



ROZPRAWA DOKTORSKA

Opracowanie produktów kosmetycznych z wykorzystaniem cząsteczki retinolu oraz odpowiednio dobranej peptydu do pielęgnacji skóry z problemami trądzikowymi, z niedoskonałościami oraz skóry starzejącej się

Development of cosmetic products using retinol molecule and appropriately selected peptide for the care of skin with acne problems, skin with imperfections and aging skin

mgr inż. Małgorzata Pawłowska

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

Promotor: prof. dr hab. Izabela Nowak

Promotor pomocniczy: dr Marta Marzec

Opiekun naukowy ze strony firmy Dottore Polska Sp. z o.o., w której realizowany był doktorat wdrożeniowy: lek. med. Waldemar Jankowiak

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	1
ŻYCIORYS NAUKOWY	2
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	4
KONFERENCJE NAUKOWE	5
STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU POLSKIM	8
STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU ANGIELSKIM	9
I. WSTĘP	10
II. CZĘŚĆ LITERATUROWA	12
1. Transport substancji aktywnych przez skórę	12
1.1. Rodzaje transportu	12
1.2. Nanocząstki lipidowe jako nośniki substancji aktywnych	14
1.2.1. Stałe nanocząstki lipidowe (SLN) – definicja, typy, właściwości, zastosowanie	14
1.2.2. Nanostrukturalne cząstki lipidowe (NLC) – definicja, typy, właściwości, zastosowanie	15
1.2.3. SmartLipids®	16
1.2.4. Stałe nanocząstki lipidowe (SLN) w kosmetyce	16
1.2.5. Metody otrzymywania SLN	17
2. Retinol [D1]	18
2.1. Budowa chemiczna i podział retinoidów	19
2.2. Metabolizm i szlak przemian retinoidów	20
2.3. Działanie na skórę	22
2.4. Wady i przeciwwskazania	23
2.5. Retinoidy w produktach kosmetycznych	23
2.6. Retinol w nośnikach lipidowych	24
3. Peptyd [D2]	26
3.1. Budowa chemiczna i podział peptydów	26
3.2. Podział peptydów stosowanych w kosmetyce	26
3.2.1. Neuropeptydy	27
3.2.1.1. Penta peptyd-18 – właściwości	27
3.2.2. Peptydy sygnałowe	28
3.2.3. Peptydy transportujące	28
3.3. Wpływ peptydów na skórę	29
3.4. Peptydy w produktach kosmetycznych	30
3.5. Peptydy w nośnikach lipidowych	31
III. CEL PRACY	33

IV. CZĘŚĆ BADAWCZA	34
4. Optymalizacja stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych retinolem i oligopeptydem – skład, metoda otrzymywania [D3]	34
4.1. Odczynniki chemiczne	34
4.2. Metoda otrzymywania SLN	34
4.3. Optymalizacja składu SLN [D3]	35
4.4. Stabilność SLN	41
4.5. Badanie pH SLN	42
4.6. Charakterystyka SLN – pozostałe parametry [D3]	43
5. Nośniki lipidowe inkorporowane retinolem i peptydem w produkcie kosmetycznym [D4]	45
5.1. Produkty kosmetyczne – preparatyka.....	45
5.2. Badania fizykochemiczne produktów kosmetycznych	47
5.2.1. Badanie pH produktu kosmetycznego	47
5.2.2. Badanie stabilności masy kosmetycznej – TurbiScan®	48
5.3. Badanie efektywności działania produktów kosmetycznych (<i>in vivo</i>)	54
5.3.1. Poziom nawilżenia skóry i przeznaskórkowej utraty wody	55
5.3.2. Elastyczność skóry	58
5.3.3. Poziom sebum (grupa AC).....	60
5.3.4. Parametry makrorzeźby skóry	61
5.3.5. Parametry topografii skóry (grupa EYE)	62
5.4. Sprawozdanie z badań aplikacyjnych subiektywnych	63
5.5. Wdrożenie gotowych produktów kosmetycznych na rynek.....	63
5.5.1. Przekaz marketingowy	63
5.5.2. Gotowe produkty kosmetyczne	64
V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	68
VI. CYTOWANA LITERATURA	69
OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI	77
PRZEDRUK PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE	93
DOKUMENTY ZŁOŻONE DO KOMISJI BIOETYCZNEJ	150
ZAŁĄCZNIK 1.	150
ZAŁĄCZNIK 2.	151
SPRAWOZDANIA Z TESTÓW APLIKACYJNYCH	153
ZAŁĄCZNIK 3.	153
ZAŁĄCZNIK 4.	161
ZAŁĄCZNIK 5.	169

WYKAZ SKRÓTÓW

SKRÓT	WYJAŚNIENIE SKRÓTU
AA	anti-aging
AAB	anti-aging BASE
AAN	anti-aging NANO
AC	anti-acne
ACB	anti-acne BASE
ACN	anti-acne NANO
CIR	Przegląd Składników Kosmetycznych (ang. <i>Cosmetic Ingredient Review</i>)
CTAB	bromek cetylotrimetyloamoniowy
DSC	skaningowa kalorymetria różnicowa (ang. <i>differential scanning calorimetry</i>)
EYEB	anti-aging eye BASE
EYEN	anti-aging eye NANO
FDA	Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
GRAS	ogólnie uznane za bezpieczne (ang. <i>Generally Recognized as Safe</i>)
HPH	homogenizacja wysokociśnieniowa (ang. <i>high pressure homogenization</i>)
HSH	homogenizacja wysokoobrotowa (ang. <i>high shear homogenization</i>)
INCI	system nazewnictwa składników kosmetyków (ang. <i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>)
IU	jednostki międzynarodowe (ang. <i>international unit</i>)
IUBMB	Międzynarodowa Unia Biochemii i Biologii Molekularnej (ang. <i>International Union of Biochemistry i Molecular Biology</i>)
IUPAC	Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (ang. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LN	nanocząstki lipidowe (ang. <i>lipid nanoparticles</i>)
MLS	wielokrotne rozpraszanie światła (ang. <i>multiple light scattering</i>)
NLC	nanostrukturalne nośniki lipidowe (ang. <i>nanostructured lipid carriers</i>)
PdI	współczynnik polidispersyjności (ang. <i>polydispersity index</i>)
R2	współczynnik elastyczności ogólnej
RBP	białko wiążące retinol (ang. <i>retinoid binding proteins</i>)
SCCS	Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów (ang. <i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>)
SLN	stałe nanocząstki lipidowe (ang. <i>solid lipid nanoparticles</i>)
SNAP-25	białko biorące udział w uwalnianiu neuroprzekaźników (ang. <i>SyNaptosome-Associated Protein, 25kDa</i>)
SNARE	białko transbłonowe (ang. <i>SNAP receptors – Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor</i>)
TEWL	transepidermalna utrata wody (ang. <i>transepidermal water loss</i>)
TSI	wskaźnik stabilności (ang. <i>Turbiscan stability index</i>)
XRD	dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (ang. <i>X-ray diffraction</i>)
Z-Ave	średnia wielkość hydrodynamiczna cząstek (ważona intensywnością) (ang. <i>Z-Average, average particle size Z</i>)
ZP	potencjał zeta (ang. <i>zeta potential</i>)
ΔBS	światło wstecznie rozproszone (ang. <i>backscattering light</i>)



ŻYCIORYS NAUKOWY

W czerwcu 2005 r. obroniłam tytuł magistra inżyniera na Wydziale Rolniczym Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu. Moim promotorem była dr hab. Stanisława Szczepaniak.

