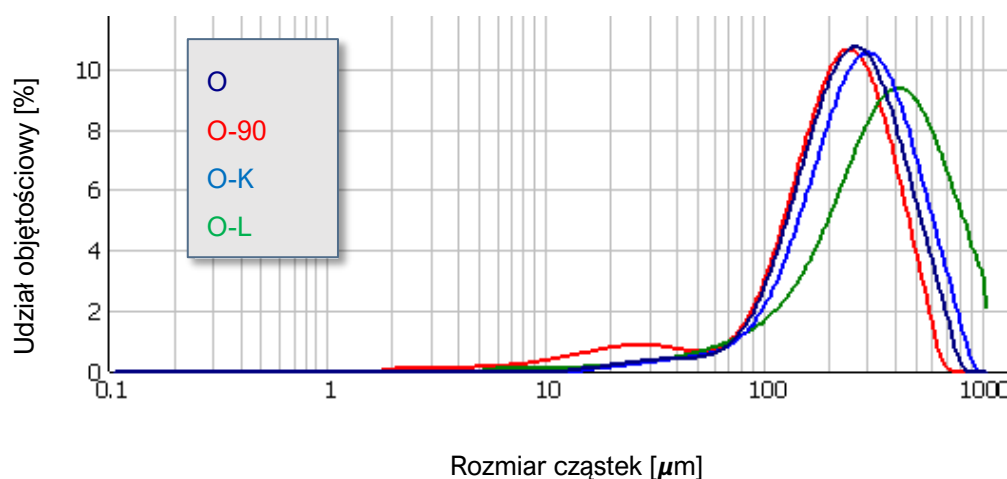
Uzyskane dane wskazują na systematyczny wzrost wartości $d(0,9)$ wraz z czasem i temperaturą, co odzwierciedla narastanie frakcji cząstek o większych średnicach – zjawisko typowe dla procesów koalescencji lub agregacji. Największe zmiany rozmiaru cząstek obserwowano w emulsjach, zwłaszcza w układach zawierających lakton dehydrokostusowy (E1-L), gdzie wartość $d(0,9)$ wzrosła ponad dwukrotnie po 90 dniach w 40 °C (z 7,8 μm do 20,9 μm , tj. +168%). Dla próbki z kostunolidem (E1-K) wzrost był umiarkowany (+124%), a dla emulsji bazowej E1 nieco niższy (+111%). Oleożele charakteryzowały się umiarkowanymi zmianami (przyrosty +54–65%), natomiast hydrożele wykazywały najwyższą stabilność – wzrost $d(0,9)$ o 46–52% po 90 dniach w 40 °C. Dane te wskazują, że zwiększenie temperatury przechowywania prowadzi do rozszerzenia rozkładu wielkości cząstek we wszystkich typach układów, przy czym stopień tego efektu jest zależny od rodzaju formulacji i obecności substancji aktywnej.

Analiza kształtu krzywych PSD (rys. 7.14–7.16) potwierdza uzyskane wyniki. Dla wszystkich układów bazowych obserwowano rozkłady o charakterze mono- lub bimodalnym, z dominującą frakcją w zakresie 5–7 μm (dla emulsji), 80–100 μm (dla oleożeli) i 300–350 μm (dla hydrożeli). Wprowadzenie substancji aktywnych wpływało na niewielkie poszerzenie krzywych, szczególnie w obszarze większych średnic, co manifestowało się wyraźniejszym „prawym ogonem” rozkładu. Efekt ten był bardziej widoczny dla laktonu dehydrokostusowego niż dla kostunolidu, co sugeruje jego silniejsze oddziaływanie z fazą rozproszoną i potencjalne obniżenie stabilności fizycznej emulsji.

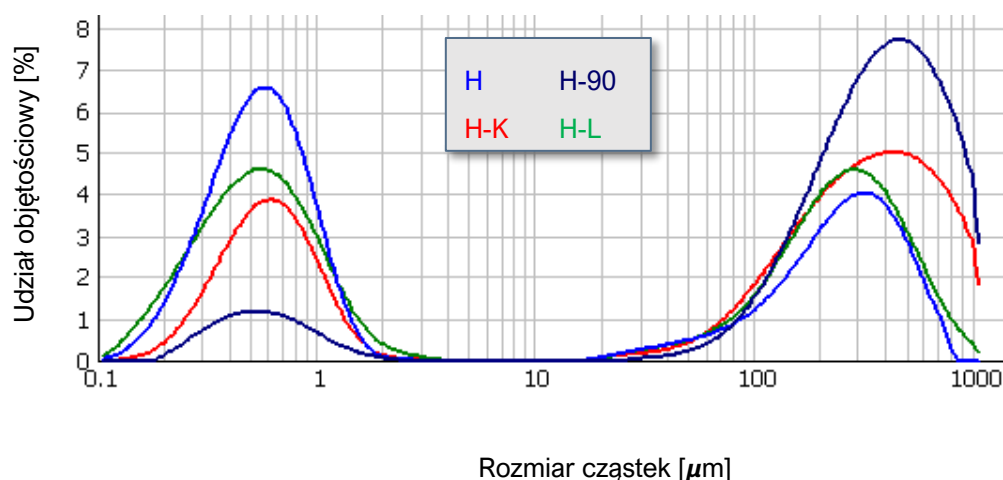
Nie stwierdzono jednak powstawania nowych, odrębnych pików w zakresie dużych średnic, co oznacza brak wyraźnych procesów flokulacji lub separacji fazy olejowej. Zmiany miały charakter ilościowy (poszerzenie i przesunięcie maksimum), a nie jakościowy, co potwierdza zachowanie ogólnej spójności strukturalnej formulacji w czasie przechowywania.



Rys. 7.14. Porównanie rozkładu wielkości cząstek emulsji E1 po 90 dniach przechowywania w 25°C (E1-90) oraz z dodatkiem kostunolidu (E1-K) i laktonu dehydrokostusowego (E1-L)



Rys. 7.15. Porównanie rozkładu wielkości cząstek formułacji oleożeli po 90 dniach przechowywania w 40°C (O-90) oraz z dodatkiem kostunolidu (O-K) i laktonu dehydrokustusowego (O-L)



Rys. 7.16. Porównanie rozkładu wielkości cząstek hydrożeli po 90 dniach przechowywania w 4°C (H-90) oraz z dodatkiem kostunolidu (H-K) i laktonu dehydrokustusowego (H-L)

W ujęciu typologicznym można stwierdzić, że hydrożele wykazywały największą podatność na wzrost rozmiaru cząstek, emulsje – stabilność pośrednią, a oleożele – najwyższą odporność dyspersyjną. Obecność kostunolidu powodowała umiarkowane zwiększenie średnicy cząstek, natomiast lakton dehydrokustusowy nasilał proces agregacji, szczególnie w układach emulsyjnych, co potwierdzają zarówno wartości $d(0,9)$, jak i kształt krzywych PSD.

Podsumowując, technika dyfrakcji laserowej pozwoliła na jednoznaczne określenie wpływu rodzaju formułacji, substancji aktywnej oraz warunków przechowywania na stabilność fizyczną badanych preparatów. Wyniki wskazują, że wszystkie formułacje utrzymały względną stabilność dyspersyjną, jednak długotrwałe przechowywanie w podwyższonej temperaturze sprzyjało poszerzeniu rozkładu cząstek, szczególnie w przypadku emulsji zawierających lakton dehydrokustusowy.

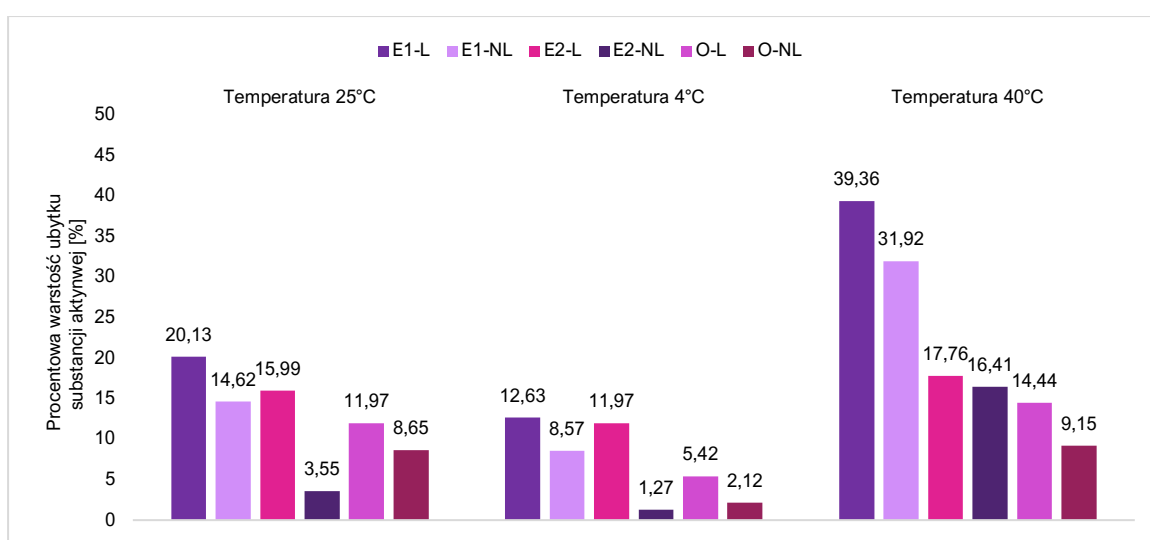
Badanie stabilności otrzymanych formułacji kosmetycznych (test wirówkowy)

W ramach przeprowadzonych badań stabilnościowych test wirówkowy pełnił funkcję etapu wstępnego, mającego na celu weryfikację przydatności badanych formułacji kosmetycznych do dalszych analiz. W badaniu tym oceniano występowanie ewentualnych oznak destabilizacji układów. Podczas 90-dniowej obserwacji wszystkich próbek nie stwierdzono żadnych istotnych zmian reologicznych, niezależnie od warunków temperaturowych przechowywania, poza formułacji hydrożelową z dodatkiem laktonów dehydrokostonowych (rys. 7.13).

Po inkorporacji substancji aktywnych w postaci laktonów seskwiterpenowych zaobserwowano wyraźne pogorszenie stabilności fizycznej preparatów podczas przechowywania. Początkowo uzyskane układy miały jednorodną strukturę, jednak po kilku miesiącach przechowywania stwierdzono wyraźne rozwarstwienie oraz obecność licznych żółtawych aglomeratów. Zjawisko to świadczy o niskiej kompatybilności laktonów z hydrożelową matrycą, prawdopodobnie związanej z ograniczoną rozpuszczalnością substancji aktywnych oraz ich migracją i agregacją w sieci polisacharydowej. Ze względu na obserwowaną niestabilność fizyczną, formułacje hydrożelowe zostały wykluczone z dalszych badań stabilności.

Badanie stabilności chemicznej wybranych laktonów seskwiterpenowych w otrzymanych formułacjach kosmetycznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Badanie stabilności chemicznej substancji czynnych stanowi zasadniczy element oceny jakości i przydatności technologicznej formułacji kosmetycznych. W przypadku laktonów seskwiterpenowych, podatnych na procesy hydrolizy, utleniania oraz na oddziaływania z komponentami matrycy, konieczne jest ilościowe monitorowanie zmian zawartości w czasie i w różnych warunkach przechowywania. W niniejszej pracy zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) do oznaczania laktonów po ich ekstrakcji z układów o odmiennej strukturze (emulsje O/W wytwarzane „na zimno” i „na ciepło” oraz oleożele). Badanie obejmował próby długoterminowe (25°C) oraz przyspieszone (4°C, 40°C) w horyzoncie 90 dni, a wyniki przedstawiono jako procentowy ubytek substancji względem stanu początkowego (rys. 7.17). Kryteria akceptacji stabilności zdefiniowano przed rozpoczęciem badań, z uwzględnieniem specyfiki matrycy i charakteru badanych związków, co umożliwia porównawczą ocenę wpływu rodzaju nośnika i ewentualnej enkapsulacji na zachowanie laktonów w warunkach eksploatacyjnych.



Rys. 7.17. Ubytek laktonu dehydrokostusowego po 90 dniach przechowywania w 4°C, 25°C i 40°C w formulacjach E1, E2 i O, w postaci wolnej (L) oraz enkapsulowanej w SLN (NL).

W emulsji 2 tempo ubytku kostunolidu było najwyższe i silnie zależne od temperatury (rys. 7.17). Po 90 dniach po przechowywaniu w temperaturze 40°C zawartość spadła do poziomu odpowiadającego 27,50% ubytku, podczas gdy w 25°C było to 13,49%. Enkapsulacja w SLN wyraźnie łagodziła te zmiany (E1-NK: 21,69% w 40°C i 6,14% w 25°C), ale nie eliminowała wrażliwości układu. Emulsja 2 okazała się stabilniejsza — straty były umiarkowane i dodatkowo ograniczane przez SLN (z 11,37% do 4,87% w 25°C; z 16,74% do 9,84% w 40°C). Najlepszy profil ochronny uzyskał oleożel, w którym ubytek pozostawał niski w całym zakresie temperatur, a szczególnie przy 40°C (5,14% dla formy wolnej i 3,45% po enkapsulacji). W niskiej temperaturze (4°C) wszystkie układy, poza E1, utrzymywały ubytek na poziomie kilku procent.

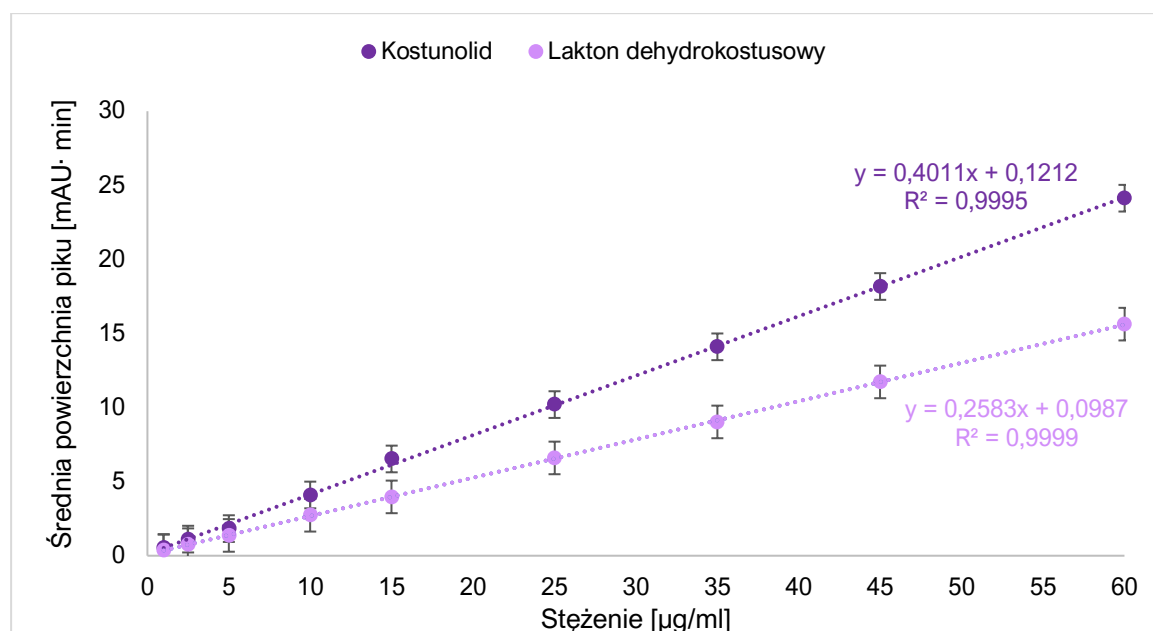
Dla laktonu różnice między matrycami były jeszcze wyraźniejsze. Podczas przechowywania emulsji 1 (E1) ubytek laktonu był największy (nawet do 39,36% w 40°C), choć enkapsulacja ograniczała ten spadek (E1-NL – 31,92%). W emulsji 2 spadki wartości były niższe i zbliżone między wariantami, przy czym SLN dawały stałą, umiarkowaną poprawę (np. o około 3% w 25°C). Oleożel zapewniał najwyższą ochronę w warunkach łagodnych (w 25°C: 3,55% dla formy wolnej), natomiast stosowanie wysokiej temperatury podczas przechowywania 40°C wskazało dość wyraźną korzyść z enkapsulacji (14,44% → 9,15% w 40°C). W 4°C oba warianty oleożelu utrzymywały ubytek na bardzo niskim poziomie (do 2,12% po enkapsulacji).

Zmiany stężenia rosną wraz z temperaturą i są silnie zależne od architektury nośnika: oleożel jest najbezpieczniejszym środowiskiem, emulsja „na ciepło” przewyższa stabilnością wariant „na zimno”, a enkapsulacja w SLN konsekwentnie poprawia retencję obu laktonów — szczególnie w warunkach podwyższonej temperatury.

Badanie efektywności uwalniania laktonów seskwiterpenowych z otrzymanych formuacji kosmetycznych

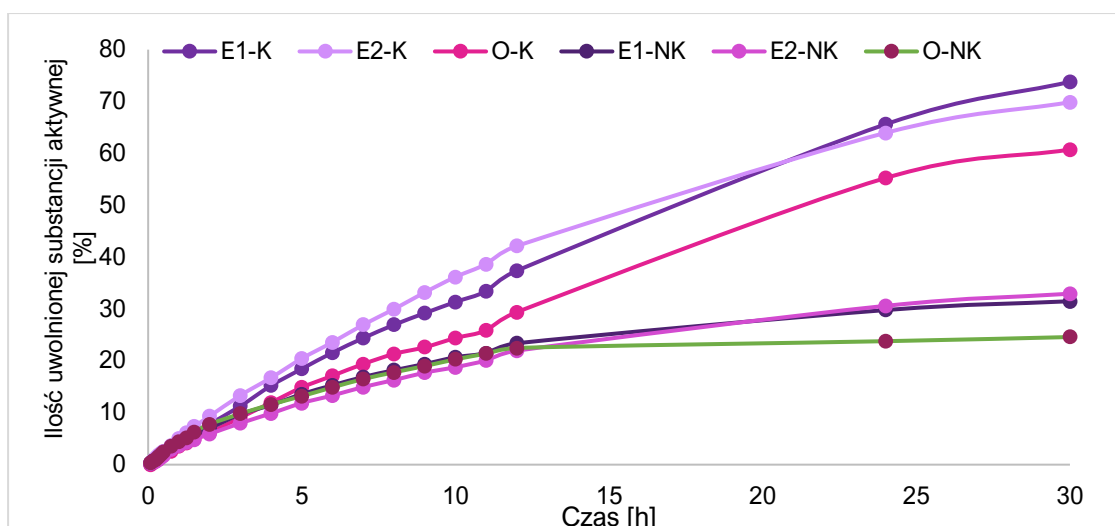
W ramach przeprowadzonych badań dokonano analizy profili uwalniania kostunolidu z różnych układów nośnikowych, uwzględniając zarówno emulsje bazowe, zawierające substancje aktywne w formie klasyczne, jak substancje aktywne inkorporowane w nanocząstkach lipidowych. Uzyskane wyniki wykazały wyraźne różnice w przebiegu krzywych uwalniania w zależności od zastosowanego podłoża, co potwierdza istotny wpływ zarówno rodzaju formuacji, jak i obecności nośników na szybkość oraz całkowity stopień uwalniania substancji czynnej.

W celu analizy ilościowej było sporządzenie krzywych kalibracyjnych dla roztworów kostunolidu oraz laktonu dehydrokostosusowego w mieszaninie buforu fosforanowego o pH 5,8 i etanolu (zmieszane w stosunku objętościowym 65:35) wykonanych na podstawie analizy chromatograficznej przygotowanych w odpowiednim zakresie stężeń roztworów wzorcowych (rys. 7.18).



Rys. 7.18. Krzywe kalibracyjne dla badanych laktonów seskwiterpenowych rozpuszczonych w mieszaninie buforu fosforanowego i etanolu (65:35)

Analizie poddano wpływ podłoża formuacji kosmetycznej na uwalnianie kostunolidu (rys. 7.19) i lakton dehydrokostosusowy (rys. 7.20) oraz porównano uwalnianie substancji aktywnych zainkorporowanych do nanocząstek lipidowych i w formie klasycznej.



Rys. 7.19. Profile uwalniania kostunolidu (K) z badanych formuł kosmetycznych

W przypadku emulsji E1-K (rys. 7.19) zaobserwowano najwyższy poziom uwolnienia kostunolidu spośród wszystkich badanych układów. Już po 5 minutach od rozpoczęcia eksperymentu wykryto niewielkie ilości substancji w medium, natomiast po upływie 12 godzin ilość uwolnionego związku wyniosła 41,90%, przy średnim wzroście uwalniania wynoszącym 3,35% na godzinę. W kolejnych 12 godzinach proces postępował wolniej – uwolniło się dodatkowe 21,66% substancji, co odpowiadało średniemu przyrostowi około 1,80% na godzinę. Po 24 godzinach tempo uwalniania uległo dalszemu spowolnieniu i w końcowym etapie eksperymentu, tj. po 30 godzinach, uzyskano całkowity stopień uwolnienia wynoszący 69,43%. Krzywa uwalniania dla tego układu charakteryzowała się typowym przebiegiem dwufazowym: fazą początkowego, intensywnego uwalniania w pierwszych godzinach eksperymentu oraz fazą stopniowego spowolnienia w kolejnych etapach, co wskazuje na szybkie uwalnianie substancji powierzchniowej, a następnie dyfuzję z głębszych warstw matrycy.

Analogiczny, choć nieco wolniejszy przebieg zaobserwowano w przypadku emulsji E2-K, w której kostunolid został wprowadzony bezpośrednio do podłoża bez udziału nanocząstek lipidowych. Po 5 minutach od rozpoczęcia badania stwierdzono niewielkie ilości uwolnionej substancji, natomiast po 12 godzinach ilość uwolnionego związku wyniosła 41,90%, przy średnim przyroście 3,35% na godzinę. W drugiej dobie eksperymentu tempo uwalniania uległo wyraźnemu spowolnieniu, osiągając średnio 1,80% na godzinę i całkowity stopień uwolnienia równy 69,43% po 30 godzinach. Profil uwalniania w tym przypadku również miał charakter dwufazowy, jednak nieco niższy poziom uwolnienia w porównaniu z E2-K może wynikać z różnic w składzie bazowym emulsji, co wpływa na dyspersję substancji w podłożu i jej rozpuszczalność w fazie ciągłej.

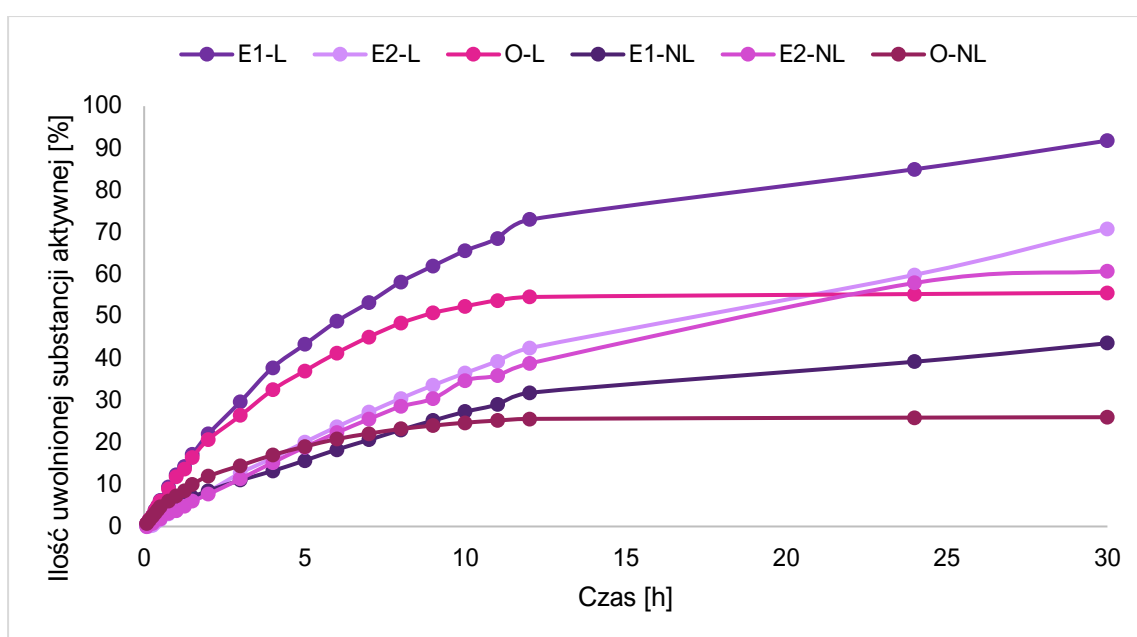
W przypadku próbki O-K uwalnianie kostunolidu przebiegało w sposób bardziej rozciągnięty w czasie. Po 12 godzinach ilość uwolnionej substancji wyniosła około 41%, natomiast w kolejnych 12 godzinach przyrost był znacznie mniejszy, co przełożyło się na końcowy stopień uwolnienia wynoszący 60,7% po 30 godzinach. Krzywa charakteryzowała się wyraźnym etapem początkowego, umiarkowanego uwalniania, a następnie stopniowym spowolnieniem w kolejnych fazach eksperymentu. Można przypuszczać, że obecność określonych składników

w podłożu oleożelu O-K mogła wpływać na ograniczenie dyfuzji substancji aktywnej z układu, co skutkowało niższym całkowitym stopniem uwolnienia w porównaniu z E1-K i E2-K.

Odmienne przebiegi uzyskano w przypadku układów zawierających nanocząstki lipidowe (E1-NK oraz E2-NK), co potwierdza rolę tego typu nośników w modulowaniu procesu uwalniania substancji aktywnych. W przypadku próbki E2-NK po 5 minutach uwolniły się jedynie śladowe ilości kostunolidu, a po 12 godzinach ilość uwolnionej substancji wyniosła 21,71%, przy średnim wzroście $1,64 \pm 0,37\%$ na godzinę. W kolejnych 12 godzinach tempo uwalniania uległo dalszemu zmniejszeniu do 0,71% na godzinę, co przełożyło się na całkowity stopień uwolnienia wynoszący 33,05% po 30 godzinach. W przypadku próbki E1-NK uzyskano bardzo zbliżony profil – końcowa ilość uwolnionej substancji po 30 godzinach wyniosła 31,5%. Krzywe uwalniania dla obu układów lipidowych miały charakter bardziej liniowy, bez wyraźnej fazy gwałtownego uwalniania początkowego, co wskazuje na mechanizm kontrolowanego uwalniania kostunolidu z wnętrza matrycy nanocząstek lipidowych. Spowolnienie procesu może wynikać z ograniczonej dyfuzji substancji przez fazę lipidową, jak również z jej stabilnego „zamknięcia” wewnątrz nanostruktur.

Najniższy poziom uwalniania stwierdzono w przypadku próbki O-NK, w której brak było zarówno składników promujących przenikanie, jak i nośników modyfikujących uwalnianie. Przez cały czas trwania eksperymentu ilość uwalnianego kostunolidu pozostawała niska, a końcowa wartość po 30 godzinach wyniosła 24,6%. Przebieg krzywej wskazuje na powolny, ograniczony transport substancji z układu do medium, co można przypisać zarówno niskiej rozpuszczalności substancji w fazie bazowej, jak i braku jakichkolwiek mechanizmów wspomagających dyfuzję.

Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają, że rodzaj zastosowanego układu nośnikowego istotnie wpływa na przebieg procesu uwalniania kostunolidu. Emulsje bazowe charakteryzują się szybkim uwalnianiem początkowym i osiągają wysokie wartości końcowe, natomiast zastosowanie nanocząstek lipidowych prowadzi do wyraźnego spowolnienia i ujednolicenia tempa uwalniania, nadając mu charakter kontrolowany. Różnice między poszczególnymi układami można przypisać właściwościom fizykochemicznym podłoży oraz specyfice interakcji substancji z fazą lipidową, co w istotny sposób determinuje zarówno szybkość, jak i całkowity stopień uwolnienia w czasie.



Rys. 7.20. Profile uwalniania laktonu dehydrokustusowego (L) z badanych formułacji kosmetycznych

W przypadku laktonu dehydrokustusowego uzyskane profile uwalniania również wykazały wyraźne zróżnicowanie w zależności od zastosowanego układu nośnikowego, jednak przebieg krzywych i wartości końcowe różniły się istotnie od obserwowanych dla kostunolidu (rys. 7.20). Dla emulsji E1-L zaobserwowano najwyższy stopień uwolnienia spośród wszystkich badanych próbek z tą substancją aktywną. Już w początkowej fazie eksperymentu uwolniły się niewielkie ilości laktonu dehydrokustusowego, natomiast po 12 godzinach ilość uwolnionego związku osiągnęła 70%, przy czym dalszy przebieg krzywej charakteryzował się intensywnym wzrostem w kolejnych godzinach. Po 30 godzinach całkowity stopień uwolnienia wyniósł 91,8%, co wskazuje na bardzo wysoką dostępność tej substancji w zastosowanej matrycy emulsji oraz brak istotnych barier dyfuzyjnych ograniczających proces. Krzywa uwalniania dla tego układu wykazywała typowy kształt z wyraźną fazą początkową o dużym nachyleniu, a następnie stopniowym wypłaszczeniem w końcowej fazie eksperymentu.

W przypadku emulsji E2-L uzyskano przebieg o nieco wolniejszym tempie uwalniania. Po 12 godzinach uwolniło się 42,51% substancji, przy średnim przyroście $3,52 \pm 0,57\%$ na godzinę. W kolejnych 12 godzinach proces przebiegał wolniej, osiągając średni przyrost około 1,45% na godzinę i całkowity stopień uwolnienia równy 70,4% po 30 godzinach. Kształt krzywej uwalniania był podobny do obserwowanego dla E1-L, jednak wartości liczbowo były niższe, co może wynikać z różnic w składzie emulsji wpływających na rozpuszczalność oraz dyspersję laktonu dehydrokustusowego w matrycy. Różnice te mogą mieć również związek z właściwościami fizykochemicznymi podłoża, w szczególności zawartością fazy lipidowej i rodzajem zastosowanych emulgatorów.

Profil uwalniania laktonu dehydrokustusowego z emulsji O-L charakteryzował się bardzo szybkim uwalnianiem w pierwszej fazie eksperymentu. Już po 10 godzinach ilość uwolnionej substancji przekraczała 50%, natomiast w dalszej części krzywa stopniowo się wypłaszczała. Po 30 godzinach całkowity stopień uwolnienia wyniósł

55,6%. Szybkie uwalnianie w pierwszym etapie można tłumaczyć korzystnym rozmieszczeniem substancji w fazie emulsji oraz wysoką rozpuszczalnością w medium receptorowym. Niższy poziom końcowy w porównaniu z E1-L i E2-L może wynikać z ograniczeń wynikających z budowy podłoża lub niższego stężenia substancji w fazie zewnętrznej emulsji, co skutkuje szybszym uwolnieniem początkowym, ale mniejszą ilością uwolnioną w końcowym etapie.