W grudniu 2009 r. ukończyłam półtoraroczne studia podyplomowe w Wyższej Szkole Zdrowia, Urody i Edukacji w Poznaniu, na kierunku kosmetologia – specjalizacja: kosmetologia i marketing produktu kosmetycznego. Natomiast w czerwcu 2017 r. zaliczyłam roczne studia podyplomowe na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – specjalizacja: badania kliniczne i biomedyczne badania naukowe.

W październiku 2020 r. rozpoczęłam studia doktoranckie na Wydziale Chemii UAM Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, w Zakładzie Chemii Stosowanej. Studia te, w formie doktoratu wdrożeniowego, stanowią część programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Promotorem mojej pracy została prof. dr hab. Izabela Nowak, a promotorem pomocniczym – dr Marta Marzec. Udział w projekcie umożliwiło mi pełne zatrudnienie w firmie Dottore Polska sp. z o.o. W Dottore pracuję od 10 lat, zajmuję stanowisko project managera i safety assessora. Do moich obowiązków należy: wdrażanie nowych linii produktowych na rynek polski i zagraniczny; bezpośrednia współpraca z zakładem produkcyjnym oraz monitorowanie procesów legislacyjnych dotyczących produktów kosmetycznych; toksykologiczna ocena składników formułacji kosmetycznych; ocena wyników badań mikrobiologicznych, dermatologicznych i aplikacyjnych oraz badań stabilności i kompatybilności wyrobów kosmetycznych.

Ze środowiskiem kosmetycznym jestem związana od 20 lat. W tym czasie brałam udział w licznych szkoleniach i kongresach, podczas których pełniłam różne funkcje: słuchacza, prelegenta i szkoleniowca. Swoje kwalifikacje rozwijałam m.in. podczas następujących wydarzeń:

- MS Spectrum, warsztaty online: „Spektroskopia w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym”;
- Büchi Labortechnik AG: „Chromatography masterclass – Detection Methods: How to purify, concentrate & formulate proteins and peptides”;
- Eprus: „Urządzenie Courage + Khazaka w badaniu skóry i potwierdzaniu deklaracji marketingowych”.

Dzięki szkoleniom rozwijałam także umiejętności stosowania narzędzi takich jak: baza Scopus, Reaxys Medicinal Chemistry, Marvin JS czy SciVal.

Ukończyłam również 17 kursów związanych z branżą kosmetyczną, w tym:

- „Wymagania dobrej praktyki produkcyjnej dla dużych i małych firm kosmetycznych zgodnie z wytycznymi normy PN EN ISO 22716:2009”;
- „Zmiany w CLP. Wprowadzenie nowej klasy zagrożeń – konsekwencje dla branży kosmetycznej. Ocena bezpieczeństwa kosmetyków w świetle aktualnych wymagań prawnych”;
- „Kongres Bezpieczeństwa Produktów Kosmetycznych i Chemii Gospodarczej”.

Jestem autorką 4 publikacji w czasopismach z listy czasopism punktowanych przez MNiSW (wyszczególnione w kolejnym podrozdziale) oraz 2 publikacji w niepunktowanych czasopismach komercyjnych.

W trakcie studiów doktoranckich brałam udział w polskich i międzynarodowych konferencjach naukowych – wygłosiłam 9 prezentacji ustnych i uczestniczyłam w 10 sesjach posterowych.

Ponadto od wielu lat jestem aktywnym członkiem Polskiego Stowarzyszenia Przemysłu Kosmetycznego i Detergentowego oraz Polskiego Towarzystwa Chemików Kosmetologów.



PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

PRACE PRZEGLĄDOWE

- D1 Retinoidy. Chemiczna różnorodność dla zdrowia i urody /
Retinoids. Chemical diversity for health and beauty**
„PRZEMYSŁ CHEMICZNY”, 2023, 102/2, 196-206 (11)
Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak, Waldemar Jankowiak
doi: 10.15199/62.2023.2.8 (IF = 0.3, MNiSW = 100)
- D2 Peptydy w nośnikach lipidowych i ich zastosowanie w produktach kosmetycznych /
Peptides in lipid carriers and their application in cosmetic product**
„CHEMIK” 2/2024 tom 73, 114-118 (5)
Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak
doi: 10.15199/4.2024.2.3 (MNiSW = 20)

PRACE EKSPERYMENTALNE

- D3 Solid Lipid Nanoparticles Incorporated with Retinol and Pentapeptide-18—
Optimization, Characterization, and Cosmetic Application**
“INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES” 2024, 25, 10078
Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Waldemar Jankowiak, Izabela Nowak
doi: 10.3390/ijms251810078 (IF = 4.9, MNiSW = 140)
- D4 Retinol and Oligopeptide-loaded Lipid Nanocarriers as Effective Raw Material in Anti-
acne and Anti-aging Therapies**
„LIFE” 2024, 14 (10), 1212
Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Waldemar Jankowiak, Izabela Nowak
doi: 10.3390/life14101212 (IF = 3.2, MNiSW = 70)



KONFERENCJE NAUKOWE

KONFERENCJE MIĘDZYNARODOWE – WYSTĄPIENIA USTNE

- 1. *Conjugate of retinol and retinoic acid. A border perspective on retinoids therapy***
Małgorzata Pawłowska, Waldemar Jankowiak, Marta Dąbrowska, Izabela Nowak
6th Polish-Kazakh Meeting, 23.11.2020, Poznań
- 2. *10 kwasów chemicznych na 10 problemów skóry. Możliwości i ograniczenia***
Małgorzata Pawłowska
III Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Szkoleniowa, 15.10.2021, Poznań