Podobnie jak w przypadku kostunolidu, zastosowanie nanocząstek lipidowych spowodowało wyraźne spowolnienie uwalniania laktonu dehydrokustusowego. W próbce E2-NL po 12 godzinach ilość uwolnionej substancji była istotnie niższa niż w emulsjach bazowych i wyniosła 21,71%. W kolejnych 12 godzinach przyrost był wyraźnie mniejszy, a całkowity stopień uwolnienia po 30 godzinach osiągnął 57,9%. Dla próbki E1-NL przebieg był zbliżony, a końcowa ilość uwolnionej substancji wyniosła 43,6%. Krzywe uwalniania dla obu układów lipidowych charakteryzowały się liniowym, równomiernym wzrostem bez gwałtownej fazy początkowej, co wskazuje na mechanizm kontrolowanego uwalniania, determinowany przez dyfuzję laktonu dehydrokustusowego przez fazę lipidową. Mniejsze wartości odchylenia standardowego uzyskane dla tych układów w porównaniu z emulsjami bez nośników sugerują bardziej jednorodny mechanizm uwalniania.

Najniższy stopień uwolnienia laktonu dehydrokustusowego zaobserwowano w próbce O-NL, w której końcowa wartość po 30 godzinach wyniosła 26%. Przebieg krzywej wskazywał na powolne i równomierne uwalnianie przez cały okres trwania eksperymentu, bez wyraźnej fazy początkowej, co można wiązać z ograniczoną dyfuzją substancji w środowisku pozbawionym zarówno składników promujących przenikanie, jak i układów nośnikowych modyfikujących uwalnianie.

Porównanie profili uwalniania kostunolidu i laktonu dehydrokustusowego wykazało zachowanie ogólnego podobieństwa kształtu krzywych w poszczególnych układach nośnikowych, jednak wartości końcowe i dynamika procesu były wyraźnie odmienne. We wszystkich badanych układach lakton dehydrokustusowy charakteryzował się większym całkowitym stopniem uwolnienia niż kostunolid. Najbardziej wyraźna różnica obserwowana była dla układów typu E1, w których końcowy stopień uwolnienia laktonu wyniósł 91,8%, podczas gdy dla kostunolidu 73,8%. Podobne zależności występowały dla układów E2, gdzie wartości końcowe wyniosły odpowiednio 70,4% i 69,4%. Różnice te były szczególnie widoczne w układach z nanocząstkami lipidowymi: dla E2-NL i E1-NL uzyskano wartości odpowiednio 57,9% i 43,6%, podczas gdy dla kostunolidu w układach E2-NK i E1-NK wartości te wynosiły odpowiednio 33,05% i 31,5%. Ogólny przebieg krzywych pozostawał jednak zbliżony — najszybsze uwalnianie obserwowano w układach bez nanocząstek lipidowych, natomiast zastosowanie SLN powodowało wyraźne spowolnienie procesu i nadanie mu charakteru kontrolowanego.

Różnice ilościowe w uwalnianiu obu substancji można przypisać ich właściwościom fizykochemicznym, w szczególności lipofilowości i rozpuszczalności w zastosowanych matrycach. Lakton dehydrokustusowy wykazuje większe powinowactwo do fazy lipidowej i lepszą rozpuszczalność w medium receptorowym, co sprzyja szybszemu i pełniejszemu uwalnianiu w porównaniu z kostunolidem. Można przypuszczać, że różnice w budowie chemicznej wpływają

również na sposób enkapsulacji substancji w rdzeniu nanocząstek lipidowych, co skutkuje różnymi mechanizmami uwalniania. Pomimo tych różnic, zarówno dla kostunolidu, jak i dla laktonu dehydrokustusowego kluczowym czynnikiem determinującym przebieg procesu uwalniania okazał się rodzaj zastosowanego układu nośnikowego. Obecność nanocząstek lipidowych prowadziła do wyraźnego spowolnienia i ujednolicenia tempa uwalniania, podczas gdy emulsje bazowe sprzyjały szybkiemu uwalnianiu początkowemu i osiągnięciu wyższych wartości końcowych w krótszym czasie.

Podsumowując, przeprowadzone badania uwalniania kostunolidu i laktonu dehydrokustusowego wykazały, że rodzaj zastosowanego układu nośnikowego istotnie wpływa na tempo i całkowity stopień uwalniania substancji czynnych. Emulsje bazowe charakteryzowały się szybkim uwalnianiem początkowym i wysokim stopniem uwolnienia po 30 godzinach, natomiast wprowadzenie nanocząstek lipidowych (SLN) znacząco spowolniło proces, nadając mu charakter kontrolowany. Lakton dehydrokustusowy uwalniał się szybciej i w większym stopniu niż kostunolid, co wynika z jego wyższej rozpuszczalności i większego powinowactwa do fazy lipidowej. Uzyskane wyniki potwierdzają, że nanostruktury lipidowe są skutecznym narzędziem modulowania uwalniania substancji aktywnych, umożliwiając uzyskanie dłuższego i bardziej stabilnego efektu działania w porównaniu z klasycznymi emulsjami.

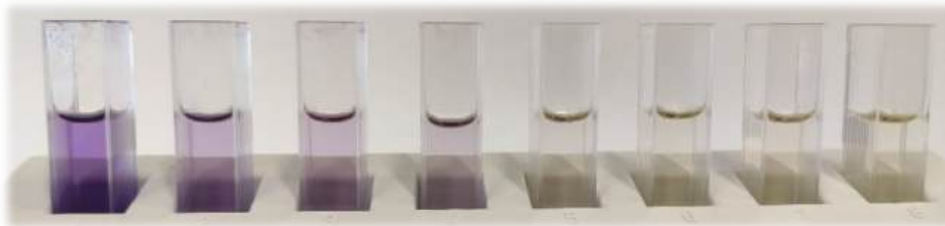
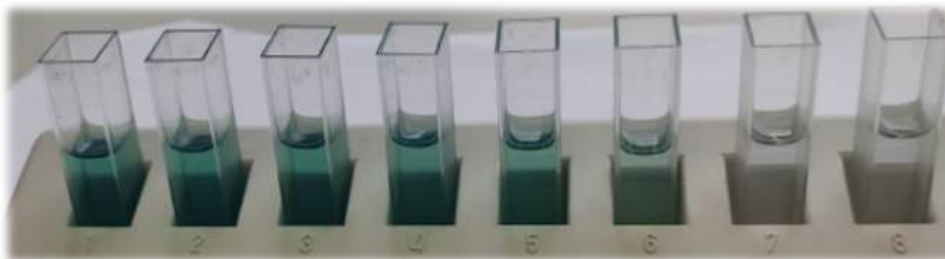
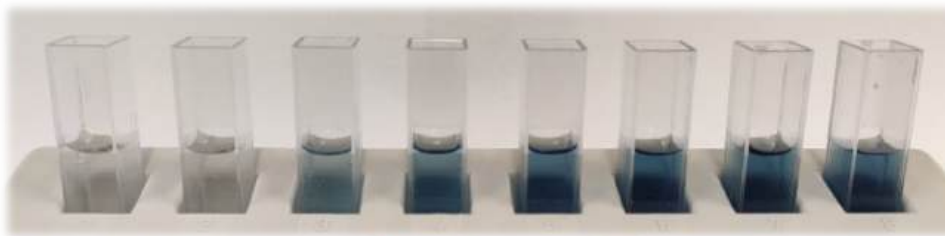
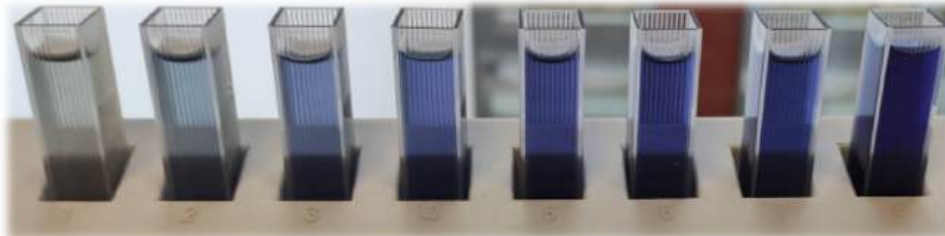
Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają, że rodzaj zastosowanego układu nośnikowego istotnie wpływa na przebieg procesu uwalniania kostunolidu. Emulsje bazowe charakteryzują się szybkim uwalnianiem początkowym i osiągają wysokie wartości końcowe, natomiast zastosowanie nanocząstek lipidowych prowadzi do wyraźnego spowolnienia i ujednolicenia tempa uwalniania, nadając mu charakter kontrolowany. Różnice między poszczególnymi układami można przypisać właściwościom fizykochemicznym podłoża oraz specyfice interakcji substancji z fazą lipidową, co w istotny sposób determinuje zarówno szybkość, jak i całkowity stopień uwolnienia w czasie.

7.4. Badanie aktywności antyoksydacyjnej

Ocena aktywności antyoksydacyjnej stanowi istotny element charakterystyki biologicznej związków naturalnych, w tym laktonów seskwiterpenowych, które coraz częściej stanowią przedmiot badań farmakognostycznych i farmakologicznych. Chociaż związki te znane są przede wszystkim z właściwości cytotoksycznych, przeciwzapalnych oraz immunomodulujących, coraz więcej badań wskazuje również na ich potencjał antyoksydacyjny. W badaniach biologicznych wykazano, że niektóre laktony seskwiterpenowe mogą ograniczać stres oksydacyjny w komórkach i tkankach, co objawia się obniżeniem poziomu reaktywnych form tlenu oraz zwiększeniem aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Mechanizm tego działania jest jednak zasadniczo odmienny od klasycznego mechanizmu neutralizacji wolnych rodników przez związki fenolowe — nie polega on na bezpośrednim przekazaniu atomów wodoru lub elektronów, lecz ma charakter pośredni, związany m.in. z aktywacją szlaku Nrf2/ARE, modulacją ekspresji genów enzymów antyoksydacyjnych lub hamowaniem enzymów prooksydacyjnych [72], [73].

Aby zapewnić wiarygodność oznaczeń, najpierw zweryfikowano liniowość odpowiedzi metod spektrofotometrycznych, konstruując krzywe kalibracyjne dla DPPH, ABTS, FRAP oraz Folina–Ciocâlțu (F-C). Otrzymane równania i współczynniki determinacji (R^2) zestawiono w tabeli 7.8. Wysokie wartości R^2 ($\geq 0,995$) dla większości metod potwierdzają dobrą liniowość i powtarzalność procedur analitycznych w zastosowanym zakresie stężeń, co uzasadnia ich użycie do dalszej oceny aktywności.

Tabela 7.8. Równania krzywych kalibracyjnych i współczynniki determinacji dla testów antyoksydacyjnych (DPPH, ABTS, FRAP)

Metoda	Krzywa kalibracyjna	
DPPH		
	Równanie krzywej kalibracyjnej	$y = -7,9914x + 0,2855$
	Współczynnik determinacji	$R^2 = 0,9967$
ABTS		
	Równanie krzywej kalibracyjnej	$y = -1,782x + 0,7176$
	Współczynnik determinacji	$R^2 = 0,9949$
FRAP		
	Równanie krzywej kalibracyjnej	$y = 1,068x + 0,1545$
	Współczynnik determinacji	$R^2 = 0,9989$
F-C		
	Równanie krzywej kalibracyjnej	$y = 0,0059x + 0,0864$
	Współczynnik determinacji	$R^2 = 0,9997$

Z uwagi na brak grup fenolowych i ograniczoną rozpuszczalność w środowisku wodnym, laktony seskwiterpenowe mogą wykazywać niską reaktywność w standardowych testach chemicznych oceniających bezpośrednie „zmiatanie” rodników, dlatego dobór metod ma kluczowe znaczenie dla porównywalności danych. W niniejszej pracy aktywność antyoksydacyjną kostunolidu (K) i laktonu dehydrokustusowego (L) oceniono dwiema metodami opartymi na neutralizacji rodników (ABTS i DPPH), raportując wyniki jako TEAC i odnosząc je do danych literaturowych, co pozwoliło określić specyfikę reaktywności badanych związków. Dodatkowo przeanalizowano zasadność stosowania FRAP i F-C w kontekście struktury laktonów (mechanizm pośredni, brak fenoli), traktując je jako metody uzupełniające, a nie równorzędne względem testów rodnikowych.

Tabela 7.9. Wyznaczone parametry absorbancji i TEAC w testach DPPH/ABTS dla kostunolidu i laktonu dehydrokustusowego

Metoda oznaczenia	SA	Absorbancja początkowa (A_0)	Absorbancja końcowa (A)	Stężenie równoważne Troloxu, [mmol/L]	TEAC [$\mu\text{mol TE/g}$]
DPPH	K	1,0331 $\pm 0,0011$	0,6209 $\pm 0,004$	0,0554	27,7
	L		0,7913 $\pm 0,0002$	0,0298	14,9
ABTS	K	0,1883 $\pm 0,0003$	0,0706 $\pm 0,0001$	0,0261	13
	L		0,106 $\pm 0,0002$	0,0223	11,2

Uzyskane wartości TEAC dla badanych laktonów seskwiterpenowych potwierdzają ich ograniczoną zdolność do bezpośredniego zmiatania wolnych rodników w modelowych układach chemicznych. W teście ABTS kostunolid wykazywał umiarkowaną aktywność antyoksydacyjną, osiągając wartość 27,7 $\mu\text{mol TE/g}$, natomiast dla laktonu dehydrokustusowego uzyskano istotnie niższą wartość, wynoszącą 14,9 $\mu\text{mol TE/g}$. W teście DPPH wartości te były odpowiednio niższe i wyniosły 13,0 $\mu\text{mol TE/g}$ dla kostunolidu oraz 11,2 $\mu\text{mol TE/g}$ dla laktonu dehydrokustusowego. Uzyskane wyniki są zgodne z dostępnymi danymi literaturowymi, według których kostunolid charakteryzuje się niską aktywnością w teście DPPH (około 3 % inhibicji przy stężeniu 450 μM) oraz umiarkowaną w teście ABTS (około 20 % inhibicji), co odpowiada wartościom rzędu kilkunastu do kilkudziesięciu $\mu\text{mol TE/g}$ [181]. W przypadku laktonu dehydrokustusowego literatura wskazuje na bardzo niską lub nieoznaczalną aktywność antyoksydacyjną, co znajduje odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach, oscylujących w granicach dolnego zakresu wykrywalności metody.

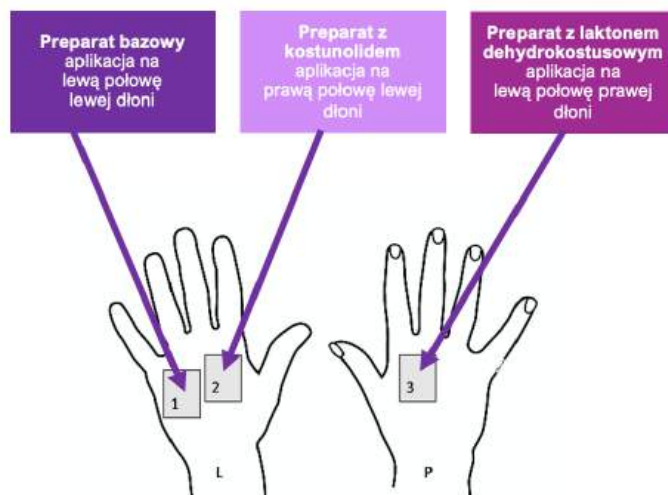
Różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi w testach ABTS i DPPH wynikają zarówno z właściwości chemicznych badanych związków, jak i ze specyfiki stosowanych metod analitycznych. Test ABTS, oparty na rodniku kationorodnikowym ABTS^{•+}, umożliwia reakcje zarówno poprzez mechanizm przekazania elektronu (SET), jak i mechanizm transferu atomu wodoru (HAT), a ponadto jest bardziej czuły na związki częściowo rozpuszczalne w środowisku wodnym. Kostunolid, mimo braku grup fenolowych, zawiera sprzężony układ podwójnych wiązań, co umożliwia częściową donację elektronów i przekłada się na wyższą aktywność w tej metodzie. Z kolei lakton dehydrokostosowy, charakteryzujący się większym stopniem nienasycenia, bardziej sztywną strukturą pierścienia i niższą elektronodonością, wykazuje znacząco niższą reaktywność. Dodatkowo, ograniczona rozpuszczalność tego związku w środowisku reakcji może prowadzić do obniżenia efektywnego stężenia w roztworze, co również przyczynia się do uzyskania niższych wartości TEAC.

Podsumowując, wyniki badań potwierdziły, że laktony seskwiterpenowe, takie jak kostunolid i lakton dehydrokostosowy, wykazują ograniczoną, lecz mierzalną aktywność antyoksydacyjną w testach opartych na neutralizacji rodników ABTS i DPPH. Kostunolid charakteryzował się wyższą zdolnością zmiatania wolnych rodników, osiągając wartości 27,7 $\mu\text{mol TE/g}$ (ABTS) i 13,0 $\mu\text{mol TE/g}$ (DPPH), podczas gdy dla laktonu dehydrokostosowego uzyskano odpowiednio 14,9 i 11,2 $\mu\text{mol TE/g}$. Różnice te wynikają z odmiennej budowy chemicznej i rozpuszczalności badanych związków, a także z mechanizmów reakcji charakterystycznych dla poszczególnych metod. Uzyskane dane wskazują, że działanie antyoksydacyjne laktonów seskwiterpenowych ma charakter pośredni i nie opiera się na klasycznym mechanizmie donorowo-akceptorowym, typowym dla związków fenolowych. Testy ABTS i DPPH okazały się odpowiednimi metodami do ich oceny, natomiast metody Folina–Ciocalteu i FRAP nie są adekwatne dla tej grupy związków ze względu na ich niską rozpuszczalność i brak grup fenolowych.

7.5. Badanie efektywności działania otrzymanych preparatów kosmetycznych

Celem przeprowadzonych badań aplikacyjno-aparaturowych było określenie wpływu wybranych formułacji kosmetycznych – oleożeli i emulsji typu O/W – zawierających laktony seskwiterpenowe (kostunolid i lakton dehydrokostusowy) w postaci wolnej oraz inkorporowanej do stałych nanocząstek lipidowych (SLN) – na właściwości biometryczne skóry, w tym poziom nawilżenia naskórka oraz przeznaskórkowej utraty wody, parametry kolorytu skóry, a także parametry topografii i makrorzeźby skóry. Analiza obejmowała zarówno ocenę instrumentalną (z wykorzystaniem zestawu urządzeń Courage+Khazaka), jak i subiektywną ocenę użytkową (wrażenia sensoryczne, akceptację aplikacyjną oraz ogólną satysfakcję ochotników). Uzyskane wyniki pozwalają na kompleksową interpretację wpływu charakteru bazy kosmetycznej, obecności nanonośników oraz rodzaju substancji aktywnej na kondycję skóry, potencjał przeciwstarzeniowy i rozjaśniający badanych preparatów kosmetycznych.

W ośmiotygodniowym badaniu brała udział grupa 80 ochotników płci żeńskiej, w przedziale wiekowym od 24 do 58 lat, o fototypie skóry I-III. Pomiary parametrów biometrycznych skóry wykonane zostały czterokrotnie – na początku badania na skórze niepokrytej żadnym produktem (t0), a następnie po pierwszym (t1), czwartym (t4) oraz ósmym tygodniu aplikacji (t8). Ochotnicy zostali poinstruowani, aby kremy aplikować przed snem na wskazane w instrukcji miejsca na skórze. Schemat rozmieszczenia miejsc aplikacji formułacji kosmetycznych na dłoniach badanych przedstawiono na poniższym rysunku (7.21)



Rys. 7.21. Schematyczne przedstawienie miejsc aplikacji poszczególnych preparatów kosmetycznych na dłoniach ochotników.

Ochotnicy zostali podzieleni na cztery grupy:

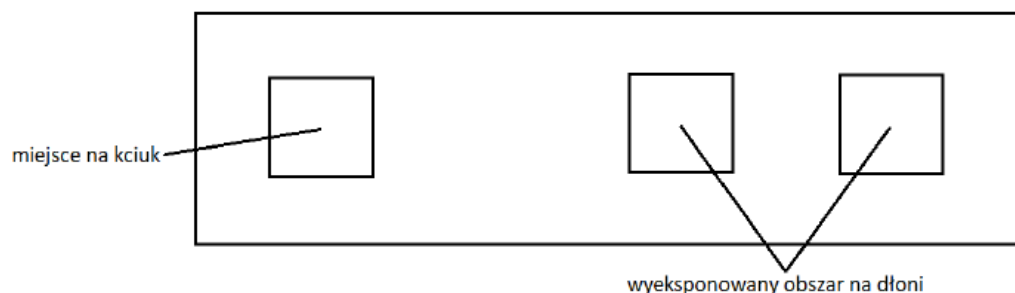
- stosujący oleożele z substancjami aktywnymi i bazę,
- stosujący oleożele z zainkorporowanymi w nanocząstkach lipidowych substancjami aktywnymi i bazę,
- stosujący emulsję nr 2 (otrzymywaną metodą „na gorąco”) z substancjami aktywnymi i bazę,

- stosujący emulsję nr 2 (otrzymywaną metodą „na gorąco”) z zainkorporowanymi w nanocząstkach lipidowych substancjami aktywnymi i bazę.



Rys. 7.22. Zdjęcia otrzymanych preparatów kosmetycznych wraz z instrukcją, którą otrzymali ochotnicy

W celu wykonywania pomiarów w tych samych miejscach na dłoniach, ochotnicy zawsze przed rozpoczęciem pomiarów nakładali szablon, eksponujący wąski obszar skóry na zewnętrznej stronie dłoni, przedstawiony poniżej (rys. 7.23).



Rys. 7.23. Szablon używany podczas wykonywania pomiarów

Ochotnicy przed przystąpieniem do badań uzupełnili ankietę informacyjną, której wyniki przedstawiono poniżej.

Tabela 7.10. Analiza odpowiedzi ankiety informacyjnej ochotników badania aplikacyjno-użytkowego

Pytanie	Odpowiedź
W jakich warunkach Pani pracuje?	Pomieszczenie klimatyzowane (biuro): 25% Pomieszczenie nieklimatyzowane (biuro): 40% Praca w terenie (na świeżym powietrzu): 0% Inne, takie jak: laboratorium: 35%
W skali I – 5 jak Pani ocenia swój sposób żywienia? (1-bardzo zły, 5-bardzo dobry)	1: 0% 2: 5% 3: 35% 4: 55% 5: 5%
Czy korzysta Pani z suplementów diety?	Tak: 60% Nie: 40% Jeśli tak, to jakich: witamina D (55%), magnez (5%) rutozyd (5%), diosmina (5%), omega 3, 6, 9 (5%), witamina B (5%), witamina B12 (5%), witamina B26 (5%), witamina C (5%), witamina A (5%), witamina E (5%), biotyna (5%), olej z wiesiołka (10%)
Czy pali Pani papierosy?	Tak: 10% Nie: 90% Okazyjnie: 0%
Z jakich używek Pani korzysta? Można wybrać więcej niż jedną odpowiedź.	Kawa: 75% Herbata: 75% Alkohol: 55% Napoje energetyczne: 0% Inne, takie jak: 0%
W jakim stopniu (w skali 1 – 5) określiłaby Pani swoją aktywność fizyczną? (1-bardzo mała, 5-bardzo duża)	1: 0% 2: 35%

	3: 50%
	4: 10%
	5: 5%
W jakim stopniu (w skali 1 – 5) określiłaby Pani swoją odporność na sytuacje stresujące? (1-bardzo mała, 5-bardzo duża)	1: 0%
	2: 15%
	3: 25%
	4: 45%
	5: 15%
Jaki jest Pani naturalny kolor włosów?	Bardzo jasne lub rude: 0%
	Blond lub jasnobrązowe: 30%
	Ciemny blond, brązowe do kasztanowych: 45%
	Ciemnobrązowe do czarnych: 25%
Jaki jest Pani kolor oczu?	Jasnoniebieskie: 15%
	Ciemniejsze niebieskie, zielone lub szare: 45%
	Jasnobrązowe, zielonobrązowe: 15%
	Ciemnobrązowe do czarnych: 25%
Jaka jest Pani skóra przed opalaniem?	Bardzo jasna: 15%
	Jasna, lekko zaróżowiona: 40%
	Średnio jasna, beżowa: 40%
	Jasnobrązowa, o odcieniu oliwkowym: 5%
Czy na Pani ciele występują piegi?	Tak, bardzo dużo, na całym ciele: 15%
	Dużo: 10%
	W niektórych miejscach: 45%
	Prawie wcale: 30%
Jak zachowuje się Pani skóra po kontakcie ze słońcem?	Od razu staje się czerwona, nigdy się nie opala: 0%
	Często ulega „oparzeniu”, brązowieje tylko w niektórych częściach ciała: 45%
	Łatwo się opala, raczej w całości brązowieje, a oparzenia zdarzają się rzadko i nie są ciężkie: 55%
	Szybko staje się głęboko brązowa: 0%

Kwestionariusz dotyczy badanego obszaru ciała, tzn. zewnętrznej skóry dłoni. Odpowiadając na poniższe pytania, proszę skupić się na analizie danego obszaru.

Czy na badanym obszarze skóry w ciągu ostatnich 6 miesięcy stosowała Pani preparaty lecznicze?	Tak: 5% Nie: 95% Jeśli tak, to jakie?: maść Alantan, kremy z mocznikiem 30% oraz maść z wit. A (5%)
Czy na badanym obszarze skóry w ciągu ostatnich 6 miesięcy korzystała Pani z zabiegów w salonie kosmetycznym?	Tak: 0% Nie: 100% Jeśli tak to jakie?: 0%
Czy w trakcie wykonywanej pracy codziennie przebywa Pani w rękawiczkach?	Tak, kilka godzin dziennie: 0% Tak, okazjnie: 70% Nie: 30%
Czy korzysta Pani codziennie z płynów do dezynfekcji/antybakteryjnych na badanym obszarze ciała?	Tak, kilkanaście razy dziennie: 10% Tak, okazjnie: 50% Nie: 40%
Czy korzysta Pani z lampy UV podczas manicure?	Tak: 35% Nie: 65% Jeśli tak, proszę określić częstotliwość: brak określenia częstotliwości
Czy korzysta Pani z solarium?	Tak: 0% Nie: 100% Jeśli tak, proszę określić częstotliwość: 0%
Czy posiada Pani objawy melasmy skórnej?	Tak, mam dużo tego typu przebarwień: 10% Tak, mam pojedyncze zmiany: 30% Nie: 60%
Czy posiada Pani objawy bielactwa?	Tak, mam dużo tego typu przebarwień: 0% Tak, pojedyncze zmiany: 0% Nie: 100%
Jakich preparatów używa Pani do pielęgnacji badanego obszaru ciała? Proszę zaznaczyć (można	Krem do rąk: 100%, 2-3 razy w tygodniu (10%), kilka razy dziennie (5%), 1-2 razy dziennie (10%),

wybrać więcej niż jedną odpowiedź) i określić częstotliwość stosowania:	codziennie (15%), 10 razy dziennie (5%), 2 razy dziennie (10%), kilka razy w tygodniu (5%), 1 raz dziennie (10%), w zależności od potrzeby (5%), okazjonalnie (5%), 5 raz dziennie (5%), 3 razy w tygodniu (5%), brak określenia częstotliwości (10%) Peeling do skóry: 10%, 1-2 razy w miesiącu (5%), , raz w tygodniu (5%) Maski: 5%, brak określenia częstotliwości Serum: 0% Rękawiczki pielęgnujące: 10%, 1 raz na 2 miesiące (5%), brak określenia częstotliwości (5%) Inne, takie jak: 0%
W jakim stopniu (w skali 1 - 5) Pani skóra na badanym obszarze ciała jest wrażliwa? (1-niewrażliwa, 5-bardzo wrażliwa)	1: 20% 2: 25% 3: 40% 4: 10% 5: 5%
Jakie czynniki powodują u Pani nadmierną reaktywność skóry? (można wybrać więcej niż jedną odpowiedź)	Żadne: 20% Wahania temperatury: 60% Wiatr: 45% Promieniowanie słoneczne: 30% Zanieczyszczenia powietrza: 5% Bodźce mechaniczne: 40% Kosmetyki: 10% Inne, takie jak: 0%
Czy stosuje Pani preparaty kosmetyczne z filtrem SPF na badanym obszarze ciała?	Tak: 35% Nie: 65%
Jeżeli na powyższe pytanie udzieliła Pani odpowiedzi NIE, proszę pominąć pytanie 25.1. oraz 25.2.	
W jakich sytuacjach używa Pani preparatów kosmetycznych z filtrem SPF na badanym obszarze ciała?	Przez cały rok: 10% W okresie wiosenno-letnim: 5% Tylko w czasie opalania: 20%

	Podczas stosowania lampy UV przy manicure: 5%
W jakim przedziale mieści się wartość SPF stosowanych przez Panią preparatów?	Mniej niż 15: 5% 15-30: 15% 30-50: 0% 50+: 15%
W jaki sposób (stopień łatwości w skali 1 – 5) opala się Pani skóra na badanym obszarze ciała bez zastosowania preparatu kosmetycznego z filtrem SPF? (1-wcale się nie opala, 5-zawsze mocno się opala)	1: 0% 2: 25% 3: 35% 4: 30% 5: 10%
W jaki sposób reaguje Pani skóra na badanym obszarze ciała na zbyt długi kontakt ze słońcem bez zastosowania preparatu kosmetycznego z filtrem SPF? (można wybrać więcej niż jedną odpowiedź)?	Zaczerwienieniem: 50% Oparzeniami: 0% Łuszczeniem się skóry: 0% Brak jakichkolwiek zmian: 50%
Jak często występują u Pani oparzenia będące wynikiem ekspozycji na słońce bez zastosowania preparatu kosmetycznego z filtrem SPF?	Prawie zawsze: 10% Często: 25% Rzadko: 55% Nigdy: 10%

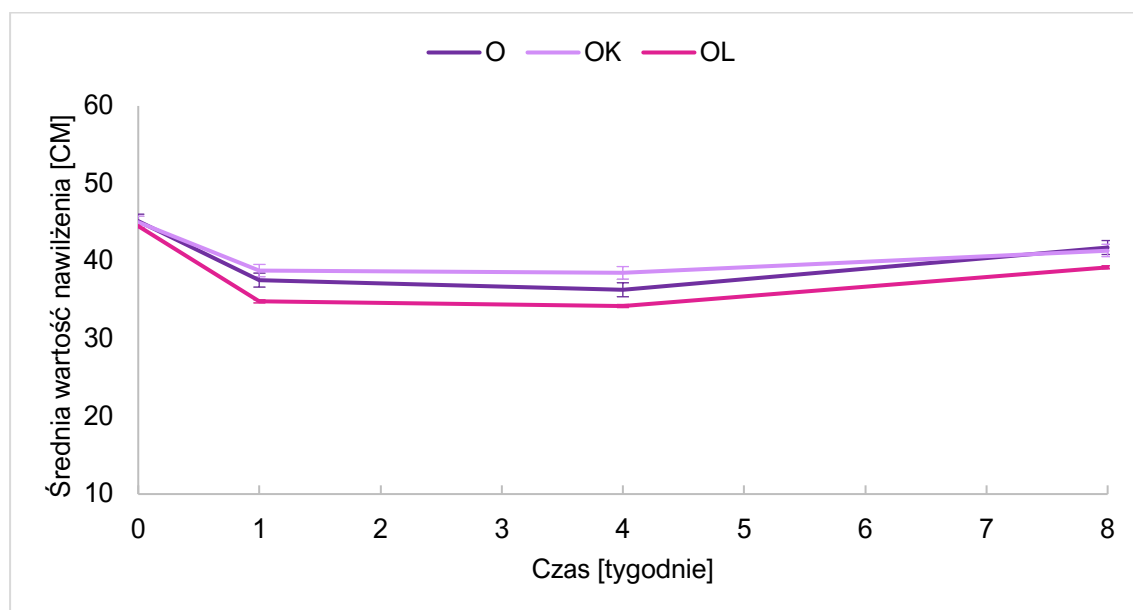
Badania przeprowadzono wśród ochotników w kontrolowanych warunkach środowiskowych, przy temperaturze 22 ± 1 °C i wilgotności względnej 45 ± 5 %, co zapewniało powtarzalność pomiarów i minimalizowało wpływ czynników

Zastosowane podejście badawcze wpisuje się w aktualne kierunki rozwoju kosmetologii, w której coraz większą rolę odgrywa nanotechnologia oraz naturalne związki bioaktywne. Laktony seskwiterpenowe, takie jak kostunolid czy lakton dehydrokostusowy, odznaczają się wysoką aktywnością biologiczną, lecz ich niestabilność oraz ograniczona rozpuszczalność w fazach wodnych uzasadniają wykorzystanie układów nośnikowych typu SLN [182].

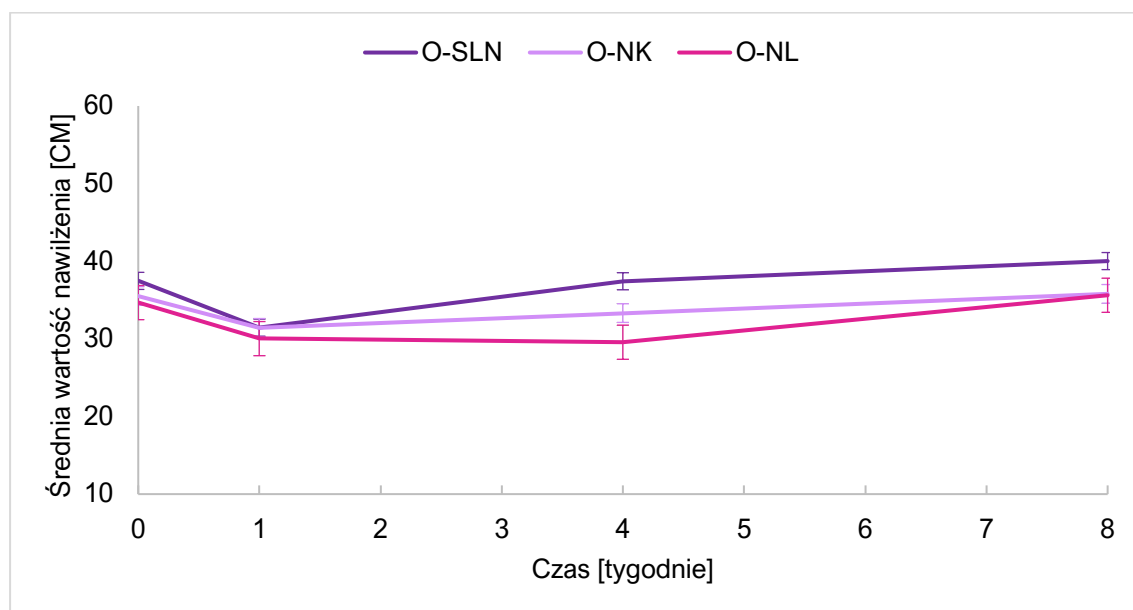
Analiza zmian poziomu nawilżenia naskórka

Badanie stopnia nawilżenia skóry przeprowadzono przy użyciu korneometru, wykorzystującego zmianę stałej dielektrycznej powierzchni naskórka jako miarę jego uwodnienia. Metoda ta pozwala w sposób nieinwazyjny określić skuteczność działania preparatów o właściwościach hydrofilowych i okluzyjnych. Analizie poddano wpływ stosowania badanych oleożeli (rys. 7.24, 7.25) i emulsji (rys. 7.26,

7.27), w tym układów zawierających kostunolid i lakton dehydrokustusowy, na poziom nawilżenia skóry w czasie 8 tygodni aplikacji



Rys. 7.24. Zmiany poziomu nawilżenia wyznaczone dla oleożeli, zawierających substancje aktywne w formie klasycznej, w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako średnia uzyskanych wyników $\pm$ odchylenie standardowe)



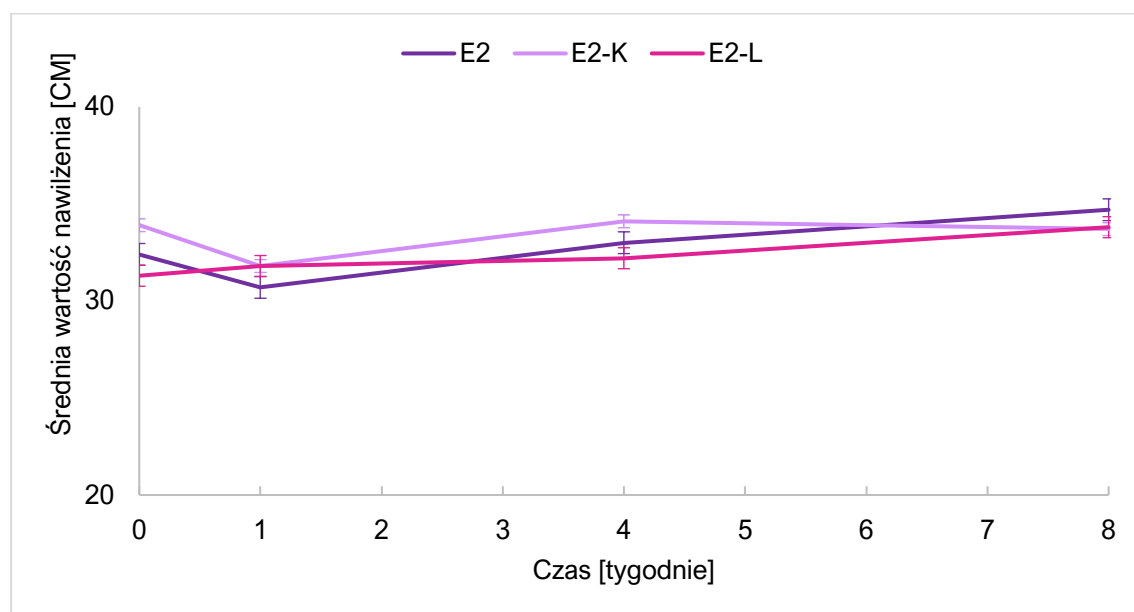
Rys. 7.25. Zmiany poziomu nawilżenia wyznaczone dla oleożeli z zliofilizowanymi nanocząstkami lipidowymi w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako średnia uzyskanych wyników $\pm$ odchylenie standardowe)

Stosowanie oleożelu bez substancji aktywnych (O) spowodowało umiarkowany spadek poziomu nawilżenia skóry w trakcie ośmiotygodniowej aplikacji – o ok. 7,5% (rys. 7.24). Dodatek kostunolidu (O-K) wywołał zbliżony trend, natomiast formuła zawierająca lakton dehydrokustusowy (O-L) wykazała nieco silniejszy spadek, sięgający ok. 12%. Wskazuje to, że w przypadku oleożeli wprowadzenie wolnych laktonów seskwiterpenowych nie przyczyniło się do poprawy nawilżenia, co może

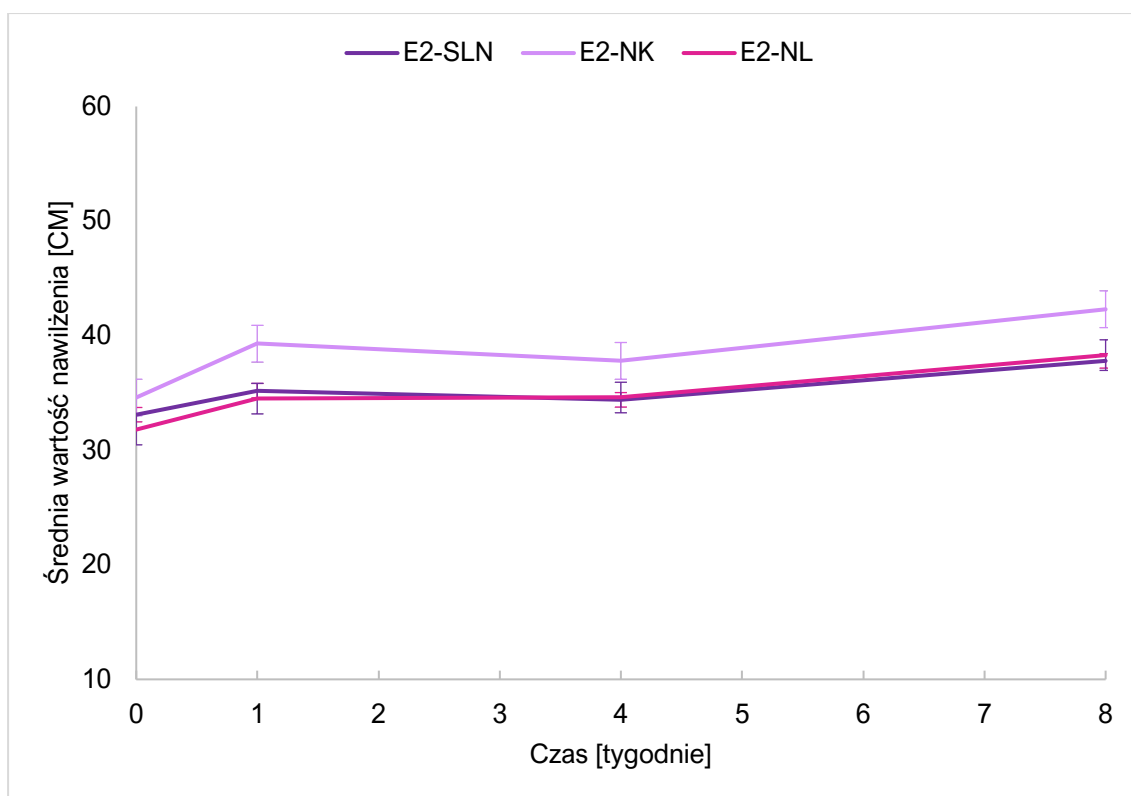
wynikać z ograniczonej dyfuzji substancji lipofilowych w zwartej strukturze żelowej oraz z braku wodnej fazy zewnętrznej.

Zdecydowanie korzystniejsze rezultaty uzyskano dla układów z nanocząstkami lipidowymi. W przypadku oleożelu z nanostrukturami lipidowymi bez substancji aktywnej (O-SLN) odnotowano wzrost poziomu nawilżenia o około 6–7%, (rys 7.25) co sugeruje, że sam nośnik lipidowy wpływał korzystnie na właściwości okluzyjne formulacji. Dodatek kostunolidu (O-NK) skutkował niewielką poprawą, natomiast formuacja z laktonem dehydrokustusowym (O-NL) wykazała wzrost nawilżenia o ok. 2–3%. Choć zmiany te są relatywnie niewielkie, mogą wskazywać na stabilizujący wpływ nanocząstek lipidowych na retencję wilgoci w strukturze żelu, co znajduje potwierdzenie w literaturze dotyczącej układów żelowych z nanoenkapsulowanymi lipidami bioaktywnymi [183].

Uzyskane wyniki sugerują, że oleożele jako układy bezwodne, charakteryzują się naturalnie wyższym początkowym poziomem nawilżenia w porównaniu do emulsji, jednak efekt ten ulega stopniowemu osłabieniu w czasie. Dodatek nanocząstek lipidowych pełni przede wszystkim funkcję ochronną — stabilizuje strukturę formulacji i ogranicza utratę wody z powierzchni skóry, zamiast intensyfikować jej uwodnienie. Zjawisko to jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, według których efekt okluzji w układach lipidowych może dominować nad klasycznym działaniem humektantowym [184].



Rys. 7.26. Zmiany poziomu nawilżenia wyznaczone dla emulsji zawierających substancje aktywne w formie klasycznej w toku badań aplikacyjnych *in vivo* (dane wyrażone jako średnia uzyskanych wyników $\pm$ odchylenie standardowe).



Rys. 7.27. Zmiany poziomu nawilżenia wyznaczone dla emulsji 2 z wodną dyspersją nanocząstek lipidowych (w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako średnia uzyskanych wyników $\pm$ odchylenie standardowe)

W przypadku stosowania emulsji bazowej (E2) zaobserwowano stopniowy wzrost poziomu nawilżenia skóry w trakcie ośmiotygodniowej aplikacji, sięgający około 7% względem wartości początkowej (rys. 7.26). Dodatek kostunolidu (E2-K) nie wpłynął istotnie na poziom uwodnienia – po ośmiu tygodniach wartość tego parametru utrzymywała się na poziomie zbliżonym do emulsji bazowej (zmiana o ok. 0,6%). Z kolei formuła zawierająca lakton dehydrokustusowy (E2-L) wykazała stopniową poprawę nawilżenia, wynoszącą około 8% względem wartości początkowej.

Wyraźniej korzystniejszy efekt obserwowano po zastosowaniu emulsji z nanocząstkami lipidowymi. Dla układu bazowego z nośnikiem (E2-SLN) odnotowano wzrost poziomu nawilżenia o około 14% (rys. 7.27), natomiast dla systemów zawierających substancje aktywne – kostunolid (E2-NK) i lakton dehydrokustusowy (E2-NL) – poprawa była jeszcze bardziej znacząca, wynosząc odpowiednio 22% i 20%. Oznacza to, że zastosowanie nanocząstek lipidowych zwiększyło efektywność działania substancji aktywnych w zakresie poprawy hydratacji skóry średnio o 12–15 punktów procentowych w stosunku do układów klasycznych.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że obecność nanostrukturalnego nośnika znacząco poprawia biodostępność i retencję substancji aktywnych w warstwie rogowej, co przekłada się na utrzymanie lepszego poziomu nawilżenia. Podobne zjawisko zaobserwowano w badaniach dotyczących systemów SLN z witaminą E oraz koenzymem Q10, w których wzrost nawilżenia skóry wynosił 15–25% względem emulsji klasycznych [185].

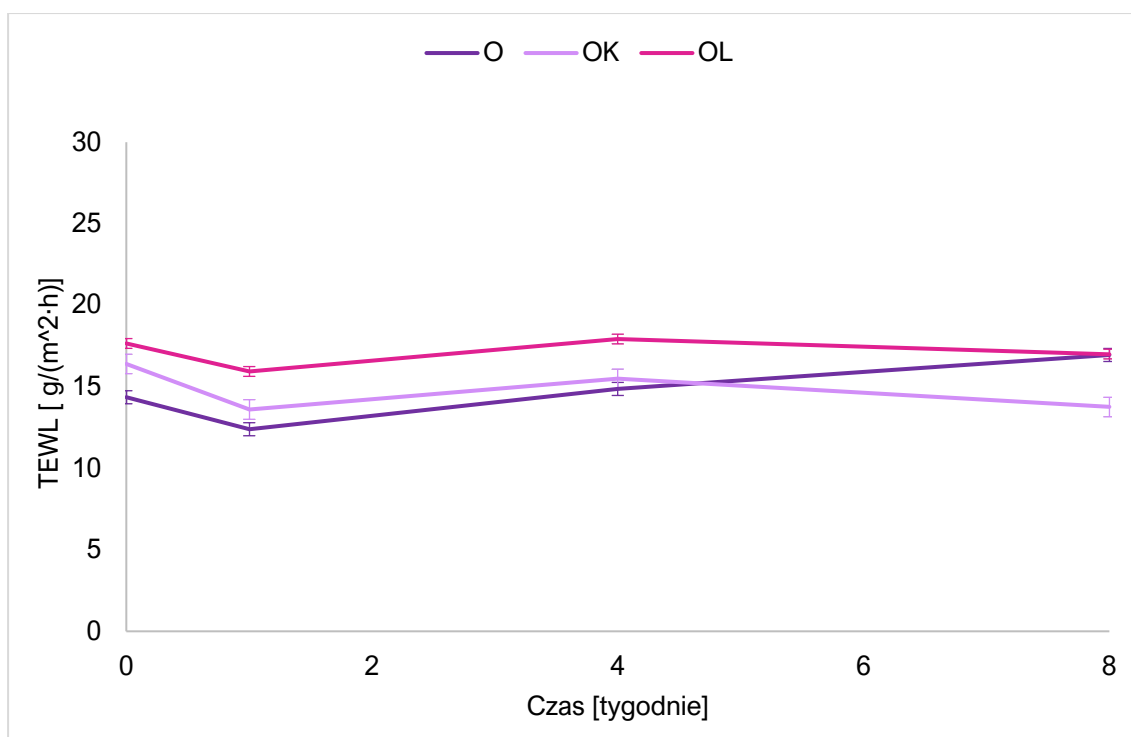
Mechanizm ten tłumaczony jest zdolnością nanocząstek lipidowych do tworzenia cienkiej, półprzepuszczalnej warstwy okluzyjnej na powierzchni skóry, która ogranicza transepidermalną utratę wody (TEWL) i jednocześnie ułatwia przenikanie substancji aktywnych w głąb naskórka [186].

Porównanie wszystkich układów wykazało, że najlepsze efekty w zakresie zwiększenia nawilżenia skóry uzyskano dla emulsji zawierających laktony seskwiterpenowe inkorporowane w nanocząstkach lipidowych. Po 8 tygodniach wzrost nawilżenia skóry w tych próbach wynosił średnio 20–22 %, podczas gdy w analogicznych emulsjach bez nośników wzrost ten nie przekraczał 8–10 %. Dla oleożeli zmiany były mniej wyraźne, a tendencje wskazywały raczej na utrzymanie lub nieznaczny spadek poziomu uwodnienia. Wyniki potwierdzają, że skuteczność kosmetycznych preparatów z laktonami seskwiterpenowymi jest silnie zależna od struktury układu dyspersyjnego oraz obecności nanonośników, które zwiększają dostępność biologiczną i zdolność wiązania wody w naskórku.

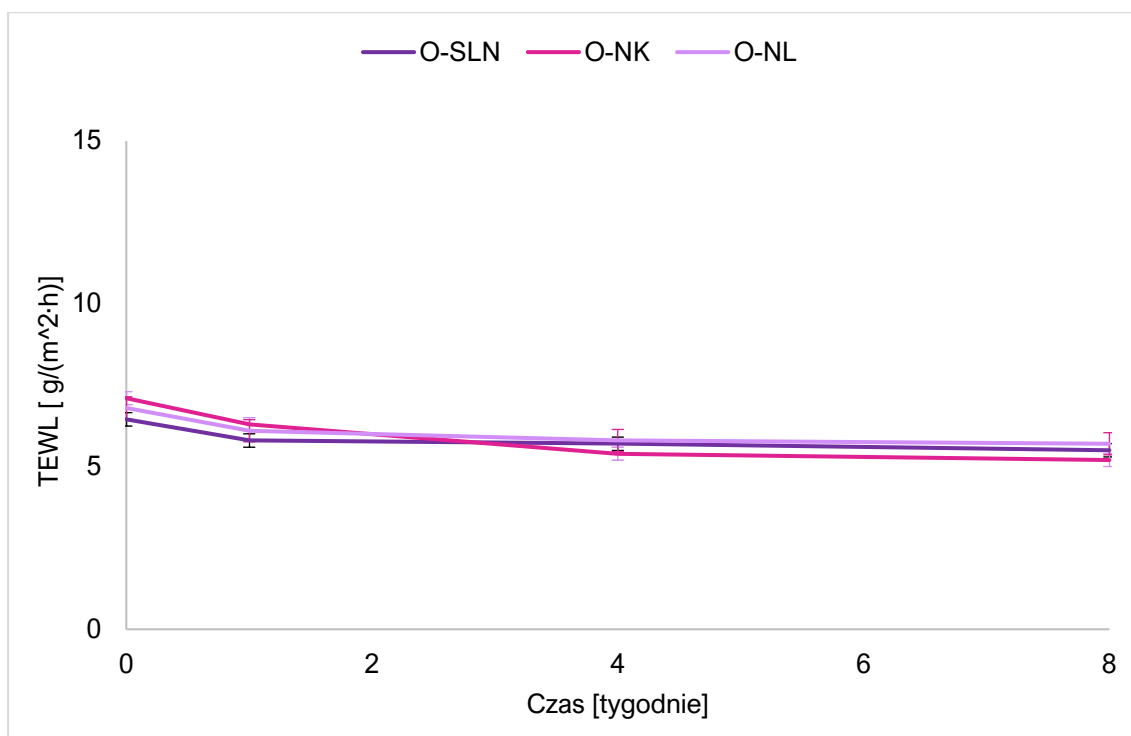
Zastosowanie nanocząstek lipidowych może zatem stanowić efektywną strategię zwiększania bioaktywności związków naturalnych o ograniczonej rozpuszczalności w fazie wodnej, takich jak kostunolid i lakton dehydrokustusowy. Wyniki te są zgodne z doniesieniami literaturowymi, w których podkreśla się, że układy SLN oraz NLC znacząco poprawiają parametry nawilżenia skóry i redukują przeznaskórkową utratę wody (TEWL) w porównaniu z tradycyjnymi emulsjami [187].

Analiza zmian przeznaskórkowej utraty wody (TEWL)

Badania przeznaskórkowej utraty wody (TEWL) wykonano w celu oceny wpływu badanych formułacji kosmetycznych na integralność i funkcjonalność bariery naskórkowej po aplikacji preparatów. Analizie poddano wpływ stosowania badanych oleożeli (rys. 7.28, 7.29) i emulsji (rys. 7.30, 7.31), w tym układów zawierających kostunolid i lakton dehydrokustusowy, na poziom nawilżenia skóry w czasie 8 tygodni aplikacji.



Rys. 7.28. Zmiany poziomu TEWL wyznaczone dla oleożeli zawierających substancje aktywne w formie klasycznej w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako średnia uzyskanych wyników $\pm$ odchylenie standardowe).



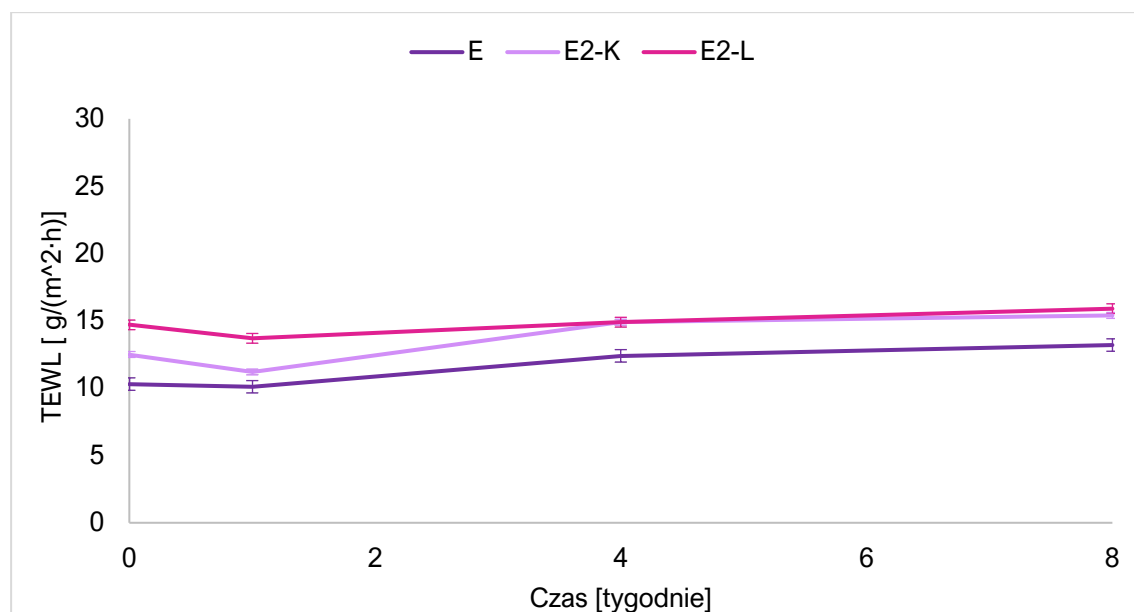
Rys. 7.29. Zmiany poziomu TEWL wyznaczone dla oleożeli z zliofilizowanymi nanocząstkami lipidowymi w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako średnia uzyskanych wyników $\pm$ odchylenie standardowe).

W przypadku stosowania oleożelu bazowego (O) zaobserwowano niewielkie wahania wartości TEWL w czasie, z początkowym spadkiem w pierwszym tygodniu stosowania, a następnie nieznacznym wzrostem po ośmiu tygodniach (rys. 7.28)

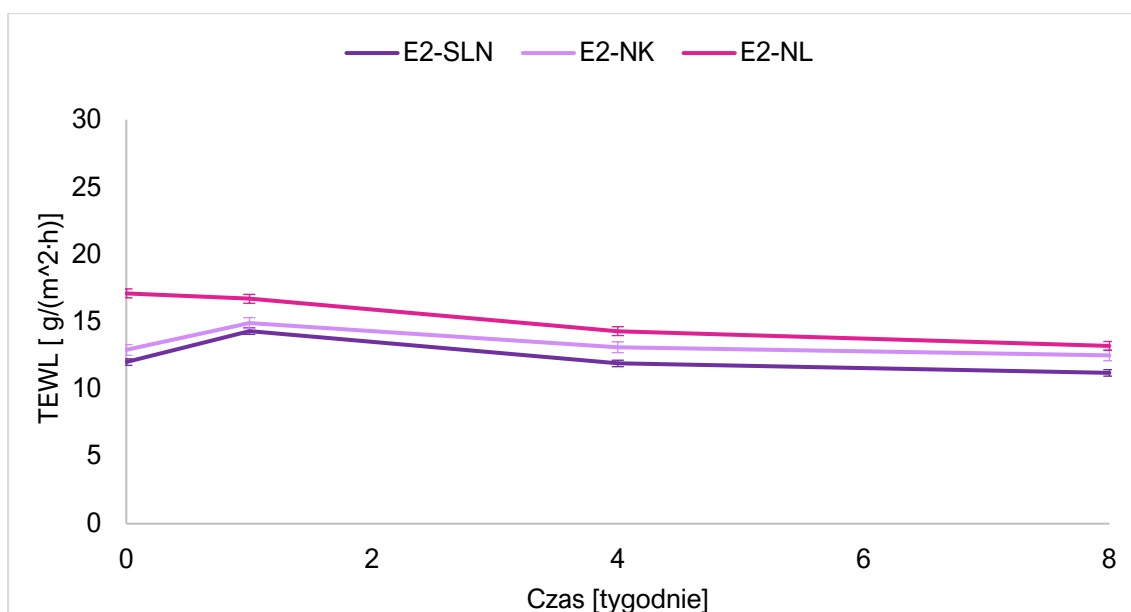
Zmiany te mieściły się w zakresie ok. $\pm 15\%$ względem wartości wyjściowej. Podobny trend zaobserwowano w przypadku formułacji zawierających substancje aktywne (O-K i O-L), dla których również odnotowano nieznaczny wzrost TEWL w końcowej fazie badania. Może to wskazywać, że długotrwała aplikacja tych układów prowadziła do częściowego zaburzenia równowagi wodno-lipidowej naskórka, prawdopodobnie w wyniku akumulacji lipidów na jego powierzchni i ograniczonej dyfuzji substancji aktywnych w gęstej strukturze żelowej.

Zdecydowanie korzystniejsze rezultaty uzyskano dla oleożeli zawierających nanocząstki lipidowe. W ich przypadku wartości TEWL systematycznie się obniżały, osiągając po ośmiu tygodniach poziom niższy o ok. 15–20% w stosunku do wartości początkowych (rys. 7.29). Największy efekt redukcji przeznaskórkowej utraty wody zaobserwowano dla formułacji z kostunolidem (O-NK), gdzie spadek wynosił około 20–25%, co wskazuje na wyraźną poprawę funkcji barierowej skóry.

Otrzymane wyniki potwierdzają, że wprowadzenie nanocząstek lipidowych do układów żelowych zwiększa ich właściwości okluzyjne i sprzyja utrzymaniu integralności bariery naskórkowej. Zjawisko to jest zgodne z obserwacjami Wissing i Müllera [184], którzy wykazali, że systemy typu SLN mogą ograniczać TEWL nawet o 10–30% w porównaniu z klasycznymi preparatami olejowymi. Efekt ten tłumaczony jest tworzeniem przez nanostruktury lipidowe cienkiej warstwy filmotwórczej o właściwościach mikrookluzyjnych, która redukuje parowanie wody z powierzchni skóry i wspiera jej regenerację.



Rys. 7.30. Zmiany poziomu TEWL wyznaczone dla emulsji 2, zawierających substancje aktywne w formie klasycznej w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako średnia uzyskanych wyników $\pm$ odchylenie standardowe).



Rys. 7.31. Zmiany poziomu TEWL wyznaczone dla emulsji 2 z wodną dyspersją nanocząstek lipidowych w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako średnia uzyskanych wyników $\pm$ odchylenie standardowe).