KONFERENCJE MIĘDZYNARODOWE – POSTERY

- 3. *Retinoids – structure, metabolism and mechanism of action in the cell***
Małgorzata Pawłowska, Waldemar Jankowiak, Marta Dąbrowska, Izabela Nowak
7th Polish-Kazakh Meeting, 6.07.2021, Poznań
- 4. *Retinoids – biological activity and chemical metabolism effects of vitamin A in the cell and on human skin***
Małgorzata Pawłowska, Waldemar Jankowiak, Marta Marzec, Izabela Nowak
Compass: the future of interdisciplinary science, 20.09.2021, Poznań
- 5. *Retinoids therapy – current use and future potential role***
Małgorzata Pawłowska, Waldemar Jankowiak, Marta Marzec, Izabela Nowak
Natural Cosmetics International Meeting, 22–24.09.2021, Rzeszów
- 6. *Solid lipid nanoparticles (SLN) the carriers of hydrophilic and lipophilic substances***
Małgorzata Pawłowska, Waldemar Jankowiak, Marta Marzec, Izabela Nowak
8th Polish-Kazakh Meeting, 7.07.2022, Poznań
- 7. *The method of solid lipid particles (SLN) incorporation of with the use of lipophilic and hydrophilic substances in cosmetic product formulation***
Małgorzata Pawłowska, Waldemar Jankowiak, Marta Marzec, Izabela Nowak
9th Polish-Kazakh Meeting, 27.06.2023, Poznań
- 8. *Testing of cosmetic products designed for various purposes – a brief overview of available analytical methods***
Marta Marzec, Małgorzata Pawłowska, Aleksandra Skoczeń, Bartosz Woźniak, Agata Wawrzyńczak, Izabela Nowak
5th International Congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry,
04-07.03.2024, Antalya – Turcja

9. *Therapeutic efficacy of a cosmetic product containing retinol-based lipid carriers (SLN) incorporated with an oligopeptide*

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak
10th Polish-Kazakh Meeting, 26 czerwiec 2024, Poznań

KONFERENCJE KRAJOWE – WYSTĄPIENIA USTNE

10. *Retinoidy w nowoczesnej kosmetyce*

Małgorzata Pawłowska, Waldemar Jankowiak, Marta Marzec, Izabela Nowak
XIV Konferencja „Chemia w służbie kosmetyki”, 27.04.2022, Poznań

11. *Nanocząstki lipidowe – nowoczesna metoda dostarczania substancji aktywnych do skóry*

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak
Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne”,
15-16.11.2022, Lublin

12. *Nanocząstki lipidowe przyszłością nowoczesnego kosmetyku*

Małgorzata Pawłowska
XV Konferencja „Chemia w służbie kosmetyki”, 26.04.2023, Poznań

13. *Nanocząstki lipidowe jako nośniki substancji aktywnych w produktach kosmetycznych*

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak
XVI Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, 29–30.06.2023 Toruń

14. *Nanocząstki lipidowe jako nośniki substancji aktywnych*

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec
XVI Konferencja „Chemia w służbie kosmetyki”, 19.03.2024, Poznań

15. *Badanie stabilności nanocząstek lipidowych (SLN) inkorporowanych substancjami aktywnymi stosowanymi w przemyśle kosmetycznym*

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak
Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Zrównoważony rozwój w obszarze kosmetyków i detergentów”, 12.04.2024, Kędzierzyn-Koźle

16. *Wpływ substancji chemicznych stosowanych w produktach kosmetycznych na środowisko wodne Arktyki, na przykładzie biodegradowalnych nanocząstek lipidowych oraz mikroplastików*

Małgorzata Pawłowska
IV Konferencja „Krajobrazy polarne w warunkach zmian klimatu” – 27.07–4.08.2024
Spitsbergen Środkowy

KONFERENCJE KRAJOWE – POSTERY

17. *Lipidy jako surowiec do produkcji nanocząstek lipidowych*

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak

Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne”,

15–16.11.2022, Lublin

18. *Nanocząstki lipidowe (SLN) inkorporowane substancjami aktywnymi jako metoda zwiększająca skuteczność działania produktów kosmetycznych*

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak

Ogólnopolska konferencja doktorantów nauk ścisłych i przyrodniczych „Bio-Idea 4.0”,

3.02.2024, Lublin

19. *Stale nanocząstki lipidowe inkorporowane retinolem i pentapeptydem jako składniki półstałych form kosmetycznych*

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak

66. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 15–20.09.2024, Poznań



STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU POLSKIM

Dynamiczny rozwój przemysłu kosmetycznego oraz oczekiwania konsumentów spowodowały wzrost zapotrzebowania na skuteczne i nowoczesne rozwiązania w zakresie dostarczania substancji aktywnych przez warstwy naskórka. Wykorzystanie stałych nanocząstek lipidowych (ang. *solid lipid nanoparticles*, SLN) enkapsulowanych związkami czynnymi, takimi jak retinol oraz peptyd, jest sposobem na efektywną penetrację związków do głębszych warstw naskórka. Synergistyczne działanie związków bioaktywnych inkorporowanych w nośniki lipidowe wpływa na regulację licznych procesów w skórze przy zastosowaniu minimalnych działających dawek.

Głównym celem badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie metody otrzymywania SLN inkorporowanych retinolem i oligopeptydem oraz ocena właściwości aplikacyjnych produktów kosmetycznych zawierających te cząstki.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnego tematycznie cyklu czterech artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym z listy MNiSW. Dwa pierwsze artykuły przedstawiono w formie przeglądu literatury – na podstawie kilkudziesięciu źródeł – na temat retinolu i peptydów: ich budowy chemicznej, sposobu działania i funkcji w skórze oraz właściwości i wpływu na skórę, a także na temat zastosowania tych związków w produktach kosmetycznych i farmaceutycznych w formie nanocząstek lipidowych. W trzecim artykule szczegółowo omówiono metodykę otrzymywania SLN enkapsulowanych retinolem i pentapeptydem-18. Natomiast w ostatniej publikacji opisano wpływ produktów kosmetycznych zawierających opracowaną dyspersję SLN na skórę, na podstawie badań *in vivo*.

W toku przeprowadzonych badań zoptymalizowano skład SLN inkorporowanych retinolem i oligopeptydem oraz potwierdzono stabilność badanych dyspersji, uwzględniając podstawowe parametry fizykochemiczne: średnią wielkość cząstek (Z-Ave), współczynnik polidispersyjności (Pdl) oraz potencjał zeta (ZP). Następnie metodę produkcji SLN przeniesiono z laboratorium na skalę produkcyjną. W kolejnym etapie opracowano trzy produkty kosmetyczne – o właściwościach przeciwstarzeniowych, przeciwtrądzikowych oraz do pielęgnacji oczu – w których składzie zastosowano zoptymalizowaną dyspersję nanocząstek lipidowych. Stabilność otrzymanych produktów kosmetycznych została potwierdzona z wykorzystaniem metody wielokrotnego rozpraszania światła, natomiast ich skuteczność działania na skórę w zakresie poprawy elastyczności skóry, zmniejszenia widoczności zmarszczek oraz wzmocnienia funkcji sebo regulacyjnej zweryfikowano w toku badań *in vivo* z udziałem ochotników.



STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU ANGIELSKIM

The dynamic development of the cosmetic industry and consumer expectations have increased the demand for effective and modern solutions in the delivery of active substances through the epidermal layers. The use of solid lipid nanoparticles (SLN) encapsulated with active compounds, such as retinol and peptide, is a way to effectively penetrate the compounds into the deeper layers of the epidermis. The synergistic action of bioactive compounds incorporated into lipid nanocarriers affects the regulation of numerous processes in the skin with minimal-acting doses.

The main objective of the research carried out within the framework of this doctoral dissertation was to develop a method for obtaining SLNs incorporated with retinol and oligopeptide and to evaluate the application properties of cosmetic products containing them.

The dissertation was prepared in the form of a thematically coherent series of four articles published in scientific journals from the Ministry of Science and Higher Education list. The first two articles take the form of a literature review – based on dozens of sources – on retinol and peptides: their chemical structure, mode of action and function in the skin, and properties and effects on the skin, as well as on the use of these compounds in cosmetic and pharmaceutical products in the form of lipid nanoparticles. The third article details the methodology for obtaining SLN encapsulated with retinol and pentapeptide-18, while the last article describes the effects of cosmetic products containing the developed SLN dispersion on the skin, based on *in vivo* studies.

In the course of the research, the composition of SLNs incorporated with retinol and oligopeptide was optimized and the stability of the tested dispersions was confirmed, taking into account the basic physicochemical parameters – mean particle size (Z-Ave), polydispersity index (PDI) and zeta potential (ZP). The SLN production method was then transferred from the laboratory to the production scale. In the next stage, three cosmetic products, with anti-aging, anti-acne, and eye care properties, were developed using an optimized dispersion of lipid nanoparticles in their formulation. The stability of the obtained cosmetic products was confirmed using the multiple light scattering method, while their efficacy on the skin was verified in the course of *in vivo* studies with volunteers – in terms of improving skin elasticity, reducing the appearance of wrinkles, and enhancing seboregulatory function.



I. WSTĘP

Rynek kosmetyczny jest jednym z najdynamiczniej rozwijających się sektorów gospodarki. W 2022 r. odnotował prawie 17-procentowy wzrost światowej sprzedaży [1]. Także w Polsce z roku na rok rośnie zainteresowanie zarówno krajowymi, jak i zagranicznymi produktami kosmetycznymi, co przyczynia się do nieustannego rozwoju branży. W 2022 r. Polska zajmowała 14. miejsce na liście eksporterów kosmetyków na świecie, z udziałem na poziomie 2,7% [1]. Wzrost ten jest napędzany przez kilka kluczowych czynników, takich jak rosnąca świadomość konsumentów dotycząca pielęgnacji urody, innowacje technologiczne oraz zmieniające się trendy i preferencje konsumenckie. W ostatnich latach coraz wyraźniej widoczna jest koncepcja „czystego piękna” [1]. Jest to wieloaspektowy trend obejmujący kwestie etyczne (zakaz testowania produktów kosmetycznych na zwierzętach), ekologiczne (zrównoważone procesy technologiczne oraz surowce kosmetyczne bezpieczne dla środowiska i zdrowia człowieka) oraz ustawodawcze (ciągłe modyfikacje unijnych zagadnień legislacyjnych).

Zmieniające się preferencje konsumenckie mają ogromny wpływ na kształtowanie rynku kosmetycznego. Klienci zwracają większą uwagę na skład produktów kosmetycznych, ich pochodzenie oraz etyczność produkcji. Trendy takie jak minimalizm w pielęgnacji (tzw. *skin minimalism*) oraz personalizacja kosmetyków zyskują na znaczeniu. Producenci starają się odpowiadać na potrzeby różnych grup konsumentów poprzez oferowanie produktów dostosowanych do poszczególnych typów skóry, problemów skórnych oraz wieku. *Skin minimalism* to nie tylko zdrowa i piękna skóra pielęgnowana mniejszą liczbą produktów. To także ograniczenie liczby używanych kosmetyków do absolutnego minimum, skoncentrowanie się na wielofunkcyjnych produktach oraz na nawykach wspierających naturalne funkcje skóry. Zwolennicy tego trendu uważają, że „mniej znaczy więcej” – również pod względem liczby składników aktywnych w preparatach kosmetycznych. Konsekwencją jest ograniczenie stosowanych kosmetyków do tych o krótszym składzie INCI (ang. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*), ale bogatszym pod względem zawartych substancji czynnych.

W branży kosmetycznej występuje także inny trend: holistyczne dbanie o wygląd i kondycję skóry. To wiele jednoczesnych działań – przede wszystkim wspieranie i ochrona naturalnej bariery naskórka, wspomaganie mikrobiomu, wzmacnianie włókien skóro-naskórkowych odpowiedzialnych za elastyczność skóry oraz odbudowa i regeneracja skóry właściwej. W takim przypadku istotne będą: odpowiedni dobór zastosowanych związków aktywnych oraz forma fizykochemiczna kosmetyku. Spełnianie oczekiwań konsumenta oraz efektywność produktu kosmetycznego to kluczowe aspekty wzrostu zainteresowania i chęci zakupu.