W przypadku stosowania emulsji bazowej (E2) zaobserwowano niewielkie wahania wartości TEWL w czasie trwania badania (rys. 7.30). Po krótkotrwałym spadku w pierwszym tygodniu, w kolejnych tygodniach nastąpił umiarkowany wzrost przeznaskórkowej utraty wody, sięgający około 20% względem wartości początkowej. Dla emulsji z kostunolidem (E2-K) oraz z laktonem dehydrokostusowym (E2-L) zmiany były bardziej wyraźne i oscylowały w granicach +15–25%, co sugeruje, że w początkowym okresie aplikacji obie substancje mogły czasowo modulować strukturę lipidów międzykomórkowych, prowadząc do zwiększonej przepuszczalności skóry. Zjawisko to jest zgodne z obserwacjami dotyczącymi innych laktonów seskwiterpenowych, które wykazują działanie keratolityczne i przeciwzapalne, mogące przejściowo wpływać na szczelność bariery naskórkowej [188].

W przypadku stosowania emulsji z nanocząstkami lipidowymi (SLN) początkowe wartości TEWL były relatywnie wyższe (rys. 7.31), co można wiązać z większym udziałem fazy lipidowej w formulacji. W pierwszym tygodniu zaobserwowano krótkotrwały wzrost TEWL o ok. 10–15% (E2-SLN), szczególnie w przypadku układów z kostunolidem (E2-NK) i laktonem dehydrokostusowym (E2-NL). Jednak po ośmiu tygodniach pomiarów wartości te spadły o 20–25% względem wartości wyjściowych, co wskazuje na odbudowę i wzmocnienie bariery hydrolipidowej oraz adaptację skóry do stosowanych preparatów.

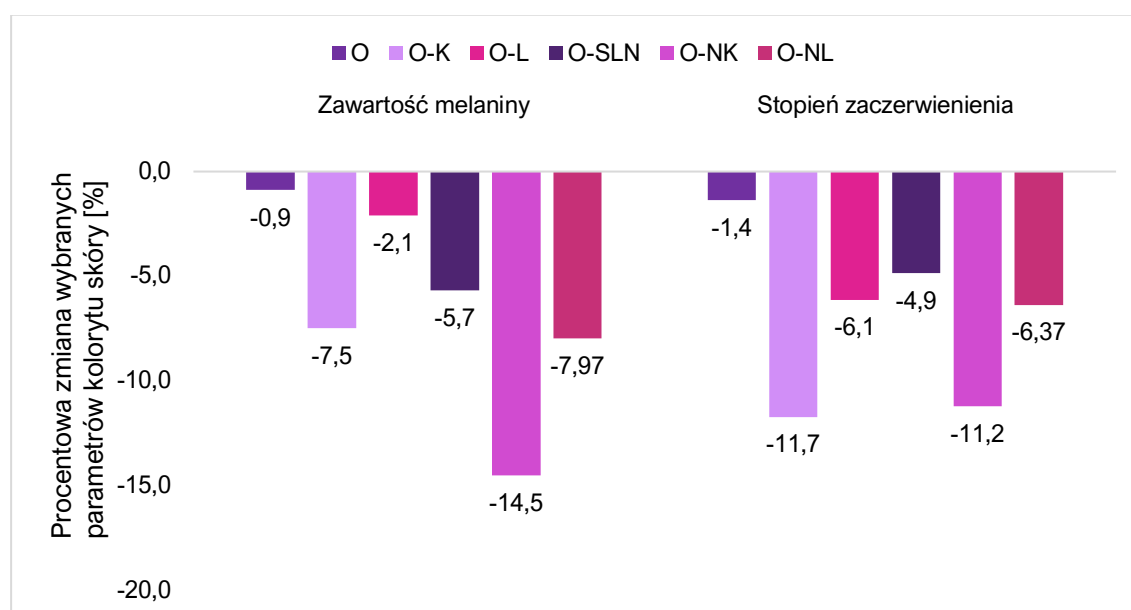
Zaobserwowany trend – początkowy wzrost, a następnie wyraźny spadek TEWL – potwierdza ochronny wpływ układów z nanocząstkami lipidowymi na warstwę rogową naskórka. Mechanizm ten wynika z tworzenia przez nanostruktury lipidowe cienkiej, okluzyjnej warstwy filmotwórczej, która ogranicza parowanie wody i wspiera reorganizację lipidów cementu międzykomórkowego. Efekt ten został szeroko opisany w literaturze [189], [190] gdzie systemy SLN wykazywały zdolność redukcji TEWL o 10–30% w porównaniu z klasycznymi emulsjami.

Porównując wszystkie badane formułacje, stwierdzono, że emulsje i oleożele bez nanocząstek wykazywały po początkowym spadku stabilizację lub niewielki wzrost TEWL po 4–8 tygodniach stosowania, co sugeruje umiarkowaną poprawę lub utrzymanie bariery naskórkowej. Dla układów oleożelowych wartości TEWL były istotnie niższe niż dla emulsji, co jest typowe dla preparatów bezwodnych o silnych właściwościach okluzyjnych. Z kolei w układach zawierających nanocząstki lipidowe (zarówno w emulsjach, jak i oleożelach) obserwowano systematyczny spadek wartości TEWL w czasie trwania badań, co wskazuje na istotny efekt ochronny i regeneracyjny względem warstwy rogowej.

Warto podkreślić, że wyniki TEWL są odwrotnie skorelowane z wartościami nawilżenia skóry uzyskanymi w poprzednim badaniu – formułacje, które wykazywały największy wzrost nawilżenia (E2-NK, E2-NL) równocześnie charakteryzowały się największym spadkiem TEWL (15–20 %), co świadczy o poprawie spójności bariery hydrolipidowej. Zależność ta jest zgodna z raportowanymi w literaturze wynikami dla preparatów z koenzymem Q10 i witaminą E w układach SLN [191]

Analiza zmian zawartości melaniny i stopnia zaczerwienienia skóry

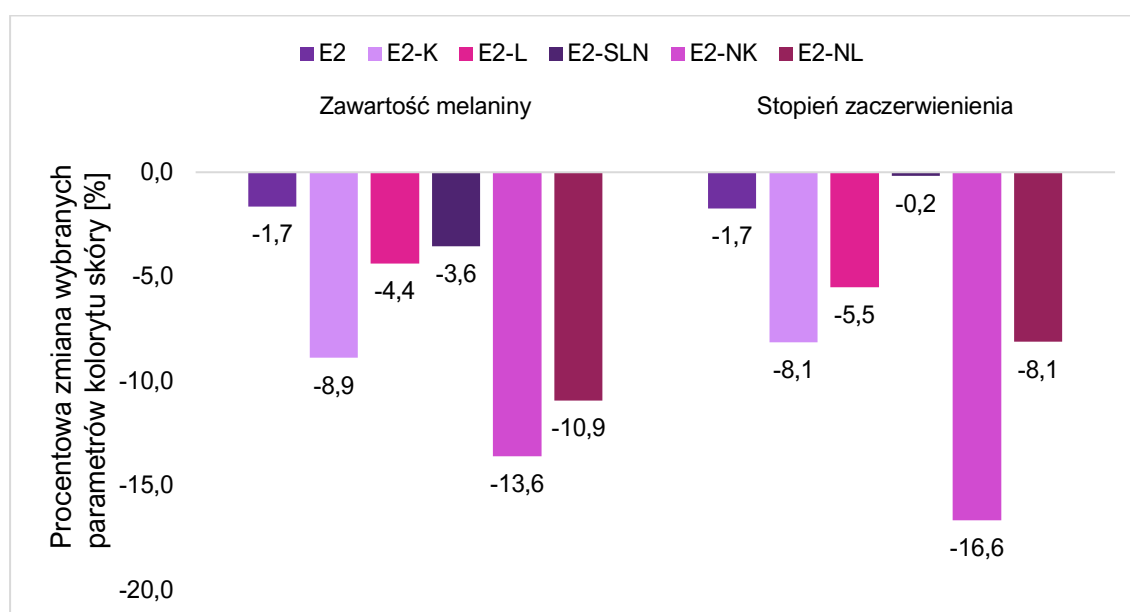
W celu oceny wpływu badanych preparatów na koloryt skóry przeprowadzono pomiary zawartości melaniny oraz stopnia zaczerwienienia. Analiza tych parametrów umożliwiła identyfikację subtelnych zmian depigmentacyjnych oraz obniżających widoczność zmian naczyniowych zachodzących w wyniku regularnej aplikacji formułacji. Wyniki przedstawiono jako procentową zmianę zawartości melaniny i stopnia zaczerwienienia w stosunku do wartości wyjściowych (tydzień 0) po 8 tygodniach stosowania oleożeli (rys. 7.32) i emulsji (rys. 3.33) zawierających kostunolid i lakton dehydrokustusowy.



Rys. 7.32. Zmiany zawartości melaniny i stopnia zaczerwienienia wyznaczone dla przygotowanych oleożeli w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako zmiana procentowa t0-t8)

W układach bezwodnych (oleożelowych) stwierdzono spadek zawartości melaniny i stopnia zaczerwienienia, choć dynamika zmian była nieco inna niż w emulsjach. Stosowanie oleożelu bazowego (O) charakteryzowało się niewielkim spadkiem zawartości melaniny (0,9%) oraz stopnia zaczerwienienia (1,4%), co odzwierciedla głównie efekt okluzyjny, bez istotnego działania biologicznego. Po wprowadzeniu substancji aktywnych, efekty uległy nasileniu – dla oleożelu z kostunolidem (O-K) zmniejszenie zawartości melaniny wyniosło 7,5%, a zaczerwienienia 11,7%. W przypadku oleożelu z dodatkiem laktonu dehydrokustusowego (O-L) efekt rozjaśnienia był umiarkowany 2,1% przy równoczesnym obniżeniu zaczerwienienia o 6,1%.

Najsilniejsze działanie obserwowano dla układów, w których substancje aktywne zostały inkorporowane w nanocząstkach lipidowych (rys. 7.33). Formuła z inkorporowanym kostunolidem (O-NK) charakteryzowała się spadkiem zawartości melaniny o 14,5% oraz zaczerwienienia o 11,2%, natomiast z inkorporowanym laktonem dehydrokustusowym o odpowiednio 8% i 6,4% (O-NL). Wprowadzenie samego nośnika lipidowego do oleożelu (O-SLN) powodowało umiarkowane zmniejszenie wartości obu parametrów (5,7% dla melaniny i 4,9% dla zaczerwienienia), co sugeruje, że efekt w tym przypadku wynika z połączenia działania substancji aktywnej i kontrolowanego uwalniania z nośnika.



Rys. 7.33. Zmiany zawartości melaniny i stopnia zaczerwienienia wyznaczone dla przygotowanych emulsji w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako zmiana procentowa t0-t8)

W przypadku stosowania emulsji bazowej (E2) oraz jej modyfikacji odnotowano ogólną tendencję spadkową obu parametrów, wskazującą na rozjaśnienie skóry i działanie uspokajające. Najmniejszy efekt obserwowano dla emulsji bazowej, w której zarówno zawartość melaniny i stopnia zaczerwienienia zmniejszyły się o 1,7%. Dodatek kostunolidu (E2-K) w istotny sposób zwiększył skuteczność formuły – zawartość melaniny spadła o 8,9%, a stopień zaczerwienienia o 8,1%. Lakton dehydrokustusowy (E2-L) również wykazał efekt rozjaśniający i uspokajający, choć nieco słabszy (odpowiednio 4,4% i 5,5%).

Jeszcze wyraźniejsze zmiany zaobserwowano w próbach zawierających substancje aktywne enkapsulowane w nanocząstkach lipidowych. Emulsja z inkorporowanym kostunolidem (E2-NK) wykazała najsilniejszy efekt rozjaśniający – spadek zawartości melaniny o 13,6% i zaczerwienienia o 16,6%, podczas gdy emulsja z inkorporowanym laktonem dehydrokustusowym (E2-NL) obniżała te parametry odpowiednio o 10,9% i 8,1%. Dla porównania, emulsja z samym nośnikiem lipidowym (E2-SLN) nie zawierająca substancji aktywnej powodowała jedynie niewielkie zmiany (3,6% dla melaniny i 0,2% dla stopnia zaczerwienienia).

Otrzymane wyniki potwierdzają, że enkapsulacja kostunolidu i laktonu w nanostrukturach lipidowych znacząco zwiększa ich aktywność biologiczną. Poprawa biodostępności substancji aktywnych, a także ich dłuższe utrzymywanie się w warstwie rogowej mogły przyczynić się do silniejszego hamowania procesów melanogenezy oraz do redukcji mikrozapalnych reakcji w skórze.

Zarówno w przypadku emulsji, jak i w oleożeli stwierdzono, że kostunolid wykazuje silniejsze działanie rozjaśniające i łagodzące niż lakton dehydrokustusowy, niezależnie od rodzaju matrycy. Największe zmiany w obu parametrach zaobserwowano dla formułacji z kostunolidem enkapsulowanym w nanocząstkach lipidowych (E2-NK i O-NK), co potwierdza synergistyczny efekt substancji aktywnej i nośnika.

Zaobserwowane zjawisko może wynikać z kilku mechanizmów. Po pierwsze, kostunolid wykazuje właściwości przeciwzapalne i antyoksydacyjne, które mogą hamować ekspresję cytokin prozapalnych i pośrednio ograniczać nadprodukcję melaniny [192]. Po drugie, nanocząstki lipidowe zwiększają penetrację substancji lipofilowych w naskórku, co sprzyja ich dłuższemu kontaktowi z komórkami melanocytarnymi i keratynocytami, prowadząc do bardziej równomiernego kolorytu skóry [193].

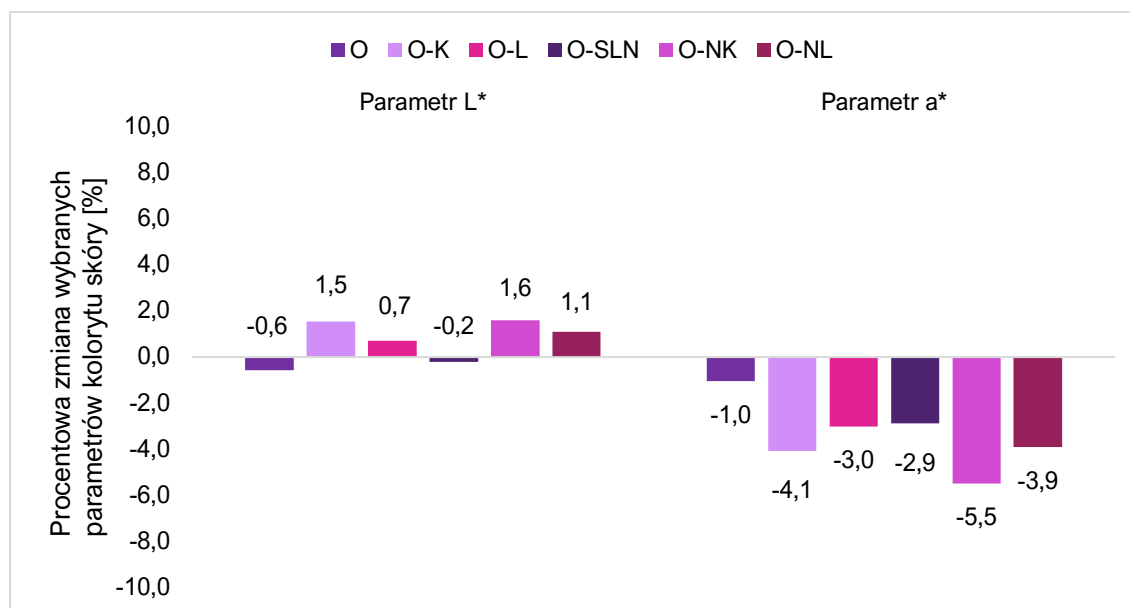
Formułacje z laktonem dehydrokustusowym również wykazywały korzystne właściwości, choć ich wpływ był słabszy, co może wynikać z niższej stabilności chemicznej laktonu w środowisku lipidowym oraz jego mniejszego powinowactwa do receptorów zaangażowanych w regulację procesów zapalnych.

Badanie meksametrem pozwoliło jednoznacznie potwierdzić, że zarówno emulsje, jak i oleożele z badanymi substancjami aktywnymi wpływają na poprawę kolorytu skóry poprzez zmniejszenie zawartości melaniny i redukcję zaczerwienienia. Wyniki te potwierdzają, że połączenie aktywnych laktonów seskwiterpenowych z nanostrukturami lipidowymi wzmacnia działanie rozjaśniające i uspokajające, prawdopodobnie poprzez poprawę przenikania, ochronę substancji przed degradacją i modulację procesów zapalnych w naskórku.

Analiza zmian parametrów kolorytu skóry

W celu oceny wpływu stosowania preparatów na barwę i ogólny wygląd skóry wykonano pomiary kolorymetryczne obejmujące parametry L^* (jasność) oraz a^* (nasycenie czerwieni). Analiza tych wartości pozwala na określenie czy aplikacja emulsji i oleożeli powodowała rozjaśnienie skóry bądź zmiany w jej zabarwieniu wynikające z reakcji naczyniowych. Wyniki przedstawiono jako procentową zmianę wartości parametru L^* oraz a^* w stosunku do wartości wyjściowych (tydzień 0) po

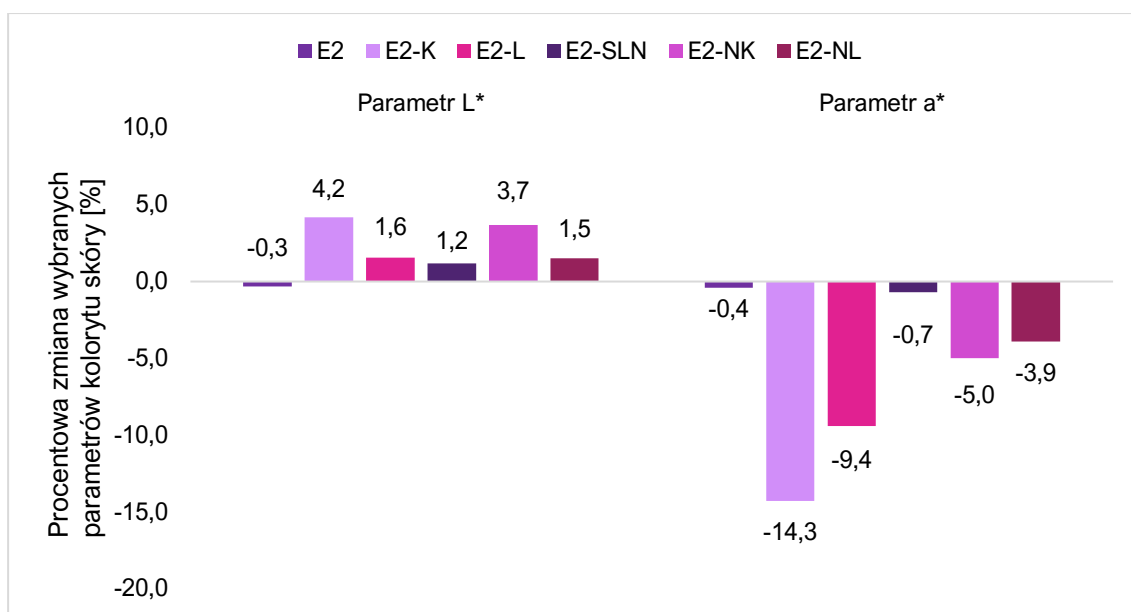
8 tygodniach stosowania oleożeli (rys. 7.34) i emulsji (rys. 3.35) zawierających kostunolid i lakton dehydrokustusowy.



Rys. 7.34. Zmiany parametrów L* i a* wyznaczone dla przygotowanych oleożeli w toku badań in vivo (dane wyrażone jako zmiana procentowa t0-t8)

Stosowanie oleożelu bazowego (O) powodowało niewielki spadek jasności (0,6%) i wzrost odcienia czerwonego (1,0%), co może być związane z efektem okluzyjnym oraz zwiększeniem mikrokrażenia skóry po aplikacji fazy lipidowej. Dodatek kostunolidu (O-K) wpłynął korzystnie na rozjaśnienie skóry (1,5%) i zmniejszenie zaczerwienienia (4,1%), natomiast lakton dehydrokustusowy (O-L) w mniejszym stopniu rozjaśniał skórę (0,7%) oraz w mniejszym stopniu zwiększał parametr a* (3,0%).

Najbardziej korzystne zmiany ponownie odnotowano dla formułacji z substancjami aktywnymi enkapsulowanymi w nanocząstkach lipidowych. Oleożel z zainkorporowanym kostunolidem (O-NK) powodował najwyższy wzrost jasności (1,6%) i umiarkowany wzrost czerwonego tonu skóry (5,5%), natomiast układ z zainkorporowanym laktonem dehydrokustusowym (O-NL) wykazywał nieco mniejsze zmiany – wartości L* o 1,1% i a* o 3,9%. Warto zwrócić uwagę, że nośnik lipidowy sam w sobie nie zwiększał jasności skóry (O-SLN), ale wpływał na barwę czerwoną (2,9%), co potwierdza, że nanostruktury lipidowe mogą działać jako mikroreflektory światła na powierzchni skóry, poprawiając jej wizualną jednorodność [194].



Rys. 7.35. Zmiany parametrów L^* i a^* wyznaczone dla przygotowanych emulsji w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako zmiana procentowa t_0 - t_8)

W przypadku stosowania emulsji bazowej (E2) zaobserwowano minimalny spadek jasności skóry (0,3%) oraz nieznaczny spadek parametru a^* (0,4%), co wskazuje na brak istotnego wpływu na koloryt skóry (7.35). Dodatek kostunolidu (E2-K) powodował wyraźny wzrost jasności o około 4,2% oraz umiarkowany spadek odcienia czerwonego (14,3%), co może wynikać z poprawy mikrokrążenia i dotlenienia naskórka. W przypadku dodatku laktonu dehydrokustusowego (E2-L) zmiany były łagodniejsze – jasność skóry zwiększyła się o ok. 1,6%, a parametr a^* spadł o 9,4%, co może świadczyć o delikatnym efekcie rewitalizującym i wyrównaniu kolorytu.

Zdecydowanie silniejszy efekt uzyskano dla emulsji z nanocząstkami lipidowymi. Formulacja z kostunolidem enkapsulowanym w nanocząstkach (E2-NK) powodowała wzrost jasności o 3,7% oraz wyraźne obniżenie odcienia czerwonego o 5,0%, przy czym w przypadku dodatku laktonu dehydrokustusowego (E2-NL) enkapsulowanego w nanocząstkach jasność wzrosła o 1,5%, a odcień czerwony zmalał o 3,9%. Sam nośnik lipidowy bez substancji aktywnej dodany do formulacji (E2-SLN), nie powodował znaczących zmian w zakresie kolorytu skóry.

Analizując całość wyników dla emulsji, można stwierdzić, że enkapsulacja substancji aktywnych w nanocząstkach lipidowych zwiększa stabilność kolorytu i redukuje nierównomierne zaczerwienienie, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi meksametru. Kostunolid, dzięki właściwościom przeciwzapalnym i antyoksydacyjnym, dodatkowo ogranicza mikrozapalenia i poprawia równomierność barwy skóry.

Analiza wyników wskazuje, że zarówno emulsje, jak i oleożele powodowały wzrost parametru L^* , co potwierdza efekt rozjaśnienia skóry po ośmiotygodniowym stosowaniu. Największy wzrost jasności zanotowano dla E2-NK (4,2%) i O-NK (1,6%), co sugeruje, że obecność nanocząstek lipidowych w formulacji istotnie poprawia właściwości optyczne skóry.

Parametr a^* , związany ze stopniem zaczerwienienia, wykazywał umiarkowany spadek we wszystkich próbach, szczególnie w formulacjach zawierających nośniki lipidowe, co można wiązać z poprawą mikrokrążenia i lepszym dotlenieniem naskórka, bez cech podrażnienia.

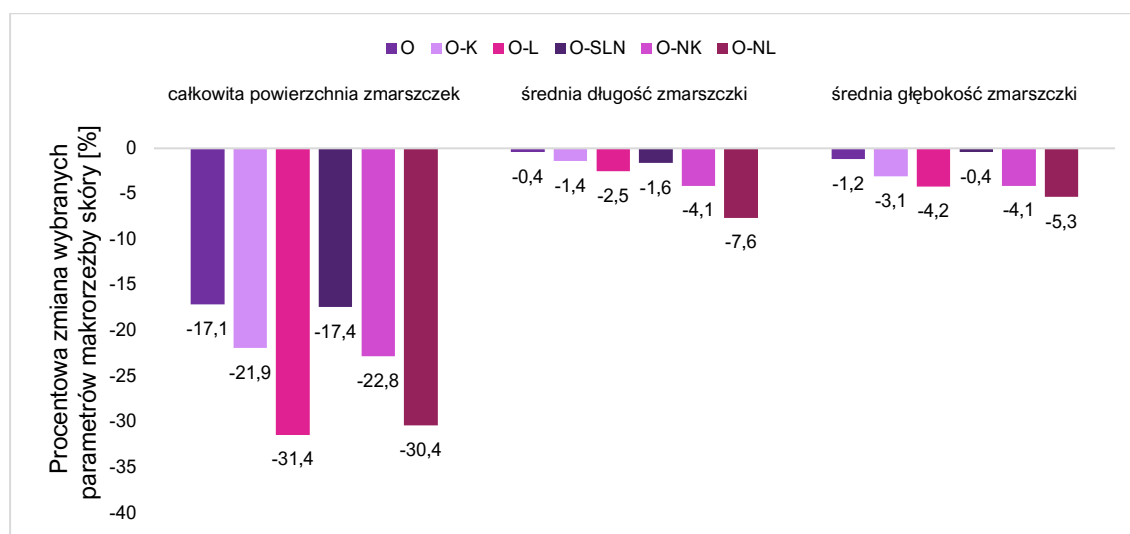
W grupie oleożeli wartości parametrów L^* i a^* wykazywały podobny trend jak w emulsjach, jednak zmiany były bardziej umiarkowane. Zależność między parametrami L^* , a^* , a wcześniejszymi wynikami meksametru jest wyraźna: preparaty, które powodowały spadek zawartości melaniny i zaczerwienienia (E2-NK, O-NK), jednocześnie zwiększały L^* (rozjaśnienie) oraz stabilizowały a^* , co potwierdza zgodność pomiarów instrumentalnych i efektów wizualnych.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że badane formulacje, zwłaszcza te zawierające kostunolid i lakton dehydrokustusowy w nanocząstkach lipidowych, wpływają na poprawę kolorytu skóry poprzez wzrost jasności (L^*) oraz zmniejszenie nierównomiernego zabarwienia (a^*). Kostunolid wykazał nieco silniejsze działanie rozjaśniające, co może wynikać z jego większej stabilności i aktywności biologicznej w środowisku lipidowym.

Otrzymane rezultaty są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dla parametrów TEWL, nawilżenia i meksametru, potwierdzając, że formulacje z nanocząstkami lipidowymi zapewniają lepsze właściwości ochronne i estetyczne skóry, co czyni je szczególnie obiecującymi nośnikami dla kosmetycznych laktonów seskwiterpenowych

Analiza zmian parametrów makrorzeźby skóry

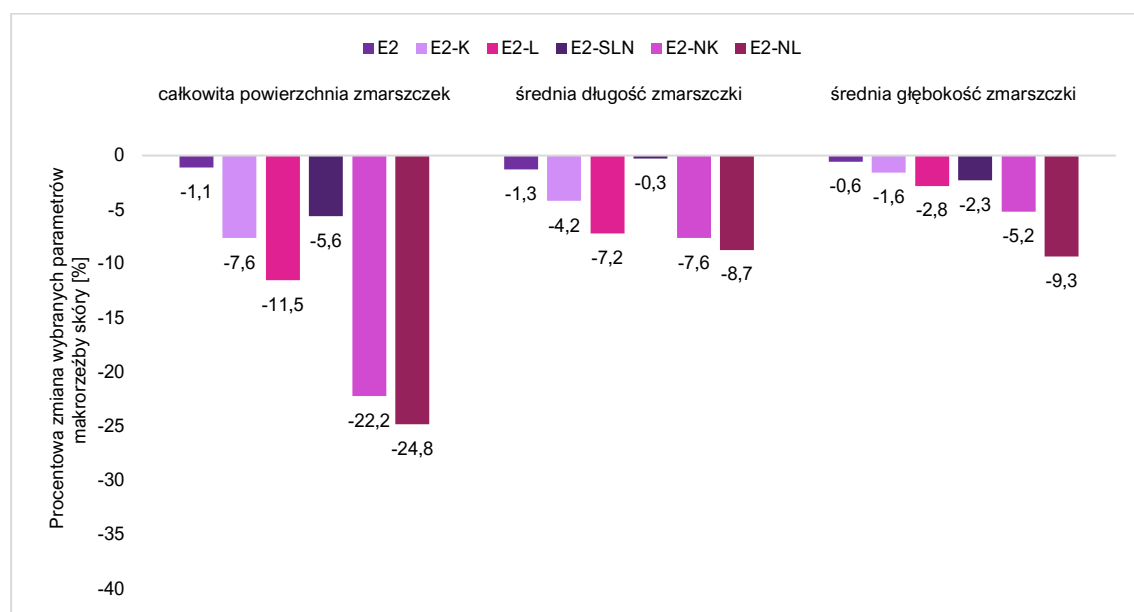
Badanie makrorzeźby skóry umożliwiło ocenę wpływu stosowania badanych formulacji na wybrane parametry związane z starzeniem się skóry, w tym całkowitą powierzchnię zmarszczek, ich średnią długość oraz głębokość. Wyniki przedstawiono jako procentową zmianę tych parametrów w stosunku do wartości wyjściowych (tydzień 0) po 8 tygodniach stosowania. oleożeli (rys. 7.36) i emulsji (rys. 3.37) zawierających kostunolid i lakton dehydrokustusowy.



Rys. 7.36. Zmiany parametrów makrorzeźby skóry wyznaczone dla przygotowanych oleożeli w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako zmiana procentowa t0-t8)

W przypadku stosowania oleożelu bazowego (O) zaobserwowano wyraźny efekt poprawy parametrów skóry, mimo braku fazy wodnej. Całkowita powierzchnia zmarszczek uległa zmniejszeniu o ok. 17%, natomiast dodatek substancji aktywnych wzmacniał ten efekt: kostunolid (O-K) o 21,9% i lakton dehydrokustusowy (O-L) o 31,4%. Wskazuje to, że lakton dehydrokustusowy wykazywał silniejsze działanie w układzie bezwodnym, prawdopodobnie ze względu na większą kompatybilność z lipidową fazą nośnika.

Najlepsze rezultaty uzyskano jednak po wprowadzeniu nanocząstek lipidowych do struktury żelu. Formulacje O-SLN, O-NK i O-NL wykazywały redukcję całkowitej powierzchni zmarszczek odpowiednio o 17,4%, 22,8% i 30,4%, co świadczy o synergistycznym działaniu układu nośnikowego i laktonów. W odniesieniu do długości i głębokości zmarszczek największe zmiany również odnotowano dla formulacji O-NL (7,6% i 5,3%), co potwierdza skuteczność laktonu dehydrokustusowego w systemie nanonośnikowym. Podobne efekty wykazano w badaniach z użyciem SLN zawierających retinol lub ekstrakty roślinne, gdzie poprawa parametrów powierzchniowych skóry sięgała 25–35% [195].