Rynek kosmetyczny w Polsce podlega ścisłym regulacjom prawnym, które mają na celu zapewnienie bezpieczeństwa i jakości produktów kosmetycznych. Normy te są zgodne z wytycznymi Unii Europejskiej, co dodatkowo wpływa na wysoką jakość oferowanych

kosmetyków. Producentom narzuca się obowiązek dokładnego testowania produktów kosmetycznych przed ich wprowadzeniem na rynek oraz transparentnego informowania konsumentów o składzie i działaniu preparatów. Często wprowadzane obostrzenia i zakazy w stosowaniu związków chemicznych, a także zmniejszanie dozwolonych wartości stężeń tychże substancji, stanowią znaczące ograniczenia dla producentów. Celem zachowania skutecznego działania i bezpieczeństwa kosmetyków producenci sięgają po wykorzystanie nowych rozwiązań w procesach technologicznych. Efektywne uwalnianie substancji aktywnych z formułacji kosmetycznych oraz możliwość modulacji ich przenikania przez barierę naskórkową to jedne z istotniejszych wyzwań dzisiejszej kosmetyki. Na potrzeby te doskonale odpowiadają lipidowe systemy nośnikowe, stosowane w przemyśle farmaceutycznym od lat 90. XX wieku, stwarzające doskonałe możliwości w zakresie zastosowania ich w produktach kosmetycznych do aplikacji miejscowej. Nanocząstki lipidowe zasługują na szczególną uwagę pod względem ich wykorzystania jako nośników transdermalnych – dotyczy to m.in. stałych nanocząstek lipidowych (ang. *solid lipid nanoparticles*, SLN). Specyfika ich syntezy pozwala na zastosowanie biokompatybilnych ze skórą i nietoksycznych związków chemicznych, umożliwiających skuteczniejszą penetrację przez warstwy naskórka. Ponadto zapewnia ochronę składników aktywnych przed czynnikami zewnętrznymi (takimi jak promieniowanie UV i tlen) oraz przedłużone uwalnianie enkapsulowanych związków czynnych w czasie.

Badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej stanowiły próbę stworzenia serii formułacji kosmetycznych o działaniu *anti-aging* (przeciwstarzeniowym) oraz *anti-acne* (przeciwtrądzikowym), zawierających jako substancje aktywne retinol oraz oligopeptyd inkorporowane do stałych nanocząstek lipidowych. Takie rozwiązanie doskonale wpisuje się w opisane powyżej trendy skin minimalizmu oraz holistycznej pielęgnacji skóry. Retinol, jako czynnik odpowiedzialny za proces regulacji i poprawy kondycji naskórka, oddziałuje na tempo procesu keratynizacji – przyspiesza je. Retinoid ten reguluje także pracę gruczołów łojowych i melanocytów (komórek barwnikowych skóry). Zwiększa syntezę kolagenu i elastyny, przez co wpływa na poprawę architektury głębszych warstw naskórka i skóry właściwej. Podobne właściwości ma zastosowany oligopeptyd, który ponadto odgrywa znaczącą rolę w procesie syntezy włókien kotwiczących pomiędzy skórą właściwą a naskórkiem. Stąd idea enkapsulacji retinolu i peptydu do SLN motywowana była zapewnieniem ich szybszej penetracji transepidermalnej oraz wydłużonego w czasie działania aktywnego.

W części doświadczalnej przeprowadzono optymalizację właściwości fizykochemicznych stałych nanocząstek lipidowych oraz zweryfikowano stabilność w czasie i w różnych temperaturach zarówno nanocząstek inkorporowanych substancjami bioaktywnymi, jak i finalnej receptury produktu kosmetycznego. Ostatecznie efektywność działania opracowanych produktów kosmetycznych potwierdziły dwumiesięczne badania *in vivo* z udziałem grupy ochotników.



II. CZĘŚĆ LITERATUROWA

1. Transport substancji aktywnych przez skórę

1.1. Rodzaje transportu

Skóra to największy ludzki organ – ma powierzchnię 1,8–2,0 m². Składa się z naskórka, ze skóry właściwej oraz z tkanki podskórnej. Pełni wiele istotnych funkcji, takich jak na przykład [2,3]:

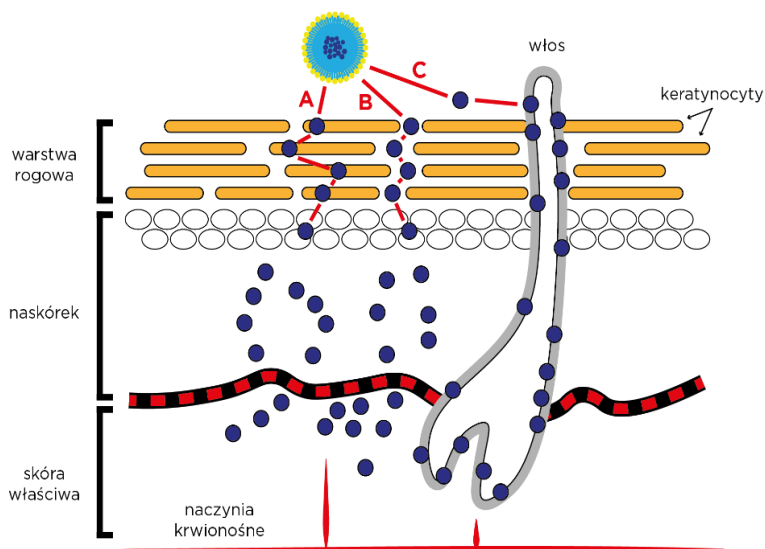
- funkcja ochronna (chroni przed wnikaniem szkodliwych substancji i drobnoustrojów oraz przed działaniem promieniowania UV i przed urazami mechanicznymi);
- funkcja termoregulacyjna (za pośrednictwem gruczołów potowych oraz rozszerzania i kurczenia naczyń krwionośnych);
- funkcja wydalnicza (usuwanie nadmiaru wody, wydalanie zbędnych produktów przemiany materii);
- funkcja wydzielnicza (wydzielanie łożu budującego warstwę hydrolipidową naskórka);
- funkcja syntetyzująca (wytwarzanie melaniny);
- odczuwanie bodźców (zmysł dotyku).

Substancje aktywne muszą wykazywać określone właściwości, aby przedostać się przez naskórek i osiągnąć działanie terapeutyczne [2,3]. Lipofilowy charakter warstwy rogowej naskórka (łac. *stratum corneum*) umożliwia penetrację przede wszystkim substancji niejonowych, lipofilowych (log P w zakresie 1–3), o niskiej masie cząsteczkowej (< 500 Da) [4]. Transdermalny transport substancji aktywnych zyskał na znaczeniu dzięki możliwości dostarczenia ich do organizmu bez obciążenia ogólnoustrojowego [3,5]. Wchłanianie substancji – zarówno terapeutycznych, jak i toksycznych – jest upośledzane przez funkcję barierową warstwy rogowej [3]. W latach 60. XX wieku zauważono, że grubość warstwy rogowej może wpływać na możliwości wchłaniania ksenobiotyków [3]. Silnie lipofilowy charakter *stratum corneum* znacząco ogranicza penetrację związków egzogennych [5].