Rys. 7.37. Zmiany parametrów makrorzeźby skóry wyznaczone dla przygotowanych emulsji w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako zmiana procentowa t0-t8)

W grupie emulsji (E2) obserwowano umiarkowane zmiany w strukturze skóry, wskazujące na nieznaczną poprawę parametrów przeciwzmarszczkowych. Całkowita powierzchnia zmarszczek uległa redukcji o 1–12%, przy czym największy spadek zanotowano dla emulsji z laktonem dehydrokustusowym (E2-L, 11,5%). Dodatek kostunolidu (E2-K) powodował łagodniejszy efekt (7,6%), co może wskazywać na jego umiarkowane działanie stymulujące odnowę naskórka. Z kolei formulacje z nanocząstkami lipidowymi wykazały znacznie silniejsze działanie — redukcja powierzchni zmarszczek wynosiła od 22,2% (E2-NK) do 24,8% (E2-NL). Oznacza to, że zastosowanie nanonośników zwiększyło efektywność działania substancji aktywnych ponad dwukrotnie względem emulsji.

Podobne tendencje zaobserwowano w przypadku długości i głębokości zmarszczek. Średnia długość zmarszczek zmniejszyła się o ok. 1 do 9%,

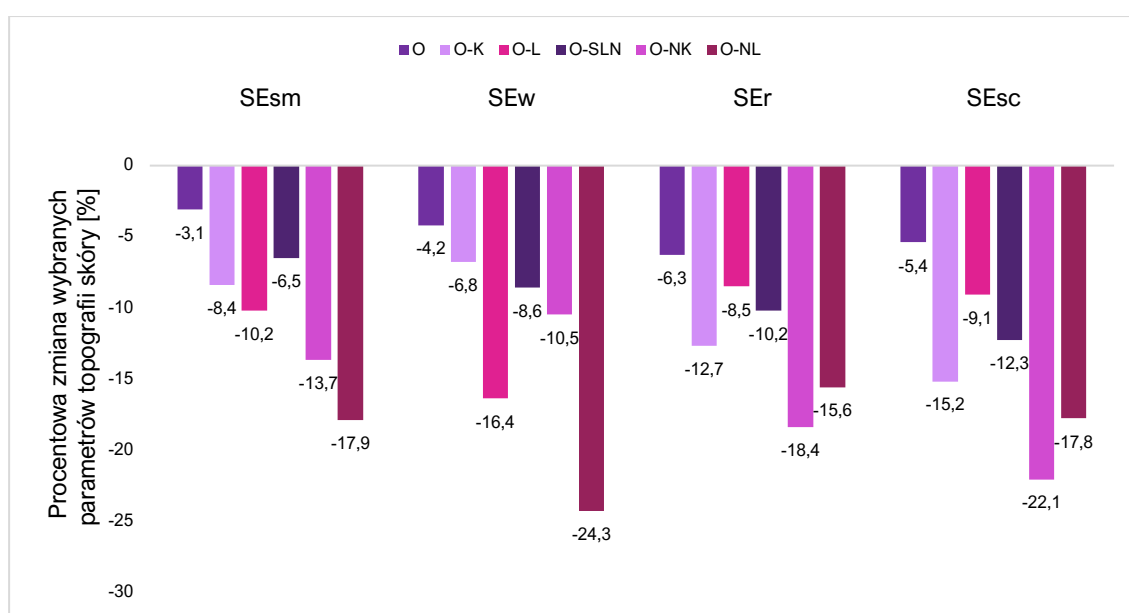
a największy efekt widoczny był dla emulsji zawierającej lakton dehydrokostosowy w nanocząstkach lipidowych (E2-NL, 8,7%). W odniesieniu do głębokości zmarszczek także największy spadek odnotowano dla tej emulsji (9,3%), co może świadczyć o skuteczniejszym przenikaniu i działaniu bioaktywnym laktonów w formie enkapsulowanej.

Zarówno w grupie emulsji, jak i oleożeli, największą poprawę kondycji skóry zaobserwowano w przypadku preparatów zawierających nanocząstki lipidowe z laktonem dehydrokostosowym. Wyniki te wskazują, że zastosowanie laktonów seskwiterpenowych w formie enkapsulowanej w nanonośnikach lipidowych nie tylko zwiększa ich biodostępność, lecz także wydłuża efekt działania przeciwzmarszczkowego. Mechanizm ten można przypisać zwiększonej retencji lipidów w warstwie rogowej oraz powolnemu, kontrolowanemu uwalnianiu substancji aktywnych.

Wyniki obrazowania powierzchni (makrorzeźby) skóry wskazały, że zarówno oleożele, jak i emulsje zawierające nanocząstki lipidowe z laktonami seskwiterpenowymi wykazują wyraźny efekt redukcji zmarszczek. Zmniejszeniu uległa powierzchnia, długość oraz głębokość zmarszczek w porównaniu z próbami kontrolnymi. Najsilniejsze działanie obserwowano dla formułacji z laktonem dehydrokostosowym w postaci SLN, co może być związane z jego zdolnością do stymulowania syntezy kolagenu oraz neutralizacji reaktywnych form tlenu. Z kolei dodatek kostunolidu wykazywał bardziej równomierne działanie wygładzające, prowadzące do poprawy tekstury skóry. Zjawisko to znajduje potwierdzenie w literaturze, gdzie laktony seskwiterpenowe są opisywane jako związki modulujące aktywność fibroblastów, wpływające na ekspresję metaloproteinaz i białek macierzy pozakomórkowej [196]. Ich zastosowanie w nanonośnikach lipidowych pozwala dodatkowo zwiększyć biodostępność i ograniczyć ewentualne działanie drażniące.

Analiza zmian parametrów topografii skóry

Badanie parametrów SELS umożliwiło ocenę wpływu badanych emulsji na topografię powierzchni skóry. Analizowano cztery podstawowe wskaźniki: SEr (szorstkość), SEsc (suchość i łuszczenie naskórka), SEw (zmarszczki) oraz SEsm (gładkość powierzchni). Wyniki przedstawiono jako procentowa zmiana parametrów względem stanu wyjściowego (tydzień 0) po 8 tygodniach stosowania. oleożeli (rys. 7.38) i emulsji (rys. 3.39) zawierających kostunolid i lakton dehydrokostosowy.



Rys. 7.38. Zmiany parametrów makrorzeźby skóry wyznaczone dla przygotowanych oleożeli w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako zmiana procentowa t0-t8)

W przypadku stosowania oleożelu bazowego (O) obserwowano niewielkie, lecz korzystne zmiany wszystkich parametrów. Wartości SEr i SEsc zmniejszyły się odpowiednio o 6,3% i 5,4%, co świadczy o lekkim wygładzeniu powierzchni naskórka oraz ograniczeniu przesuszenia. Zmniejszenie SEw o 4,2% wskazuje na delikatny efekt przeciwzmarszczkowy, natomiast spadek SEsm o 3,1% potwierdza subtelny poprawę gładkości skóry. Efekt ten można przypisać okluzyjnym właściwościom układu żelowego, który redukuje transepidermalną utratę wody, lecz nie zawiera substancji aktywnych intensyfikujących procesy regeneracyjne.

Dodatek kostunolidu do oleożelu (O-K) istotnie nasilił pozytywne zmiany w strukturze skóry. Obniżenie wartości SEr o 12,7 % i SEsc o 15,2 % wskazuje na poprawę nawilżenia i zmniejszenie suchości naskórka, co koreluje z wcześniej obserwowanym korzystnym wpływem kostunolidu na parametry TEWL i nawilżenia. Wartość SEw zmniejszyła się o 6,8 %, co sugeruje, że działanie przeciwzmarszczkowe tej formułacji ma charakter wtórny — wynikający głównie z poprawy nawodnienia warstwy rogowej. Zmniejszenie SEsm o 8,4% potwierdza efekt wygładzający powierzchnię skóry.

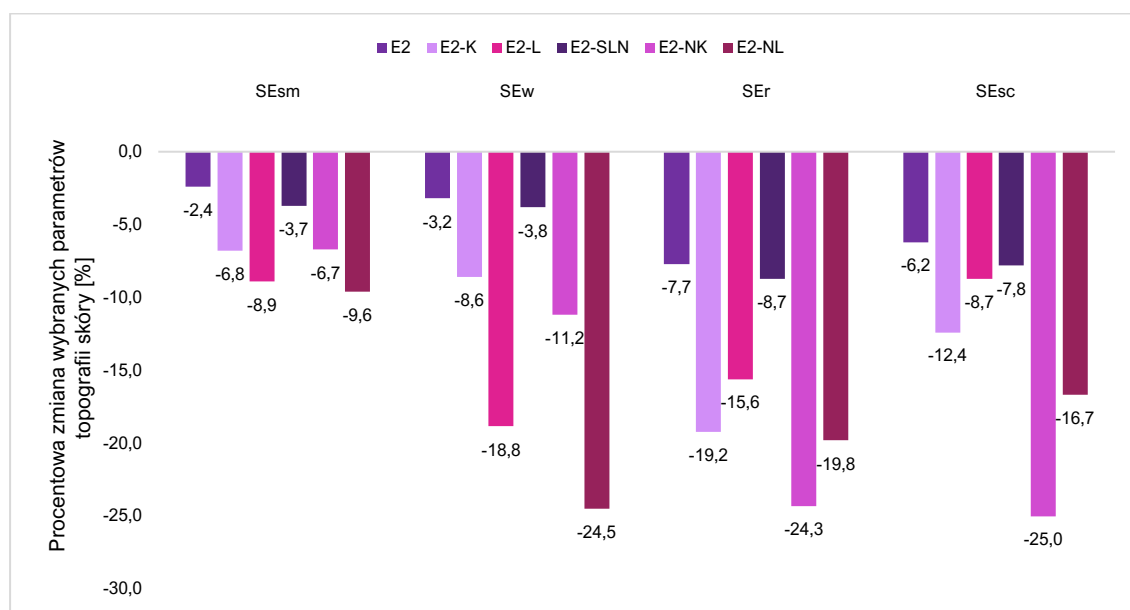
W przypadku oleożelu z laktonem dehydrokustusowym (O-L) spadek parametrów SEr o 8,5% i SEsc o 9,1% były umiarkowane, natomiast wyraźne obniżenie SEw o 6,4% wskazuje na silniejsze działanie przeciwzmarszczkowe tej substancji. Spadek SEsm o 10,2% potwierdza, że lakton dehydrokustusowy sprzyja poprawie topografii skóry, wpływając na jej wyrównanie powierzchni. Mechanizm ten może wynikać z właściwości tej grupy laktonów seskwiterpenowych, które modulują aktywność enzymów metaloproteinaz i pobudzają procesy regeneracyjne w skórze właściwej, o czym wspomniano wcześniej.

Wprowadzenie nanocząstek lipidowych bez substancji aktywnych (O-SLN) do oleożelu istotnie poprawiło jego właściwości powierzchniowe. Dla formułacji wartości SEr i SEsc obniżyły się odpowiednio o 10,2% i 12,3%, a SEw o 8,6%, przy równoczesnym spadku SEsm o 6,5%. Zmiany te można tłumaczyć zdolnością

nanocząstek lipidowych do tworzenia na powierzchni skóry cienkiej, półprzepuszczalnej warstwy lipidowej, która ogranicza utratę wody i zwiększa elastyczność naskórka.

Zastosowanie aktywnych substancji w postaci inkorporowanej do nanocząstek wzmocniło te efekty. W przypadku oleożelu z kostunolidem w nanonośnikach (O-NK) redukcja SEr i SEsc wyniosła odpowiednio 18,4% i 22,1%, co świadczy o znacznym ograniczeniu chropowatości i suchości skóry. Niewielki spadek SEw o 10,5% przy jednoczesnym spadku SEsm o 13,7% wskazuje, że kostunolid w formie SLN działa głównie poprzez poprawę funkcji barierowej i utrzymanie prawidłowego poziomu hydratacji naskórka. Podobny trend opisano w badaniach nad układami SLN zawierającymi tokoferol i koenzym Q10, które po 6–8 tygodniach aplikacji powodowały redukcję SEsc o 20–25%.

Najbardziej znaczące zmiany topografii skóry odnotowano dla oleożelu z laktonem dehydrokostusowym w nanocząstkach lipidowych (O-NL). Po ośmiu tygodniach stosowania wartość SEw uległa redukcji o 24,3%, co potwierdza silne działanie przeciwzmarszczkowe tej formułacji. Jednocześnie SEr i SEsc obniżyły się odpowiednio o 15,6% i 17,8%, a SEsm spadło aż o 17,9%. Tak wyraźny efekt może wynikać z synergicznego działania laktonu i nanostruktury lipidowej, która zwiększa jego penetrację przez warstwę rogową i wydłuża czas kontaktu z powierzchnią skóry, umożliwiając stopniowe uwalnianie substancji aktywnej.



Rys. 7.39. Zmiany parametrów topografii skóry wyznaczone dla przygotowanych emulsji w toku badań *in vivo* (dane wyrażone jako zmiana procentowa t0-t8).

Stosowanie emulsji bazowej (E2) wykazał umiarkowane, korzystne zmiany w topografii skóry. Zmniejszenie wartości parametrów SEr i SEsc świadczyło o delikatnym wygładzeniu powierzchni naskórka oraz poprawie jego kondycji, natomiast nieznaczny spadek SEw sugerował łagodną redukcję drobnych zmarszczek powierzchniowych. Parametr SEsm pozostał natomiast zbliżony do wartości wyjściowej, co wskazuje, że sama baza emulsyjna nie wywoływała znaczącej przebudowy struktury skóry, a obserwowany efekt był głównie wynikiem poprawy uwodnienia i elastyczności warstwy rogowej.

Dodatek substancji aktywnych w formie wolnej wpłynął na bardziej wyraźne zmiany. W przypadku emulsji zawierającej kostunolidu (O-K) odnotowano istotne obniżenie wartości S_{Er} i S_{Esc}, sięgające około 15–20%, co potwierdza korzystny wpływ tego związku na stan bariery hydrolipidowej i ograniczenie suchości skóry. Zmniejszenie S_{Ew} było umiarkowane, co sugeruje, że efekt wygładzenia powierzchni wynikał głównie z poprawy nawilżenia. Natomiast emulsja z laktonem dehydrokustusowym wykazała wyraźniejsze obniżenie wartości S_{Ew}, dochodzące do ok. 18%, przy jednoczesnej umiarkowanej redukcji S_{Er} i S_{Esc}. Oznacza to, że lakton działał przede wszystkim przeciwzmarszczkowo, wpływając na poprawę elastyczności i napięcia skóry, co jest zgodne z jego aktywnością biologiczną obserwowaną w innych badaniach.

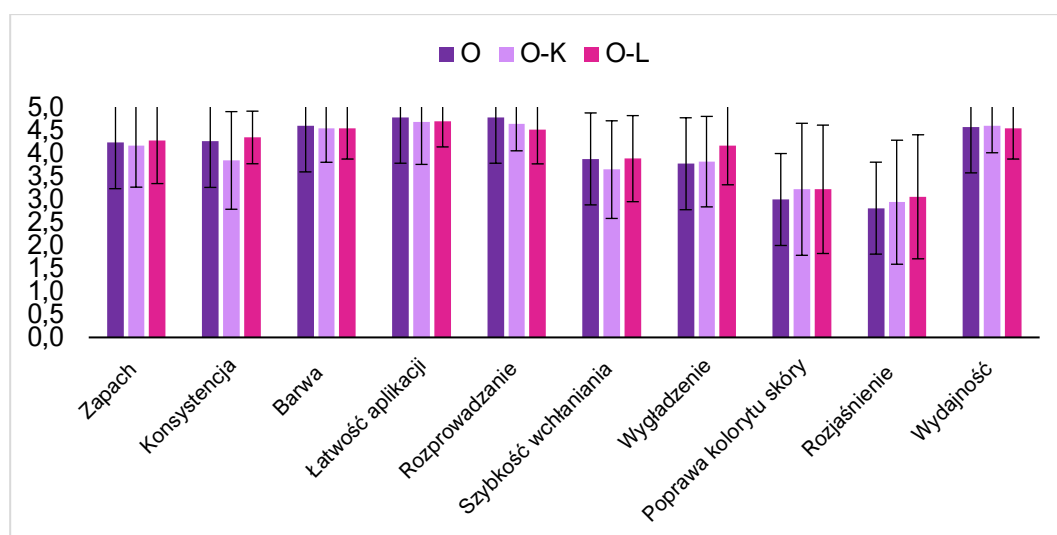
Zdecydowanie silniejsze efekty odnotowano po wprowadzeniu nanocząstek lipidowych bez substancji aktywnych do układów emulsyjnych. Emulsja bazowa (E2-SLN) z nośnikiem lipidowym wykazywała zauważalne obniżenie wartości S_{Er} i S_{Esc} (o około 15–20%), co można wiązać z tworzeniem cienkiej, okluzyjnej warstwy lipidowej na powierzchni naskórka, ograniczającej transepidermalną utratę wody i poprawiającej elastyczność skóry. Dla układu z kostunolidem w nanocząstkach (E2-NK) obniżenie parametrów S_{Er} i S_{Esc} było jeszcze wyraźniejsze, sięgając 25%, co świadczy o synergicznym działaniu aktywnej substancji i nośnika lipidowego w zakresie regeneracji bariery ochronnej. Obserwowano również umiarkowany spadek S_{Ew}, potwierdzający dodatkowy efekt wygładzający powierzchnię skóry.

Najbardziej znaczącą poprawę topografii uzyskano jednak w przypadku emulsji z laktonem dehydrokustusowym) enkapsulowanym w nanocząstkach lipidowych (E2-NL). Wartości S_{Ew} obniżyły się o około 24%, a S_{Er} i S_{Esc} o 16–20%, co wskazuje na istotną redukcję zmarszczek i wyrównanie powierzchni skóry. Jednocześnie spadek S_{Esm} o około 9% potwierdza, że struktura naskórka stała się bardziej jednorodna i gładza. Wyniki te potwierdzają, że zastosowanie laktonu dehydrokustusowego w formie nanonośnika znacząco potęguje jego działanie przeciwstarzeniowe, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi innych substancji aktywnych o podobnym mechanizmie działania [149].

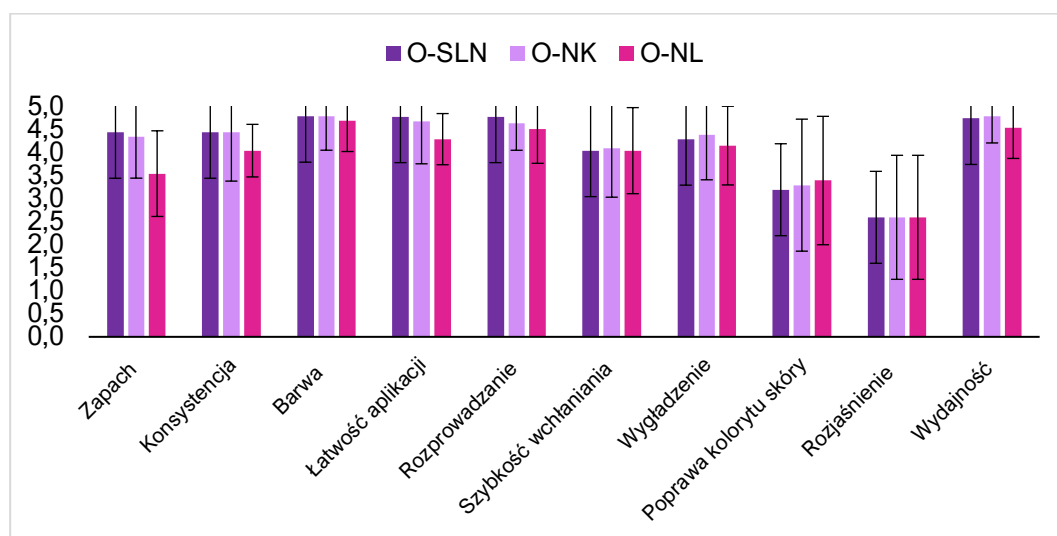
Podsumowując, uzyskane wyniki potwierdzają, że zastosowanie laktonów seskwiterpenowych, zwłaszcza w formie enkapsulowanej w nanocząstkach lipidowych, korzystnie wpływa na topografię skóry. Kostunolid wykazywał silniejsze działanie nawilżające i wygładzające (redukcja S_{Er} i S_{Esc}), natomiast lakton dehydrokustusowy działał efektywniej w zakresie redukcji zmarszczek (spadek S_{Ew} i S_{Esm}). W obu przypadkach użycie nośników lipidowych wzmocniło obserwowane efekty, co wskazuje na ich duży potencjał aplikacyjny w kosmologii przeciwstarzeniowej.

Analiza wyników subiektywnej oceny testowanych preparatów

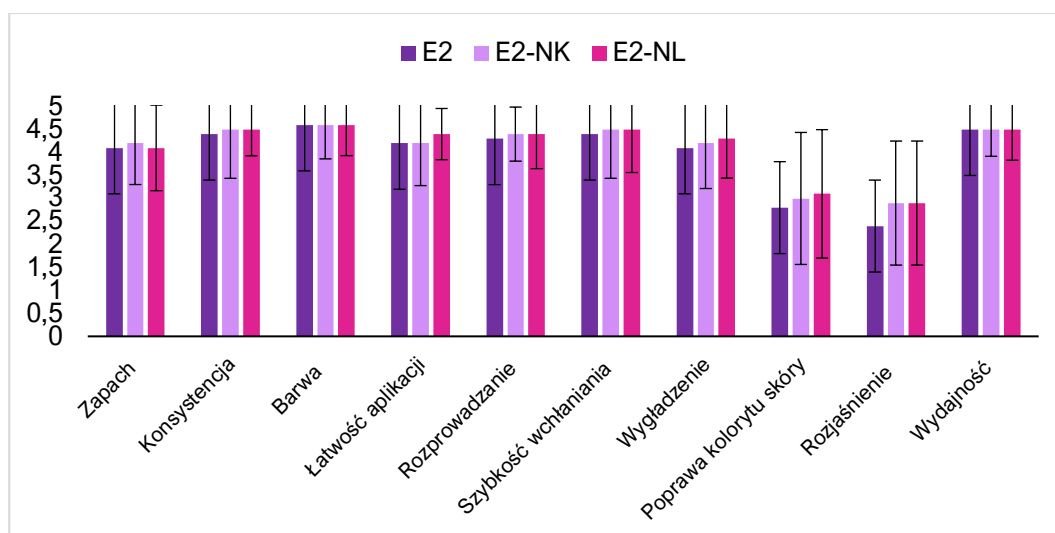
W celu uzupełnienia wyników badań instrumentalnych przeprowadzono subiektywną ocenę właściwości testowanych preparatów przez ochotników. Analiza ankiet pozwoliła na określenie poziomu akceptacji sensorycznej poszczególnych formułacji oraz ich wpływu na odczuwany komfort stosowania, co stanowi istotne uzupełnienie oceny skuteczności i jakości kosmetycznej badanych układów. Wyniki przedstawiono jako wartości subiektywnego odczucia w skali (0-5) po 8 tygodniach stosowania oleożeli zawierających kostunolid i lakton dehydrokustusowy w formie klasycznej (rys. 7.40), oleożeli zawierających kostunolid i lakton dehydrokustusowy w formie z zliofilizowanymi nanocząstkami lipidowymi (rys. 7.41), emulsji zawierających kostunolid i lakton dehydrokustusowy w formie klasycznej (rys. 7.42), emulsji zawierających kostunolid i lakton dehydrokustusowy w formie z zliofilizowanymi nanocząstkami lipidowymi (rys. 7.43).



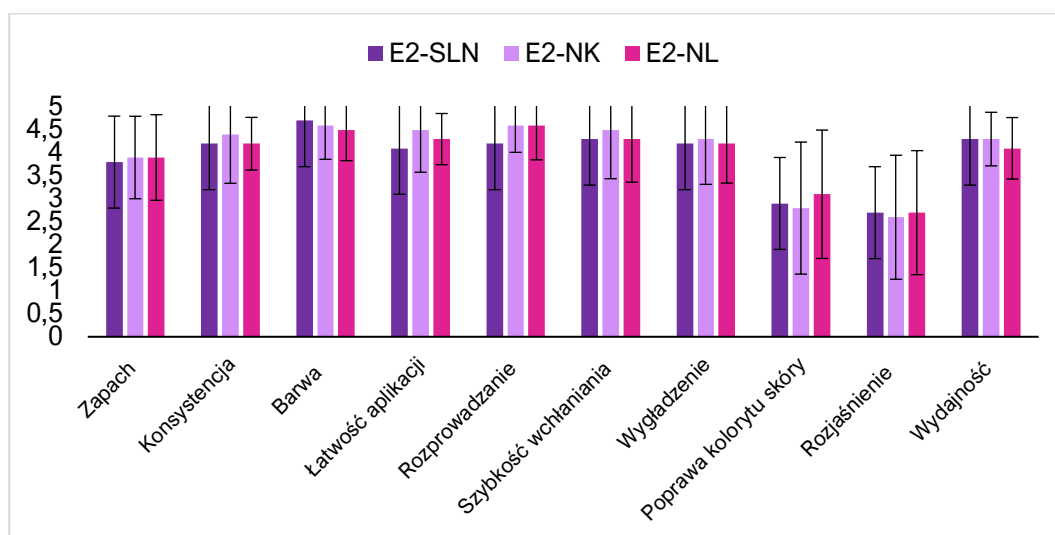
Rys. 7.40. Wyniki subiektywnej oceny testowanych oleożeli, zawierających substancje aktywne w formie klasycznej (dane wyrażone jako średnia uzyskanych wyników $\pm$ odchylenie standardowe).



Rys. 7.41. Wyniki subiektywnej oceny testowanych oleożeli z liofilizowanymi nanocząstkami lipidowymi (dane wyrażone jako średnia uzyskanych wyników $\pm$ odchylenie standardowe).



Rys. 7.42. Wyniki subiektywnej oceny testowanych emulsji 2, zawierających substancje aktywne w formie klasycznej (dane wyrażone jako średnia uzyskanych wyników $\pm$ odchylenie standardowe).



Rys. 7.43. Wyniki subiektywnej oceny testowanych emulsji 2 z wodną dyspersją nanocząstek lipidowych (dane wyrażone jako średnia uzyskanych wyników $\pm$ odchylenie standardowe).

Analiza ankiet przeprowadzonych wśród uczestników badań aplikacyjnych wykazała, że wszystkie opracowane formułacje, zarówno emulsje, jak i oleożele, charakteryzowały się bardzo dobrą akceptacją sensoryczną (rys. 7.40, 7.41, 7.42 i 7.43). Ochotnicy oceniali preparaty jako łatwe w aplikacji, o przyjemnej konsystencji i odpowiednim czasie wchłaniania, co potwierdza właściwe zrównoważenie ich faz oraz stabilność fizykochemiczną.

Zarówno formułacje klasyczne, jak i te zawierające substancje aktywne – kostunolid oraz lakton dehydrokustusowy – były dobrze tolerowane i nie powodowały niepożądanych reakcji skórnych. Preparaty z kostunolidem częściej określano jako bardziej nawilżające i wygładzające, natomiast formułacje z laktonem dehydrokustusowym kojarzono z efektem rozświetlenia i poprawą koloru skóry, co jest zgodne z wynikami pomiarów instrumentalnych (nawilżenia, TEWL i kolorymetrii).

Wprowadzenie nanocząstek lipidowych (SLN) wpłynęło korzystnie na odbiór sensoryczny preparatów – uczestnicy badania podkreślali ich większą jednorodność, aksamitność i komfort aplikacji, co potwierdza wysoką stabilność i biogodność tych układów. Otrzymane wyniki wskazują, że zastosowanie SLN nie tylko zwiększa efektywność działania substancji aktywnych, ale również poprawia właściwości użytkowe, co może stanowić istotny atut w projektowaniu nowoczesnych dermokosmetyków o wysokiej skuteczności i akceptowalności.

Uzyskane wyniki potwierdzają wysoką skuteczność zastosowania nanostrukturalnych nośników lipidowych w kosmetykach przeciwstarzeniowych. Formułacje z laktonami seskwiterpenowymi wykazują działanie wielokierunkowe: poprawiają nawilżenie, redukują zmarszczki, a jednocześnie zwiększają komfort aplikacji. Wyniki te wpisują się w aktualne trendy kosmetologii ukierunkowanej na tzw. „zieloną nanotechnologię”, łączącą naturalne związki bioaktywne z zaawansowanymi systemami dostarczania substancji czynnych.

Zastosowanie laktonów seskwiterpenowych (kostunolidu i laktonu dehydrokostusowego) w formułacjach kosmetycznych wpływa korzystnie na parametry biometryczne skóry – w szczególności zwiększa jej nawilżenie i gładkość. Inkorporacja tych związków do nanocząstek lipidowych (SLN) znacząco potęguje ich skuteczność, zapewniając stabilność, kontrolowane uwalnianie i lepszą biodostępność w naskórku. Preparaty z SLN wykazują wyraźne działanie przeciwzmarszczkowe już po ośmiotygodniowej aplikacji. Oleożele i emulsje z laktonami seskwiterpenowymi cechują się bardzo dobrą tolerancją dermatologiczną i wysoką akceptacją sensoryczną, co czyni je obiecującymi kandydatami do wdrożeń kosmetycznych typu anti-aging. Uzyskane wyniki potwierdzają zasadność dalszych badań nad wykorzystaniem naturalnych laktonów seskwiterpenowych jako bioaktywnych składników w nanostrukturalnych systemach nośnikowych, w tym nad optymalizacją ich stężeń, stabilności oraz kinetyki przenikania przez skórę.

8. Podsumowanie i wnioski

Praca doktorska koncentruje się na opracowaniu, charakterystyce i ocenie właściwości nanocząstek lipidowych zawierających biologicznie czynne laktony seskwiterpenowe — kostunolid i lakton dehydrokostusowy — oraz na zastosowaniu ich w formulacjach kosmetycznych. Projekt badawczy obejmował wszystkie etapy opracowania nośników: od syntezy i optymalizacji ich składu, przez badania stabilności, enkapsulacji i uwalniania, aż po ocenę właściwości biologicznych i efektywności preparatów kosmetycznych *in vivo*:

1. Etap przygotowania nanocząstek lipidowych

Ostatecznie opracowano sześć wariantów dyspersji lipidowych różniących się zarówno metodą syntezy, jak i obecnością substancji aktywnej.

2. Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek

Opracowane nośniki zostały kompleksowo scharakteryzowane z wykorzystaniem metod instrumentalnych:

- DLS/ELS – określenie średniej wielkości cząstek, polidispersyjności i potencjału zeta, pozwalających na ocenę stabilności układów w czasie (1, 7 i 30 dni),
- TEM – analiza morfologii i kształtu nanocząstek, potwierdzająca ich kulistą, gładką strukturę i równomierne rozproszenie,
- DSC – identyfikacja przemian fazowych i polimorficznych matrycy lipidowej,
- XRD – analiza stopnia krystaliczności i struktury wewnętrznej lipidów,
- HPLC – ocena efektywności enkapsulacji laktonów seskwiterpenowych.

Zastosowanie metod termicznych i rentgenowskich wykazało, że proces nanoskalowania prowadzi do powstania bardziej amorficznej struktury lipidowej, co sprzyja lepszemu wiązaniu substancji czynnych. Wyniki HPLC potwierdziły wysoką efektywność enkapsulacji (>90%), co wskazuje na skuteczność obu metod, szczególnie w przypadku emulsji wielokrotnych (W/O/W).

3. Preparatyka formulacji kosmetycznych

Kolejnym etapem była inkorporacja otrzymanych nanocząstek lipidowych do formulacji kosmetycznych. Opracowano cztery rodzaje podłoży:

- emulsje typu O/W (otrzymywane metodą „na zimno” i „na gorąco”),
- oleożel,
- hydrożel.

Każdy typ formulacji przygotowano w wersji:

- bez substancji aktywnej,
- z dodatkiem wolnych laktonów seskwiterpenowych,
- z laktonami w postaci inkorporowanej w nanocząstkach lipidowych.

Zachowano odpowiedni dobór emulgatorów, zagęstników i konserwantów, a skład podłoży zoptymalizowano tak, by zapewnić stabilność fizyczną oraz zgodność chemiczną z substancjami aktywnymi.

4. Charakterystyka i stabilność formułacji kosmetycznych

Badania obejmowały ocenę:

pH, lepkości i rozkładu wielkości cząstek stabilności w teście wirówkowym oraz stabilności chemicznej laktonów w czasie z wykorzystaniem techniki HPLC.

Formulacje utrzymano w temperaturach 4°C, 25°C i 40°C przez 90 dni. Wyniki wykazały wysoką stabilność układów, szczególnie tych zawierających nanocząstki lipidowe. Obecność SLN ograniczała procesy rozwarstwienia i krystalizacji oraz zapobiegała degradacji aktywnych laktonów, co potwierdzono chromatograficznie.

5. Badania uwalniania substancji aktywnych

Zastosowano metodę *in vitro* z użyciem aparatu łopatkowego (i błon celulozowych, w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Analiza HPLC próbek płynu akceptorowego wykazała, że nanocząstki lipidowe znacząco modyfikują profil uwalniania — substancje aktywne są uwalniane w sposób kontrolowany, z wyraźnie wydłużonym czasem półuwalniania w porównaniu do laktonów w wolnej postaci.

6. Ocena aktywności antyoksydacyjnej

Aktywność przeciwutleniającą badanych laktonów oceniono dwoma metodami: DPPH, ABTS. Uzyskane wyniki wskazały, że oba laktony wykazują umiarkowaną, ale znaczącą aktywność antyoksydacyjną, z przewagą kostunolidu. Włączenie ich do nanostruktur lipidowych zwiększyło stabilność i efektywność działania w układach kosmetycznych. Zaplanowane było użycie metody Folina–Ciocâlteu oraz FRAP, ale zastosowane testy nie okazały się właściwe do badania tego typu substancji.

7. Badania aplikacyjno-aparaturowe *in vivo*

W ramach końcowego etapu przeprowadzono czterotygodniowe badania aplikacyjne na grupie 80 ochotniczek, zgodnie z zasadami bioetyki (Uchwała Komisji Bioetycznej 2018). Oceniano m.in.:

- nawilżenie (Corneometer® CM 825),
- przeznaskórkową utratę wody – TEWL (Tewameter® TM 300),
- zawartość melaniny i zaczerwienienia (Mexameter® MX 18),
- koloryt skóry (Colorimeter® CL 400),
- topografię i makrorzeźbę skóry (Visioscan®, Visioline®).

Po 8 tygodniach stosowania odnotowano istotną poprawę nawilżenia, elastyczności i kolorytu skóry oraz spadek wartości TEWL, szczególnie w przypadku preparatów zawierających laktony w nanocząstkach lipidowych. Subiektywna ocena użytkowników potwierdziła wysoką akceptowalność sensoryczną i skuteczność produktów.

Wnioski końcowe

1. Opracowano skuteczną metodykę otrzymywania nanocząstek lipidowych z użyciem lipidów i surfaktantów, zapewniającą powtarzalność procesu, wysoką stabilność dyspersji oraz parametry cząstek sprzyjające aplikacji dermatologicznej.
2. Laktony seskwiterpenowe (kostunolid i lakton dehydrokostusowy) mogą być z powodzeniem inkorporowane do matrycy lipidowej, tworząc stabilne układy o właściwościach amorficznych, co umożliwia ich kontrolowane uwalnianie oraz ochronę przed degradacją.
3. Proces enkapsulacji w SLN znacząco zwiększa stabilność fizykochemiczną i trwałość laktonów, zwłaszcza podczas przechowywania w temperaturze 4°C i pokojowej. Zjawisko to nie zachodzi jednak w warunkach stresu termicznego (40°C), co wskazuje na konieczność dalszej optymalizacji profilu lipidowego i wprowadzenia dodatkowych antyoksydantów.
4. Mechanizm uwalniania związków aktywnych z nanocząstek lipidowych ma charakter kontrolowany i różni się istotnie od szybkiego uwalniania obserwowanego w emulsjach klasycznych. Umożliwia to uzyskanie długotrwałego efektu działania preparatu kosmetycznego i ograniczenie strat substancji aktywnej.
5. Zarówno kostunolid, jak i lakton dehydrokostusowy wykazują wysoką aktywność biologiczną, potwierdzoną w testach *in vitro* i *in vivo*. Preparaty zawierające te związki poprawiają nawilżenie skóry, obniżają TEWL oraz wpływają na wzrost jej elastyczności i wygładzenie powierzchni, co świadczy o ich potencjale przeciwstarzeniowym.
6. Nanostrukturalne formułacje kosmetyczne z laktonami seskwiterpenowymi są bezpieczne dermatologicznie, nie powodują podrażnień ani reakcji alergicznych, a ich właściwości sensoryczne uznano za bardzo dobre. Uzyskane efekty potwierdzają możliwość ich praktycznego wykorzystania w przemyśle kosmetycznym.
7. Zastosowanie nanotechnologii w kosmetologii otwiera nowe możliwości wykorzystania naturalnych substancji bioaktywnych, dotychczas ograniczanych przez słabą rozpuszczalność i niestabilność. Opracowane formułacje stanowią przykład efektywnego połączenia nowoczesnych technologii z zasadami zrównoważonego rozwoju i ekologicznego projektowania produktów.
8. Uzyskane wyniki mają charakter aplikacyjny i wdrożeniowy – opracowane formułacje mogą stanowić podstawę do tworzenia innowacyjnych kosmetyków anti-aging o przedłużonym działaniu, opartych na naturalnych składnikach aktywnych i bezpiecznych dla środowiska systemach nośnikowych.
9. Wyniki badań wskazują na potrzebę dalszej optymalizacji składu lipidowej matrycy, proporcji surfaktantów oraz warunków enkapsulacji, jak również rozszerzenia badań o inne grupy naturalnych substancji biologicznie czynnych. W dalszej perspektywie celowe jest także przeprowadzenie badań kinetyki przenikania przezskórnego oraz modelowania mechanizmów dyfuzji.

9. Literatura

- [1] J. Dias-Ferreira *et al.*, „Skin rejuvenation: Biopolymers applied to UV sunscreens and sheet masks”, *Biopolymer Membranes and Films*, Elsevier, 2020, s. 309–330. doi: 10.1016/B978-0-12-818134-8.00013-4.
- [2] M. Malinowska, E. Sikora, i J. Ogonowski, „Transport przez naskórkowy aktywnych składników kosmetycznych”, *Wiad. Chem.*, nr 67, s. 3–4, 2013.
- [3] M. Martini, *Kosmetologia i farmakologia skóry*. Warszawa: Wyd. Lek. PZWL, 2007.
- [4] A. Baroni, E. Buommino, V. De Gregorio, E. Ruocco, V. Ruocco, i R. Wolf, „Structure and function of the epidermis related to barrier properties”, *Clinics in Dermatology*, t. 30, nr 3, s. 257–262, maj 2012, doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007.
- [5] N. Schafer, R. Balwierz, P. Biernat, W. Ochędzan-Siodłak, i J. Lipok, „Natural Ingredients of Transdermal Drug Delivery Systems as Permeation Enhancers of Active Substances through the Stratum Corneum”, *Mol. Pharmaceutics*, t. 20, nr 7, s. 3278–3297, lip. 2023, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00126.
- [6] I. Hatta, „Stratum Corneum Structure and Function Studied by X-ray Diffraction”, *Dermato*, t. 2, nr 3, s. 79–108, sie. 2022, doi: 10.3390/dermato2030009.
- [7] C. Ogawa-Fuse *et al.*, „Impact of water exposure on skin barrier permeability and ultrastructure”, *Contact Dermatitis*, t. 80, nr 4, s. 228–233, kwi. 2019, doi: 10.1111/cod.13174.
- [8] Y. Yamamoto, R. Yamauchi, S. Ohno, K. Asai, T. Fukami, i T. Koide, „Evaluation of the Water Content and Skin Permeability of Active Pharmaceutical Ingredients in Ketoprofen Poultice Formulations Removed from Their Airtight Containers and Left at Room Temperature”, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, t. 42, nr 12, s. 2102–2108, grudz. 2019, doi: 10.1248/bpb.b19-00758.
- [9] I. Hatta, H. Nakazawa, N. Ohta, T. Uchino, i K. Yanase, „Stratum Corneum Function: A Structural Study with Dynamic Synchrotron X-ray Diffraction Experiments”, *J. Oleo Sci.*, t. 70, nr 9, s. 1181–1199, 2021, doi: 10.5650/jos.ess21159.
- [10] Y. Jokura, S. Ishikawa, H. Tokuda, i G. Imokawa, „Molecular Analysis of Elastic Properties of the Stratum Corneum by Solid-State ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy”, *Journal of Investigative Dermatology*, t. 104, nr 5, s. 806–812, maj 1995, doi: 10.1111/1523-1747.ep12607005.
- [11] S. Knox i N. M. O’Boyle, „Skin lipids in health and disease: A review”, *Chemistry and Physics of Lipids*, t. 236, s. 105055, maj 2021, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2021.105055.
- [12] Y. Masukawa *et al.*, „Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum”, *Journal of Lipid Research*, t. 50, nr 8, s. 1708–1719, sie. 2009, doi: 10.1194/jlr.D800055-JLR200.
- [13] P. W. Wertz, „Roles of Lipids in the Permeability Barriers of Skin and Oral Mucosa”, *IJMS*, t. 22, nr 10, s. 5229, maj 2021, doi: 10.3390/ijms22105229.
- [14] D. Kessner, A. Ruettinger, M. A. Kiselev, S. Wartewig, i R. H. H. Neubert, „Properties of Ceramides and Their Impact on the Stratum Corneum Structure”, *Skin Pharmacol Physiol*, t. 21, nr 2, s. 58–74, 2008, doi: 10.1159/000112956.
- [15] Y. B. Schuetz, A. Naik, R. H. Guy, i Y. N. Kalia, „Emerging strategies for the transdermal delivery of peptide and protein drugs”, *Expert Opinion on Drug Delivery*, t. 2, nr 3, s. 533–548, maj 2005, doi: 10.1517/17425247.2.3.533.
- [16] S. Mitragotri, „Devices for overcoming biological barriers: The use of physical forces to disrupt the barriers”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, t. 65, nr 1, s. 100–103, sty. 2013, doi: 10.1016/j.addr.2012.07.016.
- [17] A. Zielińska, I. Nowak, i A. M. Grumezescu, *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*. William Andrew Publishing, 2016.
- [18] G. Birrenbach i P. P. Speiser, „Polymerized Micelles and Their Use as Adjuvants in Immunology”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, t. 65, nr 12, s. 1763–1766, grudz. 1976, doi: 10.1002/jps.2600651217.
- [19] S. Bansal, C. P. Kashyap, G. Aggarwal, i S. L. Harikumar, „A comparative review on vesicular drug delivery system and stability issues.”, *Int. J. Res. Pharm. Chem.*, nr 2, s. 704–713, 2012.

- [20] S. Das, W. K. Ng, i R. B. H. Tan, „Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?“, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, t. 47, nr 1, s. 139–151, sie. 2012, doi: 10.1016/j.ejps.2012.05.010.
- [21] R. H. Müller, R. Ruick, i C. M. Keck, „SmartLipids® — the next generation of lipid nanoparticles by optimized design of particle matrix“, zaprezentowano na Proceedings of the Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society, Frankfurt, 26.09 2014.
- [22] O. Pelikh, S. F. Hartmann, A. M. Abraham, i C. M. Keck, „Nanocrystals for Dermal Application“, w *Nanocosmetics*, J. Cornier, C. M. Keck, i M. Van De Voorde, Red., Cham: Springer International Publishing, 2019, s. 161–177. doi: 10.1007/978-3-030-16573-4_8.
- [23] J. Pardeike, A. Hommoss, i R. H. Müller, „Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products“, *International Journal of Pharmaceutics*, t. 366, nr 1–2, s. 170–184, sty. 2009, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.10.003.
- [24] E. B. Souto i R. H. Müller, „Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN®, NLC®)“, *Intern J of Cosmetic Sci*, t. 30, nr 3, s. 157–165, cze. 2008, doi: 10.1111/j.1468-2494.2008.00433.x.
- [25] J. F. Figueiro, F. Veiga, A. M. Silva, i E. B. Souto, „Ocular Drug Delivery - New Strategies for Targeting Anterior and Posterior Segments of the Eye“, *CPD*, t. 22, nr 9, s. 1135–1146, mar. 2016, doi: 10.2174/1381612822666151216145900.
- [26] C. Carbone *et al.*, „Dual-drugs delivery in solid lipid nanoparticles for the treatment of *Candida albicans* mycosis“, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, t. 186, s. 110705, luty 2020, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110705.
- [27] H. Wosicka i J. Lulek, „Nanoparticles as a drug delivery system in cosmetology“, *J. Pol. J. Cosmetol.*, nr 12, s. 23–27, 2009.
- [28] F. Olechowski, R. H. Müller, i S. M. Pyo, „BergaCare SmartLipids: commercial lipophilic active concentrates for improved performance of dermal products“, *Beilstein J. Nanotechnol.*, t. 10, s. 2152–2162, lis. 2019, doi: 10.3762/bjnano.10.208.
- [29] Y. Ding, S. M. Pyo, i R. H. Müller, „smartLipids® as third solid lipid nanoparticle generation – stabilization of retinol for dermal application“, *Pharmazie*, nr 12, s. 728–735, grudz. 2017, doi: 10.1691/ph.2017.7016.
- [30] U. Wolfmeier *et al.*, „Waxes“, w *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 1. wyd., Wiley-VCH, Red., Wiley, 2000. doi: 10.1002/14356007.a28_103.
- [31] R. Ruick, „SmartLipids – die neue Generation der Lipidnanopartikel nach SLN und NLC“, Praca doktorska, Freie Universität Berlin, Berlin, 2016.
- [32] F. Olechowski, R. H. Müller, i S. M. Pyo, „BergaCare SmartLipids: commercial lipophilic active concentrates for improved performance of dermal products“, *Beilstein J. Nanotechnol.*, t. 10, s. 2152–2162, lis. 2019, doi: 10.3762/bjnano.10.208.
- [33] W. Mehnert, „Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications“, *Advanced Drug Delivery Reviews*, t. 47, nr 2–3, s. 165–196, kwi. 2001, doi: 10.1016/S0169-409X(01)00105-3.
- [34] T. Virén, J. T. Iivarinen, J. K. Sarin, I. Harvima, i H. N. Mayrovitz, „Accuracy and reliability of a hand-held *in vivo* skin indentation device to assess skin elasticity“, *Intern J of Cosmetic Sci*, t. 40, nr 2, s. 134–140, kwi. 2018, doi: 10.1111/ics.12444.
- [35] E. B. Souto, A. J. Almeida, i R. H. Müller, „Lipid Nanoparticles (SLN®, NLC®) for Cutaneous Drug Delivery: Structure, Protection and Skin Effects“, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, t. 3, nr 4, s. 317–331, grudz. 2007, doi: 10.1166/jbn.2007.049.
- [36] F. Brugè, E. Damiani, F. Marcheggiani, A. Offerta, C. Puglia, i L. Tiano, „A comparative study on the possible cytotoxic effects of different nanostructured lipid carrier (NLC) compositions in human dermal fibroblasts“, *International Journal of Pharmaceutics*, t. 495, nr 2, s. 879–885, lis. 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.09.033.
- [37] S. A. Wissing i R. H. Müller, „The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – *in vivo* study“, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, t. 56, nr 1, s. 67–72, lip. 2003, doi: 10.1016/S0939-6411(03)00040-7.
- [38] H. Kim *et al.*, „Seeking better topical delivery technologies of moisturizing agents for enhanced skin moisturization“, *Expert Opinion on Drug Delivery*, t. 15, nr 1, s. 17–31, sty. 2018, doi: 10.1080/17425247.2017.1306054.

- [39] C.-L. Fang, S. A. Al-Suwayeh, i J.-Y. Fang, „Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting”, *Recent Pat Nanotechnol*, t. 7, nr 1, s. 41–55, sty. 2013.
- [40] R. Muller, R. Petersen, A. Hommoss, i J. Pardeike, „Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, t. 59, nr 6, s. 522–530, lip. 2007, doi: 10.1016/j.addr.2007.04.012.
- [41] V. Jennings, M. Schäfer-Korting, i S. Gohla, „Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties”, *Journal of Controlled Release*, t. 66, nr 2–3, s. 115–126, maj 2000, doi: 10.1016/S0168-3659(99)00223-0.
- [42] R. Muller, R. Petersen, A. Hommoss, i J. Pardeike, „Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, t. 59, nr 6, s. 522–530, lip. 2007, doi: 10.1016/j.addr.2007.04.012.
- [43] C. Puglia i F. Bonina, „Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals”, *Expert Opinion on Drug Delivery*, t. 9, nr 4, s. 429–441, kwi. 2012, doi: 10.1517/17425247.2012.666967.
- [44] V. Jennings, M. Schäfer-Korting, i S. Gohla, „Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties”, *Journal of Controlled Release*, t. 66, nr 2–3, s. 115–126, maj 2000, doi: 10.1016/S0168-3659(99)00223-0.
- [45] R. H. Muller i C. M. Keck, „Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles”, *Journal of Biotechnology*, t. 113, nr 1–3, s. 151–170, wrz. 2004, doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.06.007.
- [46] A. Astani i P. Schnitzler, „Antiviral activity of monoterpenes beta-pinene and limonene against herpes simplex virus in vitro”, *Iran J Microbiol*, t. 6, nr 3, s. 149–155, cze. 2014.
- [47] F. Knorr, J. Lademann, A. Patzelt, W. Sterry, U. Blume-Peytavi, i A. Vogt, „Follicular transport route – Research progress and future perspectives”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, t. 71, nr 2, s. 173–180, luty 2009, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.11.001.
- [48] C.-L. Fang, S. A. Al-Suwayeh, i J.-Y. Fang, „Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Drug Delivery and Targeting”, *NANOTEC*, t. 7, nr 1, s. 41–55, lis. 2012, doi: 10.2174/1872210511307010041.
- [49] F. Bruguè, E. Damiani, F. Marcheggiani, A. Offerta, C. Puglia, i L. Tiano, „A comparative study on the possible cytotoxic effects of different nanostructured lipid carrier (NLC) compositions in human dermal fibroblasts”, *International Journal of Pharmaceutics*, t. 495, nr 2, s. 879–885, lis. 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.09.033.
- [50] Y. Duan *et al.*, „A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems”, *RSC Adv*, t. 10, nr 45, s. 26777–26791, lip. 2020, doi: 10.1039/d0ra03491f.
- [51] B. Kupikowska-Stobba, J. Domagała, i M. M. Kasprzak, „Critical Review of Techniques for Food Emulsion Characterization”, *Applied Sciences*, t. 14, nr 3, s. 1069, sty. 2024, doi: 10.3390/app14031069.
- [52] S. Bhattacharjee, „DLS and zeta potential – What they are and what they are not?”, *Journal of Controlled Release*, t. 235, s. 337–351, sie. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [53] J. Stetefeld, S. A. McKenna, i T. R. Patel, „Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences”, *Biophys Rev*, t. 8, nr 4, s. 409–427, grudz. 2016, doi: 10.1007/s12551-016-0218-6.
- [54] C. Chen, C. Chen, Y. Li, R. Gu, i X. Yan, „Characterization of lipid-based nanomedicines at the single-particle level”, *Fundam Res*, t. 3, nr 4, s. 488–504, lip. 2023, doi: 10.1016/j.fmre.2022.09.011.
- [55] H. Bunjes, F. Steiniger, i W. Richter, „Visualizing the Structure of Triglyceride Nanoparticles in Different Crystal Modifications”, *Langmuir*, t. 23, nr 7, s. 4005–4011, mar. 2007, doi: 10.1021/la062904p.
- [56] J. Weiss, E. A. Decker, D. J. McClements, K. Kristbergsson, T. Helgason, i T. Awad, „Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bioactive Food Components”, *Food Biophysics*, t. 3, nr 2, s. 146–154, cze. 2008, doi: 10.1007/s11483-008-9065-8.
- [57] S. Anantachaisilp, S. M. Smith, A. Treetong, S. Pratontep, S. Puttipipatkachorn, i U. R. Ruktanonchai, „Chemical and structural investigation of lipid nanoparticles: drug–lipid interaction and molecular distribution”, *Nanotechnology*, t. 21, nr 12, s. 125102, mar. 2010, doi: 10.1088/0957-4484/21/12/125102.

- [58] A. Pareek *et al.*, „Advancing lipid nanoparticles: A pioneering technology in cosmetic and dermatological treatments”, *Colloid and Interface Science Communications*, t. 64, s. 100814, sty. 2025, doi: 10.1016/j.colcom.2024.100814.
- [59] A. P. Raphael, G. Garrastazu, F. Sonvico, i T. W. Prow, „Formulation Design for Topical Drug and Nanoparticle Treatment of Skin Disease”, *Ther. Deliv.*, t. 6, nr 2, s. 197–216, luty 2015, doi: 10.4155/tde.14.106.
- [60] S. Liu, T. Deng, H. Cheng, J. Lu, i J. Wu, „Advances in Transdermal Drug Delivery Systems and Clinical Applications in Inflammatory Skin Diseases”, *Pharmaceutics*, t. 17, nr 6, s. 746, cze. 2025, doi: 10.3390/pharmaceutics17060746.
- [61] E. O. Bakhrushina *et al.*, „Transdermal Drug Delivery Systems: Methods for Enhancing Skin Permeability and Their Evaluation”, *Pharmaceutics*, t. 17, nr 7, s. 936, lip. 2025, doi: 10.3390/pharmaceutics17070936.
- [62] S. Zhang, Y.-K. Won, C.-N. Ong, i H.-M. Shen, „Anti-Cancer Potential of Sesquiterpene Lactones: Bioactivity and Molecular Mechanisms”, *CMCACA*, t. 5, nr 3, s. 239–249, maj 2005, doi: 10.2174/1568011053765976.
- [63] A. Robinson *et al.*, „A new sesquiterpene lactone from the roots of *Saussurea lappa*: Structure–anticancer activity study”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, t. 18, nr 14, s. 4015–4017, lip. 2008, doi: 10.1016/j.bmcl.2008.06.008.
- [64] H.-J. Park, W.-T. Jung, P. Basnet, S. Kadota, i T. Namba, „Syringin 4- O - β -Glucoside, a New Phenylpropanoid Glycoside, and Costunolide, a Nitric Oxide Synthase Inhibitor, from the Stem Bark of *Magnolia sieboldii*”, *J. Nat. Prod.*, t. 59, nr 12, s. 1128–1130, sty. 1996, doi: 10.1021/np960452i.
- [65] D. E. Wedge, J. C. G. Galindo, i F. A. Macías, „Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs”, *Phytochemistry*, t. 53, nr 7, s. 747–757, kwi. 2000, doi: 10.1016/S0031-9422(00)00008-X.
- [66] J. Luna-Herrera, M. C. Costa, H. G. González, A. I. Rodrigues, i P. C. Castilho, „Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp.”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, t. 59, nr 3, s. 548–552, mar. 2007, doi: 10.1093/jac/dkl523.
- [67] H.-C. Chen, C.-K. Chou, S.-D. Lee, J.-C. Wang, i S.-F. Yeh, „Active compounds from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells”, *Antiviral Research*, t. 27, nr 1–2, s. 99–109, maj 1995, doi: 10.1016/0166-3542(94)00083-K.
- [68] J. Triana *et al.*, „Sesquiterpenoid Derivatives from *Gonospermum e legans* and Their Cytotoxic Activity for HL-60 Human Promyelocytic Cells”, *J. Nat. Prod.*, t. 66, nr 7, s. 943–948, lip. 2003, doi: 10.1021/np020390y.
- [69] J. Y. Choi *et al.*, „Melanogenesis inhibitory compounds from *Saussureae Radix*”, *Arch. Pharm. Res.*, t. 31, nr 3, s. 294–299, mar. 2008, doi: 10.1007/s12272-001-1154-0.
- [70] F. Hu, S. Feng, Y. Wu, Y. Bi, C. Wang, i W. Li, „Quantitative analysis of costunolide and dehydrocostuslactone in rat plasma by ultraperformance liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry”, *Biomedical Chromatography*, t. 25, nr 5, s. 547–554, maj 2011, doi: 10.1002/bmc.1482.
- [71] Z. Chen *et al.*, „Dehydrocostus Lactone Attenuates the Senescence of Nucleus Pulposus Cells and Ameliorates Intervertebral Disc Degeneration via Inhibition of STING-TBK1/NF- κ B and MAPK Signaling”, *Front. Pharmacol.*, t. 12, s. 641098, kwi. 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.641098.
- [72] S. Peng, Y. Hou, J. Yao, i J. Fang, „Activation of Nrf2 by costunolide provides neuroprotective effect in PC12 cells”, *Food Funct.*, t. 10, nr 7, s. 4143–4152, 2019, doi: 10.1039/C8FO02249F.
- [73] Y. Yuan *et al.*, „Dehydrocostus Lactone Suppresses Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis by Targeting the IKK α / β -NF- κ B and Keap1-Nrf2 Signalling Pathways”, *Front. Pharmacol.*, t. 13, s. 817596, mar. 2022, doi: 10.3389/fphar.2022.817596.
- [74] J. Zhang *et al.*, „Dehydrocostus lactone inhibits *Candida albicans* growth and biofilm formation”, *AMB Express*, t. 13, nr 1, s. 82, sie. 2023, doi: 10.1186/s13568-023-01587-y.
- [75] G. S. Ahmed i U. S. Ş. Coskun, „Investigation of antibacterial and antifungal activity of *Saussurea costus* root extracts”, *An. Acad. Bras. Ciênc.*, t. 95, nr suppl 1, s. e20230059, 2023, doi: 10.1590/0001-3765202320230059.
- [76] D. O. Shah, Red., *Macro- and Microemulsions: Theory and Applications*, t. 272. w ACS Symposium Series, vol. 272. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1985. doi: 10.1021/bk-1985-0272.

- [77] D. J. McClements i J. Rao, „Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, t. 51, nr 4, s. 285–330, mar. 2011, doi: 10.1080/10408398.2011.559558.
- [78] T. F. Tadros, „Emulsion Formation, Stability, and Rheology”, w *Emulsion Formation and Stability*, 1. wyd., T. F. Tadros, Red., Wiley, 2013, s. 1–75. doi: 10.1002/9783527647941.ch1.
- [79] D. J. McClements, *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Second Edition*, 0 wyd. CRC Press, 2004. doi: 10.1201/9781420039436.
- [80] B. Nikolaev, L. Yakovleva, V. Fedorov, H. Li, H. Gao, i M. Shevtsov, „Nano- and Microemulsions in Biomedicine: From Theory to Practice”, *Pharmaceutics*, t. 15, nr 7, s. 1989, lip. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15071989.
- [81] B. P. Binks i T. S. Horozov, „Colloidal Particles at Liquid Interfaces: An Introduction”, w *Colloidal Particles at Liquid Interfaces*, 1. wyd., B. P. Binks i T. S. Horozov, Red., Cambridge University Press, 2006, s. 1–74. doi: 10.1017/CBO9780511536670.002.
- [82] E. Dickinson, „Food emulsions and foams: Stabilization by particles”, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, t. 15, nr 1–2, s. 40–49, kwi. 2010, doi: 10.1016/j.cocis.2009.11.001.
- [83] Q. Zhu, H. Lu, J. Zhu, M. Zhang, i L. Yin, „Development and characterization of pickering emulsion stabilized by zein/corn fiber gum (CFG) complex colloidal particles”, *Food Hydrocolloids*, t. 91, s. 204–213, cze. 2019, doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.01.029.
- [84] B. Fouconnier, M. A. Aboudzadeh, i F. López-Serrano, „Silica-Supported Styrene-Co-Divinylbenzene Pickering Emulsion Polymerization: Tuning Surface Charge and Hydrophobicity by pH and Co-Aid Adsorption”, *Processes*, t. 9, nr 10, s. 1820, paź. 2021, doi: 10.3390/pr9101820.
- [85] G. Muscholik, „Multiple emulsions for food use”, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, t. 12, nr 4–5, s. 213–220, paź. 2007, doi: 10.1016/j.cocis.2007.07.006.
- [86] J. Jiao i D. J. Burgess, „Rheology and stability of water-in-oil-in-water multiple emulsions containing Span 83 and Tween 80”, *AAPS PharmSci*, t. 5, nr 1, s. E7, 2003, doi: 10.1208/ps050107.
- [87] M. Bonnet, M. Cansell, A. Berkaoui, M. H. Ropers, M. Anton, i F. Leal-Calderon, „Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions”, *Food Hydrocolloids*, t. 23, nr 1, s. 92–101, sty. 2009, doi: 10.1016/j.foodhyd.2007.11.016.
- [88] B. Nikolaev, L. Yakovleva, V. Fedorov, H. Li, H. Gao, i M. Shevtsov, „Nano- and Microemulsions in Biomedicine: From Theory to Practice”, *Pharmaceutics*, t. 15, nr 7, s. 1989, lip. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15071989.
- [89] A. Santamaria-Echart *et al.*, „New Trends in Natural Emulsifiers and Emulsion Technology for the Food Industry”, w *Natural Food Additives*, M. A. Prieto i P. Otero, Red., IntechOpen, 2022. doi: 10.5772/intechopen.99892.
- [90] G. T. Vladislavljević i R. A. Williams, „Recent developments in manufacturing emulsions and particulate products using membranes”, *Advances in Colloid and Interface Science*, t. 113, nr 1, s. 1–20, mar. 2005, doi: 10.1016/j.cis.2004.10.002.
- [91] A. T. Florence i D. Whitehill, „Stabilization of water/oil/water multiple emulsions by polymerization of the aqueous phases”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, t. 34, nr 11, s. 687–691, lis. 1982, doi: 10.1111/j.2042-7158.1982.tb06201.x.
- [92] K. Pays, „Double emulsions: how does release occur?”, *Journal of Controlled Release*, t. 79, nr 1–3, s. 193–205, luty 2002, doi: 10.1016/S0168-3659(01)00535-1.
- [93] P. D. R. Daniels, „Pharmaceutical emulsions and suspensions. Francoise Nieloud, Gilberte Marti-Mestres (Editors) Marcel Dekker, New York, 2000; 637 pages, \$165; ISBN 0-8247-0304-9”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, t. 51, nr 1, s. 83, sty. 2001, doi: 10.1016/S0939-6411(00)00118-1.
- [94] V. E. Ziegler i B. A. Wolf, „Bimodal drop size distributions during the early stages of shear induced coalescence”, *Polymer*, t. 46, nr 22, s. 9265–9273, paź. 2005, doi: 10.1016/j.polymer.2005.07.055.
- [95] K. Sedláčková, L. Ševelová, D. Igaz, i E. Aydın, „Determination of Particle Size Distribution: Comparison of Standard Hydrometer Method and Laser Diffraction Analysis for Use in Forestry”, *Forests*, t. 15, nr 2, s. 327, luty 2024, doi: 10.3390/f15020327.
- [96] A. Bhattad, „Review on viscosity measurement: devices, methods and models”, *J Therm Anal Calorim*, t. 148, nr 14, s. 6527–6543, lip. 2023, doi: 10.1007/s10973-023-12214-0.