Penetracja substancji aktywnych przez bariery naskórkowe może zachodzić na drodze dyfuzji międzykomórkowej, transportu czynnego lub za pośrednictwem nośników [6–8]. Dyfuzja zachodzi na drodze penetracji lipofilowej, z wykorzystaniem transportu przez cement komórkowy naskórka oraz poprzez penetrację hydrofilową – przez mikropory obecne w skórze. Jaworska i inni [8] zwracają uwagę, że dominującym rodzajem jest transport międzykomórkowy. Dyfuzja bierna to proces niewymagający wydatkowania energii i zachodzący zgodnie z gradientem stężeń. Czerwonka i inni [7] podkreślają, iż im lepiej rozpuszczalna w tłuszczach jest substancja, tym szybciej penetruje ona przez warstwę naskórka. Transport czynny wymaga dostarczenia energii potrzebnej do aktywacji nośnika mającego powinowactwo do przenoszonej substancji. Natomiast transport zachodzący przy udziale promotorów wchłaniania wykorzystuje mechanizmy sorpcji: podczas

przenikania do warstwy rogowej wykorzystuje zjawisko zaburzenia układu lipidów i tym samym zwiększa przepuszczalność warstwy [7].

Transport substancji bioaktywnych może się odbywać trzema drogami: poprzez struktury naskórka, tj. drogą międzykomórkową (transepidermalną), drogą przezkomórkową (transdermalną) oraz poprzez przydatki skóry, takie jak ujścia gruczołów potowych, mieszki włosowe oraz gruczoły łojowe [9] (rys. 1). Transepidermalny, czyli międzykomórkowy transport substancji bazuje na obecności płynnych i nieuporządkowanych lipidów w cemencie komórkowym warstwy rogowej, których występowanie jest kluczowe w dyfuzji cząstek o charakterze lipofilowym i amfifilowym [10]. Natomiast transport transdermalny polega na przenikaniu związków przez komórki naskórka. Zdaniem Shaikh i wsp. droga ta nie wymaga dyfuzji, dzięki obecności niewielkich kanałów transepidermalnych, dlatego jest to najskuteczniejsza droga penetracji dla substancji hydrofilowych [10].



Rysunek 1. Drogi przenikania substancji bioaktywnych przez skórę (opracowanie własne na podstawie: Kakadia [11]).

Trzecią drogą dostarczania związków bioaktywnych są przydatki skóry. Z powodu małej powierzchni całkowitej, jaką gruczoły potowe i łojowe oraz mieszki włosowe zajmują na powierzchni skóry (0,1%), skuteczność tego sposobu jest mniej znacząca [7]. Jednakże, na co zwrócili uwagę Wosicka i Cał podczas analizy profilu skóry, mieszki włosowe połączone są z naczyniami włosowatymi, natomiast ujścia gruczołów łojowych znajdują się poniżej warstwy rogowej naskórka; stąd substancje aktywne przedostają się bezpośrednio do żywych tkanek, gdzie są metabolizowane [12]. W przypadku dużych cząsteczek polarnych i związków jonowych, które z trudem przedostają się przez warstwy naskórka, sposób ten odgrywa istotną rolę [7]. Droga przez przydatki skóry może być wykorzystywana do transportu substancji aktywnych przy współdziałaniu odpowiednio dobranych nośników lipidowych, jakimi są stałe nanocząstki lipidowe (SLN). Cał i Stefanowska uważają, że największą szansę na zastosowanie w kosmetyce w postaci SLN mają właśnie te substancje, których penetracja zachodzi drogą przez mieszki włosowe [4]. W przypadku **retinolu** to transport z wykorzystaniem przydatków skóry stanowi podstawową drogę penetracji do głębszych warstw skóry [13]. Z kolei **peptydy** – związki o charakterze hydrofilowym – nie wykazują możliwości wchłaniania pasywnego przez skórę, stąd dostępność metod dostarczania związków peptydowych jest dość ograniczona [6].

1.2. Nanocząstki lipidowe jako nośniki substancji aktywnych

Nanocząstki lipidowe (ang. *lipid nanoparticles, LN*) są znane i stosowane w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym od 1991 r. [14]. Obecnie uznaje się je za jedne z najskuteczniejszych nośników substancji aktywnych. Nanocząstki lipidowe składają się z mieszaniny biokompatybilnych i biodegradowalnych lipidów. Matryca lipidowa nośników jest zdolna do inkorporacji zarówno lipofilowych, jak i hydrofilowych substancji czynnych. Ze względu na obecność dwóch niemieszalnych faz w składzie dyspersji LNs – lipidowej i wodnej – konieczne jest zastosowanie substancji powierzchniowo czynnej, czyli surfaktantu. Rodzaj uzyskanej struktury nośnikowej zależy zatem od użytego lipidu stałego/ciekłego, charakteru substancji aktywnej, surfaktantu oraz zastosowanej metody produkcji [14].

Ze względu na budowę nanocząstki lipidowe można podzielić na trzy generacje:

- **I generacja** – stałe nanocząstki lipidowe (ang. *solid lipid nanoparticles, SLN*);
- **II generacja** – nanostrukturalne nośniki lipidowe (ang. *nanostuctured lipid carriers, NLC*);
- **III generacja** – SmartLipids®.

1.2.1. Stałe nanocząstki lipidowe (SLN) – definicja, typy, właściwości, zastosowanie

Stałe nanocząstki lipidowe to struktury, których co najmniej jeden wymiar przestrzenny nie przekracza 100 nm, mające wielkość w przedziale 40–1000 nm. Należą do pierwszej generacji lipidowych nośników substancji aktywnych. Matryca SLN składa się z lipidu lub mieszaniny lipidów, do wnętrza której inkorporowana jest substancja aktywna (rys. 2). Zawartość lipidu stałego wynosi najczęściej 0,1–30% wag. dyspersji, przy czym wzrost stężenia lipidów powyżej 5% wag. powoduje zwiększenie rozmiarów otrzymywanych nanocząstek lipidowych [15]. Biodostępność lipidów stosowanych w SLN przekłada się na niskie ryzyko związane z pojawieniem się reakcji niepożądaney.

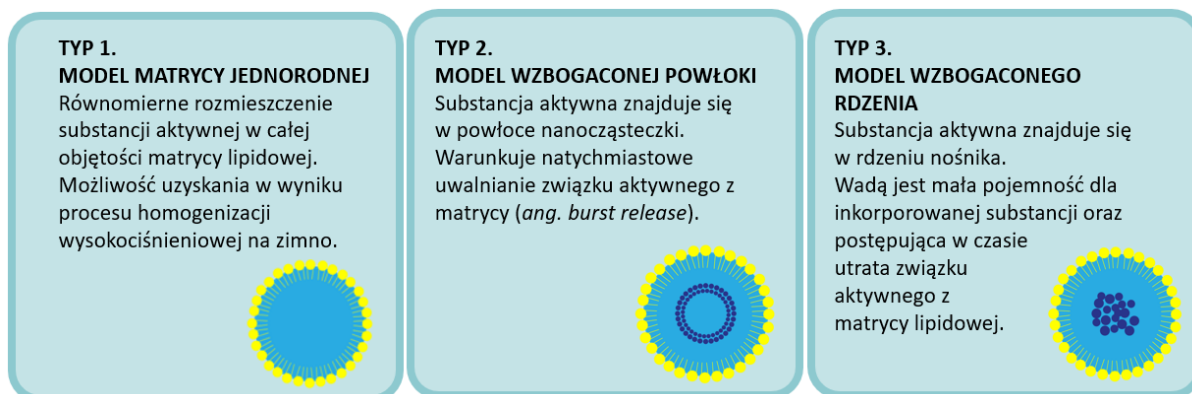


Rysunek 2. Schemat budowy dyspersji SLN (opracowanie własne).