- [97] M. A. Cerqueira, F. Valoppi, i K. Pal, „Oleogels and Organogels: A Promising Tool for New Functionalities”, *Gels*, t. 8, nr 6, s. 349, cze. 2022, doi: 10.3390/gels8060349.
- [98] E. M. Ahmed, F. S. Aggor, A. M. Awad, i A. T. El-Aref, „An innovative method for preparation of nanometal hydroxide superabsorbent hydrogel”, *Carbohydrate Polymers*, t. 91, nr 2, s. 693–698, sty. 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.08.056.
- [99] F. L. Buchholz, Red., *Modern superabsorbent polymer technology*. New York Weinheim: Wiley-VCH, 1998.
- [100] M. E. Ahmed, „Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review”, *J. Adv. Res.*, t. 6, nr 2, s. 105–121, 2015, doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [101] M. C. Hacker i A. G. Mikos, „Synthetic Polymers”, w *Principles of Regenerative Medicine*, Elsevier, 2011, s. 587–622. doi: 10.1016/B978-0-12-381422-7.10033-1.
- [102] W. Zhao, X. Jin, Y. Cong, Y. Liu, i J. Fu, „Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering”, *J of Chemical Tech & Biotech*, t. 88, nr 3, s. 327–339, mar. 2013, doi: 10.1002/jctb.3970.
- [103] S. Burkert, T. Schmidt, U. Gohs, H. Dorschner, i K.-F. Arndt, „Cross-linking of poly(N-vinyl pyrrolidone) films by electron beam irradiation”, *Radiation Physics and Chemistry*, t. 76, nr 8–9, s. 1324–1328, sie. 2007, doi: 10.1016/j.radphyschem.2007.02.024.
- [104] S. Mitura, A. Sionkowska, i A. Jaiswal, „Biopolymers for hydrogels in cosmetics: review”, *J Mater Sci: Mater Med*, t. 31, nr 6, s. 50, cze. 2020, doi: 10.1007/s10856-020-06390-w.
- [105] Y. Almoshari, „Novel Hydrogels for Topical Applications: An Updated Comprehensive Review Based on Source”, *Gels*, t. 8, nr 3, s. 174, mar. 2022, doi: 10.3390/gels8030174.
- [106] Y. Budama-Kilinc, R. Cakir-Koc, B. Aslan, B. Özkan, H. Mutlu, i E. Üstün, „Hydrogels in Regenerative Medicine”, w *Biomaterials in Regenerative Medicine*, L. A. Dobrzański, Red., InTech, 2018. doi: 10.5772/intechopen.70409.
- [107] L. S. K. Dassanayake, D. R. Kodali, i S. Ueno, „Formation of oleogels based on edible lipid materials”, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, t. 16, nr 5, s. 432–439, paź. 2011, doi: 10.1016/j.cocis.2011.05.005.
- [108] S. Murdan, „Organogels in drug delivery”, *Expert Opinion on Drug Delivery*, t. 2, nr 3, s. 489–505, maj 2005, doi: 10.1517/17425247.2.3.489.
- [109] W. Jiang, J. Qi, J. Liao, i X. Yang, „Acid/ethanol induced pectin gelling and its application in emulsion gel”, *Food Hydrocolloids*, t. 118, s. 106774, wrz. 2021, doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106774.
- [110] A. A. Abe, I. Aiello, C. Oliviero Rossi, i P. Caputo, „Oleogels: Uses, Applications, and Potential in the Food Industry”, *Gels*, t. 11, nr 7, s. 563, lip. 2025, doi: 10.3390/gels11070563.
- [111] M. A. Cerqueira, F. Valoppi, i K. Pal, „Oleogels and Organogels: A Promising Tool for New Functionalities”, *Gels*, t. 8, nr 6, s. 349, cze. 2022, doi: 10.3390/gels8060349.
- [112] R. M. El-Dahmy *et al.*, „Development of Transdermal Oleogel Containing Olmesartan Medoxomil: Statistical Optimization and Pharmacological Evaluation”, *Pharmaceutics*, t. 15, nr 4, s. 1083, mar. 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15041083.
- [113] M. A. Cerqueira, F. Valoppi, i K. Pal, „Oleogels and Organogels: A Promising Tool for New Functionalities”, *Gels*, t. 8, nr 6, s. 349, cze. 2022, doi: 10.3390/gels8060349.
- [114] W. Hou i K. D. Papadopoulos, „W1/O/W2 and O1/W/O2 globules stabilized with Span 80 and Tween 80”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, t. 125, nr 2–3, s. 181–187, cze. 1997, doi: 10.1016/S0927-7757(96)03861-7.
- [115] S. Klein i V. P. Shah, „A standardized mini paddle apparatus as an alternative to the standard paddle”, *AAPS PharmSciTech*, t. 9, nr 4, s. 1179–1184, 2008, doi: 10.1208/s12249-008-9161-6.
- [116] I. S. Young i J. V. Woodside, „Antioxidants in health and disease”, *J Clin Pathol*, t. 54, nr 3, s. 176–186, mar. 2001, doi: 10.1136/jcp.54.3.176.
- [117] B. Halliwell i J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 2015. doi: 10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.
- [118] F. Shahidi i Y. Zhong, „Measurement of antioxidant activity”, *Journal of Functional Foods*, t. 18, s. 757–781, paź. 2015, doi: 10.1016/j.jff.2015.01.047.

- [119] J. Pullar, A. Carr, i M. Vissers, „The Roles of Vitamin C in Skin Health”, *Nutrients*, t. 9, nr 8, s. 866, sie. 2017, doi: 10.3390/nu9080866.
- [120] N. Liang i D. Kitts, „Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action”, *Molecules*, t. 19, nr 11, s. 19180–19208, lis. 2014, doi: 10.3390/molecules191119180.
- [121] M. S. Blois, „Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical”, *Nature*, t. 181, nr 4617, s. 1199–1200, kwi. 1958, doi: 10.1038/1811199a0.
- [122] Ī. Gulcin i S. H. Alwasel, „DPPH Radical Scavenging Assay”, *Processes*, t. 11, nr 8, s. 2248, lip. 2023, doi: 10.3390/pr11082248.
- [123] N. J. Miller, C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan, i A. Milner, „A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates”, *Clinical Science*, t. 84, nr 4, s. 407–412, kwi. 1993, doi: 10.1042/cs0840407.
- [124] I. R. Ilyasov, V. L. Beloborodov, I. A. Selivanova, i R. P. Terekhov, „ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways”, *IJMS*, t. 21, nr 3, s. 1131, luty 2020, doi: 10.3390/ijms21031131.
- [125] I. F. F. Benzie i J. J. Strain, „The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay”, *Analytical Biochemistry*, t. 239, nr 1, s. 70–76, lip. 1996, doi: 10.1006/abio.1996.0292.
- [126] N. Pellegrini *et al.*, „Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays”, *The Journal of Nutrition*, t. 133, nr 9, s. 2812–2819, wrz. 2003, doi: 10.1093/jn/133.9.2812.
- [127] R. L. Prior, X. Wu, i K. Schaich, „Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements”, *J. Agric. Food Chem.*, t. 53, nr 10, s. 4290–4302, maj 2005, doi: 10.1021/jf0502698.
- [128] I. Gülçin, „In vitro antioxidant properties of morphine”, *Pharmacological Research*, t. 49, nr 1, s. 59–66, sty. 2004, doi: 10.1016/j.phrs.2003.07.012.
- [129] A. Skoczeń, „Metody badania aktywności antyoksydacyjnej składników produktów kosmetycznych”, *CHEMICAL REVIEW*, t. 1, nr 8, s. 45–49, sie. 2025, doi: 10.15199/62.2025.8.3.
- [130] M. Noszczyk, *Kosmetologia pielęgnacyjna i lekarska*, Wyd. 1 (dodruk). Warszawa: Wydawn. Lekarskie PZWL, 2011.
- [131] „Courage + Khazaka Electronic. Scientific Products”. [Online]. Dostępne na: <https://www.courage-khazaka.de/en/scientific-products/all-products>.
- [132] J. Lee, H. Yoon, S. Kim, C. Lee, J. Lee, i S. Yoo, „Deep learning-based skin care product recommendation: A focus on cosmetic ingredient analysis and facial skin conditions”, *J of Cosmetic Dermatology*, t. 23, nr 6, s. 2066–2077, cze. 2024, doi: 10.1111/jocd.16218.
- [133] J. Pinnagoda, R. A. Tupkek, T. Agner, i J. Serup, „Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement: A Report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis”, *Contact Dermatitis*, t. 22, nr 3, s. 164–178, mar. 1990, doi: 10.1111/j.1600-0536.1990.tb01553.x.
- [134] M.-M. Constantin, E. Poenaru, C. Poenaru, i T. Constantin, „Skin Hydration Assessment through Modern Non-Invasive Bioengineering Technologies”, *Maedica (Bucur)*, t. 9, nr 1, s. 33–38, mar. 2014.
- [135] E. H. Mojumdar, Q. D. Pham, D. Topgaard, i E. Sparr, „Skin hydration: interplay between molecular dynamics, structure and water uptake in the stratum corneum”, *Sci Rep*, t. 7, nr 1, s. 15712, lis. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-15921-5.
- [136] R. Jachowicz, J. Weremczuk, i G. Tarapata, „Transepidermal water loss sensor based on fast dew point hygrometer”, *Sensors and Actuators A: Physical*, t. 123–124, s. 7–11, wrz. 2005, doi: 10.1016/j.sna.2005.04.001.
- [137] R. Voegeli, M. Cherel, R. Schoop, i A. V. Rawlings, „A comprehensive comparison of facial skin hydration based on capacitance and conductance measurements in Chinese women”, *Intern J of Cosmetic Sci*, t. 44, nr 6, s. 703–718, grudz. 2022, doi: 10.1111/ics.12814.
- [138] M. Green, N. Kashetsky, A. Feschuk, i H. I. Maibach, „Transepidermal Water Loss (TEWL): Environment and Pollution—A Systematic Review”, *Skin Health and Disease*, t. 2, nr 2, s. ski2.104, cze. 2022, doi: 10.1002/ski2.104.

- [139] H. Y. Kang, J. W. Lee, F. Papaccio, B. Bellei, i M. Picardo, „Alterations of the pigmentation system in the aging process”, *Pigment Cell Melanoma Res*, t. 34, nr 4, s. 800–813, lip. 2021, doi: 10.1111/pcmr.12994.
- [140] B. C. K. Ly, E. B. Dyer, J. L. Feig, A. L. Chien, i S. Del Bino, „Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement”, *Journal of Investigative Dermatology*, t. 140, nr 1, s. 3-12.e1, sty. 2020, doi: 10.1016/j.jid.2019.11.003.
- [141] M. Dąbrowska i I. Nowak, „Noninvasive evaluation of the influence of aucubin-containing cosmetic macroemulsion on selected skin parameters”, *J of Cosmetic Dermatology*, t. 20, nr 3, s. 1022–1030, mar. 2021, doi: 10.1111/jocd.13649.
- [142] C. Trojahn, G. Dobos, M. Schario, i L. Ludriksone, „Relation between skin micro-topography, roughness, and skin age”, *Skin Res Technol*, cze. 2014, doi: <https://doi.org/10.1111/srt.12158>.
- [143] H. Tronnier, M. Wiebusch, U. Heinrich, i R. Stute, „Surface Evaluation of Living Skin”, w *Rheumaderm*, t. 455, C. Mallia i J. Uitto, Red., w *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 455., Boston, MA: Springer US, 1999, s. 507–516. doi: 10.1007/978-1-4615-4857-7_75.
- [144] „Instrukcja Użytkownika urządzenia Visioscan ® VC 98 (Courage+Khazaka electronic GmbH)”. Eprus, 2016.
- [145] C. Trojahn, G. Dobos, M. Schario, L. Ludriksone, U. Blume-Peytavi, i J. Kottner, „Relation between skin micro-topography, roughness, and skin age”, *Skin Research and Technology*, t. 21, nr 1, s. 69–75, luty 2015, doi: 10.1111/srt.12158.
- [146] M. Dąbrowska, A. Mielcarek, i I. Nowak, „Evaluation of sex-related changes in skin topography and structure using innovative skin testing equipment”, *Skin Research and Technology*, t. 24, nr 4, s. 614–620, lis. 2018, doi: 10.1111/srt.12473.
- [147] „Instrukcja Użytkownika urządzenia Visioline ® VL650 (Courage + Khazaka electronic GmbH)”. Eprus, 2013.
- [148] T. Houser, C. Zerweck, G. Grove, i R. Wickett, „Shadow analysis via the C+K Visioline: A technical note”, *Skin Research and Technology*, t. 23, nr 4, s. 447–451, lis. 2017, doi: 10.1111/srt.12354.
- [149] J. F. Fanguero, T. Andreani, M. A. Egea, M. L. Garcia, S. B. Souto, i E. B. Souto, „Experimental factorial design applied to mucoadhesive lipid nanoparticles via multiple emulsion process”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, t. 100, s. 84–89, grudz. 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.04.014.
- [150] A. Almeida i E. Souto, „Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins☆”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, t. 59, nr 6, s. 478–490, lip. 2007, doi: 10.1016/j.addr.2007.04.007.
- [151] M. Malatesta, „Transmission electron microscopy for nanomedicine: novel applications for long-established techniques”, *Eur J Histochem*, t. 60, nr 4, s. 2751, grudz. 2016, doi: 10.4081/ejh.2016.2751.
- [152] K. Jores, W. Mehnert, M. Drechsler, H. Bunjes, C. Johann, i K. Mäder, „Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy”, *Journal of Controlled Release*, t. 95, nr 2, s. 217–227, mar. 2004, doi: 10.1016/j.jconrel.2003.11.012.
- [153] S. Mourdikoudis, R. M. Pallares, i N. T. K. Thanh, „Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties”, *Nanoscale*, t. 10, nr 27, s. 12871–12934, 2018, doi: 10.1039/C8NR02278J.
- [154] „Nanoparticle Characterization by Microscopy Techniques: Best Practices in TEM and SEM Analysis. Technical Note.” Malvern Panalytical, 2020.
- [155] S. K. Filippov *et al.*, „Dynamic light scattering and transmission electron microscopy in drug delivery: a roadmap for correct characterization of nanoparticles and interpretation of results”, *Mater. Horiz.*, t. 10, nr 12, s. 5354–5370, 2023, doi: 10.1039/D3MH00717K.
- [156] W. Mehnert i K. Mäder, „Solid lipid nanoparticles”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, t. 64, s. 83–101, grudz. 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.021.
- [157] E. B. Souto i R. H. Müller, „Investigation of the factors influencing the incorporation of clotrimazole in SLN and NLC prepared by hot high-pressure homogenization”, *Journal of Microencapsulation*, t. 23, nr 4, s. 377–388, sty. 2006, doi: 10.1080/02652040500435295.
- [158] V. Jennings, A. F. Thünemann, i S. H. Gohla, „Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids”, *International Journal of Pharmaceutics*, t. 199, nr 2, s. 167–177, kwi. 2000, doi: 10.1016/S0378-5173(00)00378-1.

- [159] H. Bunjes i T. Unruh, „Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, t. 59, nr 6, s. 379–402, lip. 2007, doi: 10.1016/j.addr.2007.04.013.
- [160] S. Wissing, „Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN)”, *International Journal of Pharmaceutics*, t. 254, nr 1, s. 65–68, mar. 2003, doi: 10.1016/S0378-5173(02)00684-1.
- [161] F. Castelli, C. Puglia, M. G. Sarpietro, L. Rizza, i F. Bonina, „Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry”, *International Journal of Pharmaceutics*, t. 304, nr 1–2, s. 231–238, lis. 2005, doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.08.011.
- [162] F.-Q. Hu, S.-P. Jiang, Y.-Z. Du, H. Yuan, Y.-Q. Ye, i S. Zeng, „Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers”, *International Journal of Pharmaceutics*, t. 314, nr 1, s. 83–89, maj 2006, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.01.040.
- [163] N. Feng, „Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with frankincense and myrrh oil”, *IJN*, s. 2033, kwi. 2012, doi: 10.2147/IJN.S30085.
- [164] A. C. Silva *et al.*, „Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, t. 86, nr 1, s. 158–165, sie. 2011, doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.03.035.
- [165] N. Huang, „Rheological Characterization of Pharmaceutical and Cosmetic Formulations for Cutaneous Applications”, *CPD*, t. 25, nr 21, s. 2349–2363, wrz. 2019, doi: 10.2174/1381612825666190716110919.
- [166] T. F. Tadros, „Emulsion Formation, Stability, and Rheology”, w *Emulsion Formation and Stability*, 1. wyd., T. F. Tadros, Red., Wiley, 2013, s. 1–75. doi: 10.1002/9783527647941.ch1.
- [167] H. Niu *et al.*, „Multiscale combined techniques for evaluating emulsion stability: A critical review”, *Advances in Colloid and Interface Science*, t. 311, s. 102813, sty. 2023, doi: 10.1016/j.cis.2022.102813.
- [168] H. Masmoudi, P. Piccerelle, Y. Le Dréau, i J. Kister, „A Rheological Method to Evaluate the Physical Stability of Highly Viscous Pharmaceutical Oil-in-Water Emulsions”, *Pharm Res*, t. 23, nr 8, s. 1937–1947, sie. 2006, doi: 10.1007/s11095-006-9038-x.
- [169] Y. Jin, D. Liu, i J. Hu, „Effect of Surfactant Molecular Structure on Emulsion Stability Investigated by Interfacial Dilatational Rheology”, *Polymers (Basel)*, t. 13, nr 7, s. 1127, kwi. 2021, doi: 10.3390/polym13071127.
- [170] D. J. McClements, E. A. Decker, i J. Weiss, „Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components”, *Journal of Food Science*, t. 72, nr 8, paź. 2007, doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x.
- [171] S. Frasc-Melnik, I. T. Norton, i F. Spyropoulos, „Fat-crystal stabilised w/o emulsions for controlled salt release”, *Journal of Food Engineering*, t. 98, nr 4, s. 437–442, cze. 2010, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.01.025.
- [172] M. Kroger, Editor Applied Rheology, i editors@appliedrheology.org, „Rheological and textural properties of cosmetic emulsions”, 2011, doi: 10.3933/APPLRHEOL-21-35200.
- [173] F. Leal-Calderon, „Emulsified lipids: formulation and control of end-use properties”, *OCL*, t. 19, nr 2, s. 111–119, mar. 2012, doi: 10.1051/ocl.2012.0438.
- [174] C. P. Whitby, „Structuring Edible Oils With Fumed Silica Particles”, *Front. Sustain. Food Syst.*, t. 4, s. 585160, paź. 2020, doi: 10.3389/fsufs.2020.585160.
- [175] *Edible Oleogels*. Elsevier, 2011. doi: 10.1016/C2015-0-02413-3.
- [176] L. D. Trino, E. S. Bronze-Uhle, A. George, M. T. Mathew, i P. N. Lisboa-Filho, „Surface Physicochemical and Structural Analysis of Functionalized Titanium Dioxide Films”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, t. 546, s. 168–178, cze. 2018, doi: 10.1016/j.colsurfa.2018.03.019.
- [177] C. P. Whitby, M. Krebsz, i S. J. Booty, „Understanding the role of hydrogen bonding in the aggregation of fumed silica particles in triglyceride solvents”, *Journal of Colloid and Interface Science*, t. 527, s. 1–9, paź. 2018, doi: 10.1016/j.jcis.2018.05.029.
- [178] M. Milas, M. Rinaudo, M. Knipper, i J. L. Schuppiser, „Flow and viscoelastic properties of xanthan gum solutions”, *Macromolecules*, t. 23, nr 9, s. 2506–2511, kwi. 1990, doi: 10.1021/ma00211a018.
- [179] E. M. Nsengiyumva, M. P. Heitz, i P. Alexandridis, „Salt and Temperature Effects on Xanthan Gum Polysaccharide in Aqueous Solutions”, *IJMS*, t. 25, nr 1, s. 490, grudz. 2023, doi: 10.3390/ijms25010490.

- [180] E. Larrañeta, S. Stewart, M. Ervine, R. Al-Kasasbeh, i R. Donnelly, „Hydrogels for Hydrophobic Drug Delivery. Classification, Synthesis and Applications”, *JFB*, t. 9, nr 1, s. 13, sty. 2018, doi: 10.3390/jfb9010013.
- [181] K. J. Lee, Y. C. Oh, W. K. Cho, i J. Y. Ma, „Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity Determination of One Hundred Kinds of Pure Chemical Compounds Using Offline and Online Screening HPLC Assay”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, t. 2015, s. 1–13, 2015, doi: 10.1155/2015/165457.
- [182] S. A. Wissing, O. Kayser, i R. H. Müller, „Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, t. 56, nr 9, s. 1257–1272, maj 2004, doi: 10.1016/j.addr.2003.12.002.
- [183] C. Loo *et al.*, „Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion”, *Int J Nanomedicine*, t. 8, s. 13–22, 2013, doi: 10.2147/IJN.S35648.
- [184] S. A. Wissing i R. H. Müller, „The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties”, *International Journal of Pharmaceutics*, t. 242, nr 1–2, s. 377–379, sie. 2002, doi: 10.1016/S0378-5173(02)00220-X.
- [185] Farboud, Farboud, i Tabakhi, „Novel formulation and evaluation of a Q10-loaded solid lipid nanoparticle cream: in vitro and in vivo studies”, *IJN*, s. 611, mar. 2011, doi: 10.2147/IJN.S16815.
- [186] N. Akombaetwa, A. B. Ilangala, L. Thom, P. B. Memvanga, B. A. Witika, i A. B. Buya, „Current Advances in Lipid Nanosystems Intended for Topical and Transdermal Drug Delivery Applications”, *Pharmaceutics*, t. 15, nr 2, s. 656, luty 2023, doi: 10.3390/pharmaceutics15020656.
- [187] D. A. Safta, C. Bogdan, i M.-L. Moldovan, „SLNs and NLCs for Skin Applications: Enhancing the Bioavailability of Natural Bioactives”, *Pharmaceutics*, t. 16, nr 10, s. 1270, wrz. 2024, doi: 10.3390/pharmaceutics16101270.
- [188] C. Scarponi *et al.*, „Inhibition of inflammatory and proliferative responses of human keratinocytes exposed to the sesquiterpene lactones dehydrocostuslactone and costunolide”, *PLoS One*, t. 9, nr 9, s. e107904, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0107904.
- [189] J. Pardeike, A. Hommoss, i R. H. Müller, „Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products”, *International Journal of Pharmaceutics*, t. 366, nr 1–2, s. 170–184, sty. 2009, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.10.003.
- [190] R. López-García i A. Ganem-Rondero, „Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Occlusive Effect and Penetration Enhancement Ability”, *JCDSA*, t. 05, nr 02, s. 62–72, 2015, doi: 10.4236/jcda.2015.52008.
- [191] S. Mukherjee, S. Ray, i R. Thakur, „Solid lipid nanoparticles: A modern formulation approach in drug delivery system”, *Indian J Pharm Sci*, t. 71, nr 4, s. 349, 2009, doi: 10.4103/0250-474X.57282.
- [192] Md. Al-Amin *et al.*, „Increased therapeutic efficacy of a newly synthesized tyrosinase inhibitor by solid lipid nanoparticles in the topical treatment of hyperpigmentation”, *DDDT*, t. Volume 10, s. 3947–3957, grudz. 2016, doi: 10.2147/DDDT.S123759.
- [193] P. Mikled, W. Chavasiri, i M. Khongkow, „Development of dihydroxyresveratrol-loaded nanostructured lipid carriers for safe and effective treatment of hyperpigmentation”, *Sci Rep*, t. 14, nr 1, s. 29211, lis. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-80671-0.
- [194] L. Salvioni *et al.*, „The emerging role of nanotechnology in skincare”, *Advances in Colloid and Interface Science*, t. 293, s. 102437, lip. 2021, doi: 10.1016/j.cis.2021.102437.
- [195] M. Pawłowska, M. Marzec, W. Jankowiak, i I. Nowak, „Retinol and Oligopeptide-Loaded Lipid Nanocarriers as Effective Raw Material in Anti-Acne and Anti-Aging Therapies”, *Life (Basel)*, t. 14, nr 10, s. 1212, wrz. 2024, doi: 10.3390/life14101212.
- [196] X. Liu, H. Li, S. Wang, J. Zhang, i D. Liu, „Sesquiterpene lactones of *Aucklandia lappa*: Pharmacology, pharmacokinetics, toxicity, and structure–activity relationship”, *Chinese Herbal Medicines*, t. 13, nr 2, s. 167–176, kwi. 2021, doi: 10.1016/j.chmed.2020.11.005.

10. Spis osiągnięć naukowych

10.1. Publikacje w czasopismach naukowych

- Michał Smoleń, Wioletta Kośnik, Roman Gajda, Krzysztof Woźniak, Aleksandra Skoczeń, Anna Kajetanowicz, Karol Grela, *4- Ruthenium Complexes Bearing Thiophene-Based Unsymmetrical N-Heterocyclic Carbene Ligands as Selective Catalysts for Olefin Metathesis in Toluene and Environmentally Friendly 2-Methyltetrahydrofuran*, **Chemistry**, 2018, 12;24(57):15372-15379.
- Tomasz Nieniałtowski, Paweł Krzesiński, Marcel E. Baumert, Aleksandra Skoczeń, Ewa Suska-Kauf, Jolanta Pawłowska, Anna Kajetanowicz, Karol Grela, *4-Methyltetrahydropyran as a Convenient Alternative Solvent for Olefin Metathesis Reaction: Model Studies and Medicinal Chemistry Applications*, **ACS Sustainable Chem. Eng.**, 2020, 8, 49, 18215–18223.
- Aleksandra Skoczeń, Dawid Frąckowiak, Robert Przekop, Miłosz Frydrych, Małgorzata Kasperkowiak, Piotr Jeleń, Maciej Sitarz, Bogdan Marciniec, *New Ceramics Precursors Containing Si and Ge Atoms—Cubic Germasilsesquioxanes—Synthesis, Thermal Decomposition and Spectroscopic Analysis*, **Molecules**, 2022, 27, 1441.
- Marta Marzec, Aleksandra Skoczeń, Joanna Żuberek, Hanna Posiadała, Izabela Nowak, *Skalnica jako źródło naturalnych składników aktywnych do celów kosmetycznych*. **Chemik**: miesięcznik naukowo-techniczny, 2024, 73.
- Aleksandra Skoczeń, Marta Marzec, Izabela Nowak, *Methods for testing the antioxidant activity of cosmetic product ingredients*, **Przemysł Chemiczny**, 2025, vol. 104, nr 8, 3–8.
- Marzec, Marta, Aleksandra Skoczeń, Joanna Żuberek, Hanna Posiadała, Izabela Nowak. 2024. „Skalnica jako źródło naturalnych składników aktywnych do celów kosmetycznych”. **Chemik**: miesięcznik naukowo-techniczny 73. <https://doi.org/10.15199/4.2024.3.4>.

10.2. Uczestnictwo w konferencjach naukowych

Konferencje międzynarodowe

- Skoczeń, *Preparation and characterization of cosmetic formulations containing sesquiterpenic lactones*, **6th Polish-Kazakh Meeting: relationship between chemistry and biology**, 2021, online
- A. Skoczeń, I. Nowak, *Preparation and characterization of cosmetic formulations containing sesquiterpenic lactones*, **2nd Chemistry for beauty and health**, 2021, online
- A. Skoczeń, M. Dąbrowska, I. Nowak, *Stability testing of cosmetic formulations containing sesquiterpenic lactones*, **7th Polish-Kazakh Meeting: relationship between chemistry and biology**, 2021, online
- A. Skoczeń, M. Marzec, I. Nowak, *Lipid nanoparticles incorporated with sesquiterpenic lactones*, **1st Natural Cosmetics International Meeting**, 2021, Rzeszów
- A. Skoczeń, M. Marzec, I. Nowak, *Characterization of cosmetic formulations containing lipid nanoparticles incorporated with sesquiterpenic lactones*, **45. Międzynarodowe Seminarium Naukowo-Techniczne “Chemistry for Agriculture”**, 2021, Karpacz
- A. Skoczeń, M. Marzec, I. Nowak, *Assessment of the effectiveness of the prepared cosmetic preparations containing sesquiterpenic lactones*, **8th Polish-Kazakh Meeting: relationship between chemistry and biology**, 2022, online
- A. Skoczeń, I. Nowak, *Release of active substances of the prepared cosmetic preparations containing sesquiterpenic lactones*, **9th Polish-Kazakh Meeting: relationship between chemistry and biology**, 2023, online
- M. Marzec, M. Pawłowska, A. Skoczeń, B. Woźniak, A. Wawrzyńczak, I. Nowak, *Testing of cosmetic products designed for various purposes - a brief overview of available analytical methods*, **5th International Congress on Analytical and Bioanalytical chemistry**, 2024, Antalya

Konferencje krajowe

- Skoczeń, Analiza składów produktów kosmetycznych, **XXIII Ogólnopolskie Sympozjum NKCh UAM w Jeziorach**, 2019, Jezioro
- A. Skoczeń, I. Nowak, *Badanie właściwości antyoksydacyjnych składników aktywnych w formulacjach kosmetycznych*, **Zjazd Zimowy Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego**, 2019, Gdańsk
- A. Skoczeń, *Skład a działanie kosmetyku*, **I Ogólnopolskie Sympozjum Studentów Chemii**, 2020, Warszawa
- A. Skoczeń, I. Nowak, *Nanocząstki lipidowe*, **I Ogólnopolska Konferencja Online Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego**, 2020, online
- A. Skoczeń, I. Nowak, *Laktony seskwiterpenowe w formulacjach kosmetycznych*, **E-Zjazd Wiosenny Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego**, 2021, online
- A. Skoczeń, M. Dąbrowska, I. Nowak, *Porównanie formulacji żelowych zawierających laktony seskwiterpenowe*, **Fizykochemia granic faz – metody instrumentalne**, 2021, Lublin
- A. Skoczeń, M. Dąbrowska, I. Nowak, *Nanocząstki lipidowe inkorporowane laktanami seskwiterpenowymi*, **63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego**, 2021, Łódź
- A. Skoczeń, M. Marzec, I. Nowak, *Wybrane laktony seskwiterpenowe jako nowe substancje aktywne w formulacjach kosmetycznych*, **XXV Ogólnopolskie Sympozjum NKCh UAM w Jeziorach**, 2021, Jezioro
- A. Skoczeń, M. Marzec, I. Nowak, *Wpływ rodzaju podłoża żelowego na stabilność formulacji z laktanami seskwiterpenowymi*, **Zjazd Zimowy Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego**, 2022, Poznań
- A. Skoczeń, I. Nowak, *Aparaturowe metody badań kondycji skóry*, **XXVI Ogólnopolskie Sympozjum NKCh UAM w Jeziorach**, 2022, Jezioro
- A. Skoczeń, I. Nowak, *Aparaturowe metody badań kondycji skóry podczas badań in vivo*, **Zjazd Wiosenny Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego**, 2023, Chęciny
- M. Dzienisik, B. Woźniak, A. Skoczeń, M. Marzec, A. Wawrzyńczak, I. Nowak, *Badania aplikacyjne w chemii kosmetycznej oraz samochodowej*, **XXVII Konferencja „Nowoczesne Metody Instrumentalne w Analizie Śladowej”**, 2024, Łódź

10.3. Przyznane wyróżnienia

- Nagroda „Maxima cum Laude” dla najlepszego studenta UAM w roku akademickim 2018/2019.
- Nagroda „Medal Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu dla absolwentów w roku akademickim 2018/2019.
- Stypendia Rektora UAM dla najlepszych studentów w latach akademickich: 2018/19, 2017/18, 2016/17 oraz 2015/2016.

11. Spis rysunków i tabel

Spis rysunków:

Rys. 4.1. Chemia struktur lamelarnych utworzonych przez lipidy międzykomórkowe.....	18
Rys. 4.2. Zmodyfikowany model cegiełkowo-zaprawowy warstwy rogowej naskórka narysowany z uwzględnieniem udziału wody.....	19
Rys. 4.3. Schemat budowy nanocząstek lipidowych trzech typów.....	22
Rys. 4.4. Modele struktur różnych typów nanocząstek lipidowych, otrzymywanych dzięki odmiennym warunkom i właściwościom ich składników.....	22
Rys. 4.5. Możliwe mechanizmy przenikania składników przez skórę za pomocą nanocząstek lipidowych.....	23
Rys. 4.6. Modele kosmetycznych SA lub leków wbudowanych w nanocząstki lipidowe.....	24
Rys. 4.7. Potencjalne zastosowania nanocząstek lipidowych jako nośników SA.....	26
Rys. 4.8. Zakresy rozmiarów cząstek i kropli w różnych typach układów dyspersyjnych stosowanych w formułacjach kosmetycznych i farmaceutycznych.....	31
Rys. 4.9. Schematyczne przedstawienie głównych mechanizmów destabilizacji emulsji.....	34
Rys. 4.10. Przedstawione metody badania parametrów skóry firmy Courage-Khazaka.....	46
Rys. 6.1. Homogenizator Panda Plus 2000 (firmy GEA).....	57
Rys. 6.2. Aparat Zetasizer Nano ZS (firmy Malvern Instruments) i refraktometr Refracto 30 PX/GS (firmy Mettler Toledo).....	58
Rys. 6.3. Wysokosprawny chromatograf cieczowy Varian 920-LC (firmy Agilent Technologies) ..	60
Rys. 6.4. Probówka Eppendorf Tubes® z uzyskaną dyspersją, wirówka laboratoryjna MPW-350R (firmy MPW Med. Instruments) oraz roztwór poddawany analizie HPLC po przesączeniu przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 µm.....	61
Rys. 6.5. Aparatura stosowana do oceny pH (EcoSense® pH 10 pH/Temperature Meter, Pen Style (firmy VMR International)), lepkości rotacyjny (wiskozymetr RC02 firmy Rheotec) i rozkładu wielkości cząstek (Mastersizer 2000, firmy Malvern Instruments Ltd).....	66
Rys. 6.6. Teflonowe komory ekstrakcyjne wykorzystywane w badaniach kinetyki uwalniania substancji aktywnych z formułacji kosmetycznych (przed napełnieniem formułacji kosmetyczną i po).....	69
Rys. 6.7. Teflonowe komory ekstrakcyjne w trakcie badania w aparacie łopatkowym Varian Vankel 7010. (firmy Agilent Technologies).....	69
Rys. 6.8. Spektrofotometr UV-Vis Carry 50 (firmy Varian).....	72
Rys. 6.9. Nawilżenie skóry (Corneometer® CM 825).....	77
Rys. 6.10. Przygotowanie silikonowych odlewów na dłoni ochotnika oraz uzyskana replika skóry.....	78
Rys 7.1. Otrzymane dyspersje nanocząstek lipidowych.....	80
Rys. 7.2. Obrazy TEM nanocząstek lipidowych inkorporowanych kostunolidem.....	85
Rys. 7.3. Obrazy TEM nanocząstek lipidowych inkorporowanych laktonem dehydrokustusowym.....	86
Rys. 7.4. Krzywe DSC podczas ogrzewania dla lipidu, nanocząstek lipidowych bez substancji aktywnej, nanocząstek lipidowych inkorporowanych kostunolidem i nanocząstek lipidowych inkorporowanych laktonem dehydrokustusowym.....	88
Rys. 7.5. Krzywe DSC podczas chłodzenia dla lipidu, nanocząstek lipidowych bez substancji aktywnej, nanocząstek lipidowych inkorporowanych kostunolidem i nanocząstek lipidowych inkorporowanych laktonem dehydrokustusowym.....	89

Rys. 7.6 Porównanie dyfraktogramów lipidu oraz badanych dyspersji nanocząstek lipidowych....	91
Rys. 7.7 Wyznaczone czasy retencji kostunolidu i laktonu dehydrokustusowego na chromatogramach	92
Rys. 7.8 Krzywe kalibracyjne dla badanych laktonów seskwiterpenowych rozpuszczonych w etanolu.....	93
Rys. 7.9 Zmiany lepkości emulsji 1 z dodatkiem laktonów seskwiterpenowych przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych przez 90 dni.	100
Rys. 7.10. Zmiany lepkości emulsji 2 z dodatkiem laktonów seskwiterpenowych przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych przez 90 dni.	101
Rys. 7.11 Zmiany lepkości oleożeli z dodatkiem laktonów seskwiterpenowych przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych przez 90 dni.	102
Rys. 7.12 Zmiany lepkości hydrożeli z dodatkiem laktonów seskwiterpenowych przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych przez 90 dni.	103
Rys. 7.13 Wygląd hydrożelu z dodatkiem kostunolidu bezpośrednio po preparatyce oraz przechowywanego w temperaturze 40°C przez 90 dni.	103
Tabela 7.7. Uzyskane wartości parametru d(0,9) dla otrzymanych formułacji kosmetycznych....	104
Rys. 7.14 Porównanie rozkładu wielkości cząstek emulsji E1 po 90 dniach przechowywania w 25°C (E1-90) oraz z dodatkiem kostunolidu (E1-K) i laktonu dehydrokustusowego (E1-L)	105
Rys. 7.15 Porównanie rozkładu wielkości cząstek formułacji oleożeli po 90 dniach przechowywania w 40°C (O-90) oraz z dodatkiem kostunolidu (O-K) i laktonu dehydrokustusowego (O-L).....	106
Rys. 7.16 Porównanie rozkładu wielkości cząstek hydrożeli po 90 dniach przechowywania w 4°C (H-90) oraz z dodatkiem kostunolidu (H-K) i laktonu dehydrokustusowego (H-L)	106
Rys. 7.17 Ubytek laktonu dehydrokustusowego po 90 dniach przechowywania w 4°C, 25°C i 40°C w formułacjach E1, E2 i O, w postaci wolnej (L) oraz enkapsulowanej w SLN (NL).	108
Rys. 7.18 Krzywe kalibracyjne dla badanych laktonów seskwiterpenowych rozpuszczonych w mieszaninie buforu fosforanowego i etanolu (65:35)	109
Rys. 7.19 Profile uwalniania kostunolidu (K) z badanych formułacji kosmetycznych	110
Rys. 7.20 Profile uwalniania laktonu dehydrokustusowego (L) z badanych formułacji kosmetycznych	112
Rys. 7.21 Schematyczne przedstawienie miejsc aplikacji poszczególnych preparatów kosmetycznych na dłoniach ochotników.....	119
Rys. 7.22 Zdjęcia otrzymanych preparatów kosmetycznych wraz z instrukcją, którą otrzymali ochotnicy.....	120
Rys. 7.23 Szablon używany podczas wykonywania pomiarów	120
Rys. 7.24 Zmiany poziomu nawilżenia wyznaczone dla oleożeli, zawierających substancje aktywne w formie klasycznej, w toku badań <i>in vivo</i>).....	126
Rys. 7.25 Zmiany poziomu nawilżenia wyznaczone dla oleożeli z zliofilizowanymi nanocząstkami lipidowymi w toku badań <i>in vivo</i>	126
Rys. 7.26 Zmiany poziomu nawilżenia wyznaczone dla emulsji zawierających substancje aktywne w formie klasycznej w toku badań aplikacyjnych <i>in vivo</i>	127
Rys. 7.28 Zmiany poziomu TEWL wyznaczone dla oleożeli zawierających substancje aktywne w formie klasycznej w toku badań <i>in vivo</i>	130
Rys. 7.29 Zmiany poziomu TEWL wyznaczone dla oleożeli z zliofilizowanymi nanocząstkami lipidowymi w toku badań <i>in vivo</i>	130

Rys. 7.30 Zmiany poziomu TEWL wyznaczone dla emulsji 2, zawierających substancje aktywne w formie klasycznej w toku badań <i>in vivo</i>).....	131
Rys. 7.32 Zmiany zawartości melaniny i stopnia zaczerwienia wyznaczone dla przygotowanych oleożeli w toku badań <i>in vivo</i>).....	133
Rys. 7.33 Zmiany zawartości melaniny i stopnia zaczerwienia wyznaczone dla przygotowanych emulsji w toku badań <i>in vivo</i>	134
Rys. 7.35 Zmiany parametrów L* i a* wyznaczone dla przygotowanych emulsji w toku badań <i>in vivo</i>	137
Rys. 7.36 Zmiany parametrów makrorzeźby skóry wyznaczone dla przygotowanych oleożeli w toku badań <i>in vivo</i>).....	138
Rys. 7.37 Zmiany parametrów makrorzeźby skóry wyznaczone dla przygotowanych emulsji w toku badań <i>in vivo</i>	139
Rys. 7.38 Zmiany parametrów makrorzeźby skóry wyznaczone dla przygotowanych oleożeli w toku badań <i>in vivo</i>	141
Rys. 7.39 Zmiany parametrów topografii skóry wyznaczone dla przygotowanych emulsji w toku badań <i>in vivo</i>	142
Rys. 7.40 Wyniki subiektywnej oceny testowanych oleożeli, zawierających substancje aktywne w formie klasycznej	144
Rys. 7.41 Wyniki subiektywnej oceny testowanych oleożeli z liofilizowanymi nanocząstkami lipidowymi.....	144
Rys. 7.42 Wyniki subiektywnej oceny testowanych emulsji 2, zawierających substancje aktywne w formie klasycznej.....	145
Rys. 7.43 Wyniki subiektywnej oceny testowanych emulsji 2 z wodną dyspersją nanocząstek lipidowych.....	145
<i>Spis tabel:</i>	
Tabela 4.1 Porównanie budowy i właściwości liposomów, nanocząstek lipidowych (SLN/NLC) oraz nanoemulsji stosowanych w systemach dermalnych.	27
Tabela 4.2. Porównanie właściwości fizycznych badanych laktonów seskwiterpenowych.....	28
Tabela 4.3. Zależność pomiędzy wartością HLB a rozpuszczalnością emulgatora i typem tworzonej emulsji	33
Tabela 4.4. Zastosowanie różnych typów emulsji w formulacjach kosmetycznych w zależności od zawartości fazy rozproszonej.....	36
Tabela 4.5. Klasyfikacja hydrożeli według pochodzenia, składu, struktury i właściwości fizykochemicznych.	38
Tabela 4.6. Zastosowanie różnych typów hydrożeli w formulacjach kosmetycznych.....	39
Tabela 4.7. Klasyfikacja oleożeli według użytego oleożelatora, mechanizmu tworzenia żelu i sposobu otrzymywania na podstawie.....	40
Tabela 4.8. Zastosowanie typów oleożeli w formulacjach kosmetycznych].	41
Tabela 4.9. Propozycja producenta interpretacji wyników korneometru dla skóry w normalnych warunkach (20°C i 40-60% wilgotności powietrza).	48
Tabela 4.10. Propozycja interpretacji wyników tewametry w jednostkach umownych dla zdrowej skóry w normalnych warunkach (20°C i 40-60% wilgotności powietrza)	48
Tabela 6.1. Skład chemiczny dyspersji nanocząstek lipidowych przygotowanych w ramach realizowanych badań	56
Tabela 6.2. Warunki analizy chromatograficznej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC)	61

Tabela 6.3. Skład chemicznych otrzymanych formułacji kosmetycznych	63
Tabela 6.4. Warunki badania efektywności uwalniania substancji aktywnych z formułacji kosmetycznych	70
Tabela 6.5. Zestawienie prowadzonych badań aplikacyjno-użytkowych z podziałem na tygodnie.	76
Tabela 6.6. Zestawienie prowadzonych badań aplikacyjno-użytkowych (analizy topograficznej i makrorzeźby skóry) z podziałem na tygodnie.	76
Tabela 7.1 Zestawienie przedstawiające otrzymane mieszaniny lipidów i substancji aktywnych ..	79
Tabela 7.2. Parametry stabilności fizykochemicznej otrzymanych nanocząstek lipidowych otrzymanych metodą HPH.	82
Tabela 7.3. Parametry stabilności fizykochemicznej otrzymanych nanocząstek lipidowych otrzymanych metodą emulsji wielokrotnej	82
Tabela 7.4 Parametry termiczne badanych układów lipidowych: temperatury topnienia T_t/T_t i entalpie $\Delta H_1/\Delta H_2$	90
Tabela 7.5. Zmiany pH badanych formułacji kosmetycznych bazowych (E1, E2, O, H) oraz z dodatkiem laktonów seskwiterpenowych (-K) i (-L) w formie klasycznej przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych przez 90 dni.	96
Tabela 7.6 Zmiany pH badanych formułacji kosmetycznych bazowych (E1, E2, O, H) oraz z dodatkiem nanocząstek lipidowych enkapsulowanych laktonami seskwiterpenowymi (-NK) i (-NL) przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych przez 90 dni.....	98
Tabela 7.8. Równania krzywych kalibracyjnych i współczynniki determinacji dla testów antyoksydacyjnych (DPPH, ABTS, FRAP)	116
Tabela 7.9. Wyznaczone parametry absorbancji i TEAC w testach DPPH/ABTS dla kostunolidu i laktonu dehydrokustusowego	117
Tabela 7.10. Analiza odpowiedzi ankiety informacyjnej ochotników badania aplikacyjno-użytkowego	121

12. Załączniki

Załącznik 1

FORMULARZ ŚWIADOMEJ ZGODY NA UDZIAŁ W BADANIU APLIKACYJNYM

Ja, lat

(imię i nazwisko)

(wiek)

wyrażam zgodę na udział w badaniu związanym z testowaniem oleożeli o właściwościach rozjaśniających skórę dłoni.

Oświadczam, że:

- otrzymałam pisemną oraz ustną informację na temat celu powyższego badania, czasie trwania oraz sposobie jego przeprowadzenia (w tym moich obowiązków jako probanta),
- zostałam poinformowana o możliwości wystąpienia niepożądanych odczynów skórnych podczas testowania preparatów kosmetycznych,
- jestem świadoma przysługującego mi prawa do odstąpienia od udziału w badaniu, bez podania przyczyny, na każdym jego etapie,
- zgadzam się, aby informacje dotyczące stanu skóry, uzyskane w wyniku badania, zostały wykorzystane w pracy badawczej,
- uzyskałam zapewnienie, że moje dane nie zostaną wykorzystane do celów innych niż strefa badawcza.

Niniejszym wyrażam pełną, świadomą i dobrowolną zgodę na udział w ww. badaniu.

.....

miejsce, data

.....

czytelny podpis

Załącznik 2

Imię i Nazwisko osoby badanej

.....

OŚWIADCZENIE BADANEGO - zgoda na przyjęcie warunków ubezpieczenia

Niniejszym oświadczam, że zostałem/am szczegółowo poinformowany/na o warunkach ubezpieczenia mojego udziału w badaniu pt. **„Ocena skuteczności działania preparatów o właściwościach rozjaśniających skórę dłoni”** i przyjmuję te warunki.

.....

.....

podpis badacza

podpis badanego

....., data

Załącznik 3

Imię i Nazwisko osoby badanej

.....

OŚWIADCZENIE BADANEGO - zgoda na przetwarzanie danych

Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych zgodnie z art. 24 ust. 1 ustawy z dnia 29 sierpnia 1997 r. o ochronie danych osobowych (tekst jednolity: Dz.U. z 2016 poz. 922 z późn. zm.) w zakresie niezbędnym do realizacji projektu badawczego pt. „**Ocena skuteczności działania preparatów o właściwościach rozjaśniających skórę dłoni**”.

Rozumiem, że posiadam prawo do dostępu do treści swoich danych oraz mam możliwość ich poprawiania.

.....

podpis badacza

.....

podpis badanego

....., data

Załącznik 4

KWESTIONARIUSZ ANKIETY

Proszę o wypełnienie ankiety, której celem jest bliższe poznanie Pani stanu skóry, zasad jej codziennej pielęgnacji, aktywności fizycznej oraz sposobu odżywiania. Pozwoli nam to na lepszą i dokładniejszą analizę wyników uzyskanych w toku badań aparaturowych realizowanych w ramach pracy dyplomowej w Zakładzie Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

1. Ile Pani ma lat? _____

2. W jakich warunkach Pani pracuje?

☐ pomieszczenie klimatyzowane (biuro)

☐ pomieszczenie nieklimatyzowane (biuro)

☐ praca w terenie (na świeżym powietrzu)

☐ inne, takie jak.....

3. W skali 1 – 5 jak Pani ocenia swój sposób żywienia?

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Bardzo zły

Bardzo dobry

4. Czy korzysta Pani z suplementów diety?

☐ tak

☐ nie

Jeśli tak, to jakich?.....

.....

5. Czy pali Pani papierosy?

☐ tak

☐ nie

☐ okazjonalnie

6. z jakich używek Pani korzysta? Można wybrać więcej niż jedną odpowiedź.

☐ kawa

☐ herbata

☐ alkohol

☐ napoje energetyczne

☐ inne, tak jak.....

7. W jakim stopniu (w skali 1 – 5) określiłaby Pani swoją aktywność fizyczną?

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Prawie brak

Bardzo duża

8. W jakim stopniu (w skali 1 – 5) określiłaby Pani swoją odporność na sytuacje stresujące?

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Bardzo mała

Bardzo duża

9. Jaki jest Pani naturalny kolor włosów?

☐ bardzo jasne lub rude

☐ blond lub jasnobrązowe

☐ ciemny blond, brązowe do kasztanowych

☐ ciemnobrązowe do czarnych

10. Jaki jest Pani kolor oczu?

☐ jasnoniebieskie

☐ ciemniejsze niebieskie, zielone lub szare

☐ jasnobrązowe, zielonobrązowe

☐ ciemnobrązowe do czarnych

11. Jaka jest Pani skóra przed opalaniem?

☐ bardzo jasna

☐ jasna, lekko zaróżowiona

12. Czy na Pani ciele występują piegi?

- ☐ tak, bardzo dużo, na całym ciele
- ☐ dużo
- ☐ w niektórych miejscach
- ☐ prawie wcale

13. Jak zachowuje się Pani skóra po kontakcie ze słońcem?

- ☐ od razu staje się czerwona, nigdy się nie opala
- ☐ często ulega „spaleniu”, brązowieje tylko w niektórych częściach ciała
- ☐ łatwo się opala, raczej w całości brązowieje, a oparzenia zdarzają się rzadko i nie są ciężkie
- ☐ szybko staje się głęboko brązowa

Kwestionariusz dotyczy badanego obszaru ciała, tzn. zewnętrznej skóry dłoni.
Odpowiadając na poniższe pytania, proszę skupić się na analizie danego obszaru.

14. Czy na badanym obszarze skóry w ciągu ostatnich 6 miesięcy stosowała Pani preparaty lecznicze?

- ☐ tak
- ☐ nie

Jeśli tak, to jakie?

.....

.....

.....

15.Czy na badanym obszarze skóry w ciągu ostatnich 6 miesięcy korzystała Pani z zabiegów w salonie kosmetycznym?

- ☐ tak
- ☐ nie

Jeśli tak, to jakich?
.....
.....

16. Czy w trakcie wykonywanej pracy codziennie przebywa Pani w rękawiczkach?

☐ tak, kilka godzin dziennie

☐ tak, okazjnie

☐ nie

17. Czy korzysta Pani codziennie z płynów do dezynfekcji/antybakteryjnych na badanym obszarze ciała?

☐ tak, kilkanaście razy dziennie

☐ tak, okazjnie

☐ nie

18. Czy korzysta Pani z lampy UV podczas manicure?

☐ tak

☐ nie

Jeśli tak, proszę określić częstotliwość:

19. Czy korzysta Pani z solarium?

☐ tak

☐ nie

Jeśli tak, proszę określić częstotliwość:
.....

20. Czy posiada Pani objawy melasmy skórnej?

☐ tak, mam dużo tego typu przebarwień

☐ tak, mam pojedyncze zmiany

☐ nie

21. Czy posiada Pani objawy bielactwa?

☐ tak, dużo tego typu przebarwień

☐ tak, pojedyncze zmiany

☐ nie

22. Jakich preparatów używa Pani do pielęgnacji badanego obszaru ciała? Proszę zaznaczyć (można wybrać więcej niż jedną odpowiedź) i określić częstotliwość stosowania:

☐ krem do rąk

☐ peeling do skóry

☐ maski

☐ serum

☐ rękawiczki pielęgnujące

☐ inne, takie jak

.....
.....

Częstotliwość stosowania:

.....
.....

23. w jakim stopniu (w skali 1 - 5) Pani skóra na badanym obszarze ciała jest wrażliwa?

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Niewrażliwa

Bardzo wrażliwa

24. Jakie czynniki powodują u Pani nadmierną reaktywność skóry? (można wybrać więcej niż jedną odpowiedź)

☐ żadne

☐ wahania temperatury

☐ wiatr

- ☐ promieniowanie słoneczne
- ☐ zanieczyszczenia powietrza
- ☐ bodźce mechaniczne (np. pocieranie)
- ☐ kosmetyki
- ☐ inne, jakie
tak.....

25. Czy stosuje Pani preparaty kosmetyczne z filtrem SPF na badanym obszarze ciała?

- ☐ tak
- ☐ nie

Jeżeli na powyższe pytanie udzieliła Pani odpowiedzi NIE, proszę pominąć pytanie 25.1. oraz 25.2.

25.1 W jakich sytuacjach używa Pani preparatów kosmetycznych z filtrem SPF na badanym obszarze ciała?

- ☐ przez cały rok
- ☐ w okresie wiosenno-letnim
- ☐ tylko w trakcie opalania
- ☐ podczas stosowania lampy UV przy manicure

25.2 W jakim przedziale mieści się wartość SPF stosowanych przez Panią preparatów?

- ☐ mniej niż 15
- ☐ 15 – 30
- ☐ 30 – 50
- ☐ 50+

26. W jaki sposób (stopień łatwości w skali 1 – 5) opala się Pani skóra na badanym obszarze ciała bez zastosowania preparatu kosmetycznego z filtrem SPF?

- ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

Wcale się nie opala

Zawsze mocno się opala

27. W jaki sposób reaguje Pani skóra na badanym obszarze ciała na zbyt długi kontakt ze słońcem bez zastosowania preparatu kosmetycznego z filtrem SPF? (można wybrać więcej niż jedną odpowiedź)?

- ☐ zaczerwienieniem
- ☐ oparzeniami
- ☐ łuszczeniem się skóry
- ☐ brak jakichkolwiek zmian

28. Jak często występują u Pani oparzenia będące wynikiem ekspozycji na słońce bez zastosowania preparatu kosmetycznego z filtrem SPF?

- ☐ prawie zawsze
- ☐ często
- ☐ rzadko
- ☐ nigdy

MATERIAŁY INFORMACYJNE DLA PROBANTÓW

BIORĄCYCH UDZIAŁ w BADANIU APLIKACYJNYM

CEL BADANIA

Celem przeprowadzanego badania jest określenie skuteczności działania i sprawdzenie stanu skóry dłoni po aplikacji następujących kosmetyków:

1. Preparat nr 1
2. Preparat nr 2
3. Preparat nr 3

CZAS TRWANIA BADANIA

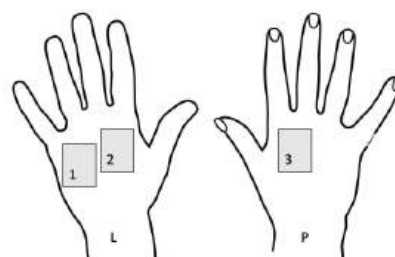
8 tygodni

SPOSÓB PRZEPROWADZENIA BADANIA

Przed pierwszą aplikacją testowanych kosmetyków przeprowadzona zostanie ocena stanu skóry, z wykorzystaniem nieinwazyjnych metod badania, za pomocą specjalistycznej aparatury pomiarowej firmy Courage&Khazaka Electronic GmbH (Niemcy) połączonej z sondami do pomiaru transepidermalnej utraty wody (tewametr), nawilżenia (korneometr) oraz zawartości melaniny i hemoglobiny (meksametr/kolorymetr). Następnie zostaną wyznaczone parametry topografii skóry tj. szorstkość, gładkość, złuszczenie oraz zostanie wykonana makrorzeźba skóry, na której podstawie możliwe jest oznaczenie całkowitej powierzchni zmarszczek, średniej długości oraz głębokości zmarszczek. Proband poproszony zostanie o wypełnienie kwestionariusza dotyczącego, m.in. jego nawyków pielęgnacyjnych, problemów skórnych oraz ogólnego stanu zdrowia.

ZASADY APLIKACJI:

Otrzymany preparat w strzykawce o objętości 1 mL należy codziennie wieczorem umieścić w miejscu aplikacji na zewnętrznej części dłoni w ilości odpowiadającej **jednej jednostce umownej na skali strzykawki**.



Preparat nr 1 nakładamy na lewą połowę lewej dłoni.

Preparatnr 2 nakładamy na prawą połowę lewej dłoni.

Preparat nr 3 nakładamy na lewą połowę prawej dłoni.

W trakcie trwania badań aplikacyjnych, przeprowadzona zostanie ocena kondycji skóry po pierwszym tygodniu, miesiącu i dwóch miesiącach z użyciem ww. aparatury. Spotkania odbywać się będą w terminach dogodnych dla probanta, ustalonych w porozumieniu z osobą przeprowadzającą badania.

Po zakończeniu badań, przeprowadzone zostanie badanie ankietowe, dotyczące subiektywnej oceny testowanych kosmetyków oraz końcowa ocena stanu skóry z wykorzystaniem aparatury pomiarowej.

Podczas trwania badania probant zobowiązany jest do:

- regularnego stosowania badanych preparatów przez okres 8 tygodni (zgodnie z określonymi zasadami aplikacji),
- niestosowania w tym czasie w miejscu aplikacji testowanych kosmetyków (skóra dłoni) innych produktów o identycznym lub analogicznym przeznaczeniu,
- natychmiastowego przerwania stosowania preparatów, w przypadku wystąpienia jakichkolwiek objawów podrażnienia i zgłoszenia ich do osoby przeprowadzającej badania,
- obserwacji właściwości użytkowych testowanych.

Załącznik 6

ANKIETA**SUBIEKTYWNA OCENA TESTOWANYCH PRODUKÓW**

Proszę ocenić w skali od „0” do 5, gdzie „0” to ocena najslabsza, a 5 to ocena najlepsza, wrażenia sensoryczne testowanych KOSMETYKÓW

1.	Zapach preparatu	0	1	2	3	4	5
	UWAGI:						
2.	Konsystencja preparatu	0	1	2	3	4	5
	UWAGI:						
3.	Kolor (barwa) preparatu	0	1	2	3	4	5
	UWAGI:						
4.	Łatwość aplikacji oleożelu	0	1	2	3	4	5
	UWAGI:						
5.	Rozprowadzanie oleożelu na skórze	0	1	2	3	4	5
	UWAGI:						
6.	Szybkość wchłaniania oleożelu	0	1	2	3	4	5
	UWAGI:						
7.	Uczucie wygładzonej skóry po zastosowaniu oleożelu	0	1	2	3	4	5
	UWAGI:						
8.	Poprawa kolorytu skóry po zastosowaniu oleożelu	0	1	2	3	4	5
	UWAGI:						
9.	Rozjaśnienie przebarwień	0	1	2	3	4	5
	UWAGI:						
10.	Wydajność oleożelu	0	1	2	3	4	5
	UWAGI:						