Związki powierzchniowo czynne stanowią kluczowy element odpowiedzialny za sposób agregacji cząstek na granicy faz. W składzie dyspersji nanocząstek lipidowych uwzględnia się zazwyczaj jeden lub kilka różnych surfaktantów w ilości od 0,5% do 5,0% wag. Lista GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*) przedstawia wszystkie substancje z grupy surfaktantów i lipidów, które zostały uznane za bezpieczne do stosowania w kosmetykach, lekach i żywności. Substancje te, z powodu przynależności do lipidów

fizjologicznych (naturalnie występujących w organizmie), uznano za biokompatybilne i biodegradowalne [16].

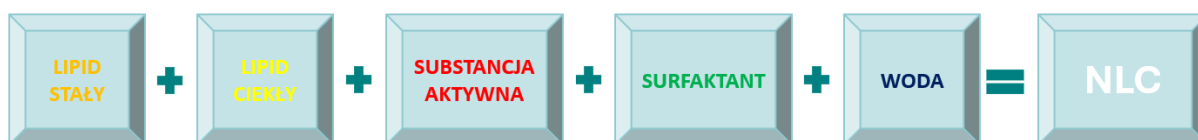
Ze względu na charakter inkorporowanej substancji aktywnej oraz na wybór metody otrzymywania nanocząstek lipidowych SLN można podzielić na trzy typy (rys. 3). Zastosowane substancje aktywne mogą być inkorporowane zarówno pomiędzy łańcuchy lipidowe, jak i do komory wodnej znajdującej się wewnątrz samego nośnika. Od charakteru enkapsulowanej substancji zależy szybkość jej uwalniania. Substancje aktywne zawarte w zewnętrznej powłoce nanocząstki wykazują tendencję do szybszego uwalniania [17].



Rysunek 3. Rozmieszczenie substancji aktywnej w SLN (opracowanie własne na podstawie: Patel i wsp. [18]).

1.2.2. Nanostrukturalne cząstki lipidowe (NLC) – definicja, typy, właściwości, zastosowanie

Drugą generację nośników lipidowych stanowią nanostrukturalne nośniki lipidowe. NLC to mieszanina lipidów stałych (podobnie jak w SLN) z lipidami ciekłymi, najlepiej w proporcjach od 70:30 do 99,9:0,1. Prócz lipidów w skład dyspersji NLC wchodzi surfaktant oraz substancja czynna i woda (rys. 4). Skład ten umożliwia zwiększenie ilości oraz stabilności inkorporowanej substancji aktywnej, a także zwiększa stabilność fizyczną dyspersji nanocząstek lipidowych [19, 20].



Rysunek 4. Schemat budowy dyspersji NLC (opracowanie własne na podstawie: Müller i Souto [21]).

NLC powstały w odpowiedzi na niedoskonałości SLN. Zostały zbudowane z biodegradowalnych i biokompatybilnych lipidów, a ich wielkość nie przekracza 200 nm. Nanostrukturalne nośniki lipidowe różnią się od stałych nanocząstek lipidowych stopniem uporządkowania oraz temperaturą topnienia niższą w porównaniu do SLN, ze względu

właśnie na obecność lipidów ciekłych. Nanostrukturalne nośniki lipidowe występują w trzech modyfikacjach (rys. 5).



Rysunek 5. Rozmieszczenie substancji aktywnej w NLC (opracowanie własne na podstawie: Müller i Souto [21] Śliwowska [22]).

1.2.3. SmartLipids®

W 2014 r. powstała nowa, trzecia generacja nanocząstek, zwana SmartLipids®. Nośniki te są połączeniem zalet wcześniejszych generacji nanocząstek lipidowych. „Chaotyczna” struktura została stworzona poprzez zmieszanie nawet do dziesięciu różnych lipidów, zarówno stałych, jak i ciekłych, co zapewniło zwiększoną pojemność ładunkową. Ulepszona została stabilność fizyczna i chemiczna, wydłużył się także czas uwalniania inkorporowanej substancji aktywnej. Nanocząstki SmartLipids® mają wielkość od kilku nanometrów do ponad 1000 nm, natomiast typowy rozmiar mieści się w przedziale 200–400 nm. Otrzymywanie dyspersji SmartLipids® jest analogiczne do nanocząstek poprzednich generacji i zachodzi 5–10°C powyżej temperatury topnienia lipidów, najczęściej z wykorzystaniem metody homogenizacji wysokociśnieniowej [23, 24].

1.2.4. Stałe nanocząstki lipidowe (SLN) w kosmetyce

Niska toksyczność, biodegradowalność i brak konieczności stosowania rozpuszczalników organicznych w przypadku SLN doskonale wpisują się w trend zrównoważonej kosmetyki i zielonej chemii, a także skin minimalizmu. Istotną zaletą stałych nanocząstek lipidowych jest łatwość przeniesienia technologii otrzymywania z procesu laboratoryjnego na skalę produkcyjną. Ponadto dzięki swojej skuteczności metoda nośnikowa umożliwia zastosowanie mniejszej ilości składników aktywnych przy zachowaniu skutecznych efektów terapeutycznych [9]. Müller i jego grupa badawcza [25] zwracają uwagę na kosmetyczne zastosowanie SLN, które stanowi obiecujący sposób dostarczania substancji aktywnych w produkcie kosmetycznym ze względu na szereg zalet wykazywanych przez nanocząstki lipidowe w porównaniu z tradycyjnymi metodami, takich jak:

- zwiększenie absorpcji substancji przez barierę naskórkową i poprawa głębokości penetracji przez skórę [9];
- zwiększenie stabilności chemicznej wprowadzanych substancji bioaktywnych [26];
- ochrona inkorporowanych substancji aktywnych (np. retinolu) przed degradacją chemiczną [17];
- możliwość kontrolowanego i przedłużonego uwalniania substancji czynnej [9, 26];
- właściwości okluzyjne samych nośników lipidowych, które powodują ograniczenie przeznaskórkowej utraty wody (ang. *transepidermal water loss*, TEWL) i wpływają korzystnie na poziom nawilżenia skóry [9, 16].

1.2.5. Metody otrzymywania SLN

Proces syntezy nanocząstek lipidowych przebiega w analogiczny sposób bez względu na ich generację [23], jednak dobór właściwej metody jest zależny od specyfiki inkorporowanej substancji aktywnej, typu nośnika lipidowego oraz docelowego sposobu uwalniania substancji bioaktywnej [19]. Dostępność różnorodnych procesów technologicznych pozwala dostosować metodologię tak, aby spełniać indywidualne wymagania substancji aktywnej inkorporowanej do matrycy lipidowej. Stałe nanocząstki lipidowe mogą być otrzymywane z wykorzystaniem różnych metod, jednak najczęściej stosowane są sposoby omówione poniżej.

Homogenizacja wysokociśnieniowa (ang. *high-pressure homogenization*, HPH)

To najskuteczniejsza i najczęściej stosowana metoda syntezy nanocząstek lipidowych. Technika ta może być wykonywana na ciepło, gdy od inkorporowanej substancji aktywnej oczekuje się natychmiastowego uwalniania, lub na zimno, jeśli enkapsulowany związek ma być uwalniany stopniowo [27, 28]. Homogenizacja wysokociśnieniowa polega na przepuszczaniu formułacji przez wąskie rurki (o średnicy kilku mikronów) pod ciśnieniem w zakresie 100–2000 barów [26]. Proces HPH może być poprzedzony wstępną homogenizacją z wykorzystaniem homogenizatora wysokoobrotowego, w wyniku czego powstaje tzw. preemulsja. Wielkość otrzymanych nośników lipidowych jest uzależniona od parametrów takich jak: zastosowane ciśnienie oraz liczba cykli HPH, a także rodzaj i zawartość lipidów stałych/ciekłych. Największą zaletę metody stanowi krótki czas produkcji oraz możliwość zastosowania jej na skalę produkcyjną [26, 29]. Natomiast wśród wad można wymienić wysoką energochłonność oraz wzrost temperatury, który może negatywnie wpłynąć na enkapsulowaną substancję aktywną [29].

Homogenizacja z wykorzystaniem homogenizatora wysokoobrotowego (ang. *high shear homogenization*, HSH)

Metoda z wykorzystaniem homogenizatora wysokoobrotowego jest powszechnie znana i bardzo często wykorzystywana do tworzenia nanocząstek lipidowych [26]. Rekomenduje się ją szczególnie w przypadku inkorporacji substancji hydrofilowych, które mają

powinowactwo do fazy wodnej surfaktantu [19]. Wykorzystanie metody bazującej na emulsji wielokrotnej (W/O/W) z użyciem homogenizatora wysokoobrotowego umożliwia otrzymanie struktur w rozmiarze około 100 nm. Wadą metody jest konieczność utrzymania wyrównanej temperatury na każdym etapie otrzymywania emulsji wielokrotnej [28]. Kontrola warunków temperaturowych jest niezbędna podczas całego procesu z powodu negatywnego wpływu ciepła na inkorporowany związek aktywny [30]. Proces HSH bardzo często łączy się z wykorzystaniem ultradźwięków lub HPH celem uzyskania korzystniejszych parametrów fizykochemicznych otrzymywanej dyspersji [27]. Traktowany jest często jako etap poprzedzający, przy pomocy którego uzyskuje się tzw. emulsję wstępną. Ma to na celu zwiększenie skuteczności i wydajności procesu syntezy nanocząstek lipidowych [5, 31].

Sonikacja / metoda z wykorzystaniem ultradźwięków

Metoda dyspersyjna przeprowadzana jest w temperaturze powyżej topnienia lipidu, kiedy to stopiony lipid dysperguje z fazą wodną zawierającą surfaktant, przy użyciu mieszadła mechanicznego. Tak otrzymaną mieszaninę poddaje się działaniu ultradźwięków. Podczas trwania procesu zmniejszana jest wielkość cząstek, przy tworzeniu dyspersji z nanocząstkami lipidowymi możliwe jest otrzymanie struktur o pożądanym rozmiarze [30]. Zaletą metody jest dostępność sprzętu laboratoryjnego, natomiast niewątpliwą wadą jest czas trwania sonikacji i zwiększone ryzyko zanieczyszczenia emulsji drobkami metali [26, 27, 30].

Metoda mikroemulsji

Mikroemulsje to układy złożone z fazy wodnej, fazy olejowej i układu surfaktantów [4]. Otrzymywanie mikroemulsji polega na rozcieńczaniu ogrzanej formułacji (powyżej temperatury topnienia zastosowanego lipidu) z zimną wodą w stosunku 1:25–1:50 podczas procesu intensywnego mieszania. Metoda charakteryzuje się niską zawartością lipidu [26] i tym samym małą pojemnością dla inkorporowanej substancji aktywnej, co może być uznawane za wadę [20]. Niewątpliwymi zaletami metody są: niska energochłonność, niskie temperatury podczas procesu wytwarzania oraz prosta procedura z wykorzystaniem ogólnodostępnego sprzętu [30].

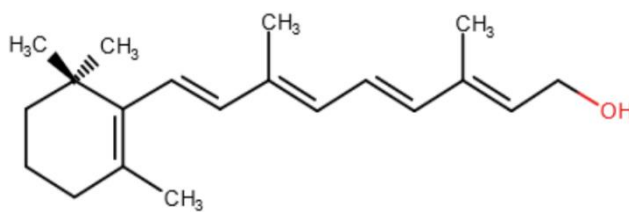
2. Retinol [D1]

W ostatnich latach można zauważyć wyraźny wzrost zainteresowania witaminą A. Związek ten nie jest nowym odkryciem – poznajemy jedynie jego nowe możliwości. To pierwsza witamina zatwierdzona przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) jako substancja wpływająca na procesy starzeniowe zachodzące na powierzchni skóry [32]. Pod nazwą zwyczajową witaminy A kryje się grupa związków chemicznych zwanych retinoidami, o analogicznej budowie oraz podobnej aktywności biologicznej [33, 34]. Ta różnorodna rodzina jest znana i doceniana od tysięcy lat. Pierwsze wzmianki o działaniu retinoidów oraz o ich użyciu pod postacią organów zwierzęcych

pochodzą z ok. 1500 r. p.n.e. Od tego okresu na osi czasu można zauważyć imponujące obserwacje, badania i analizy związków należących do rodziny retinoidów. Liczne wyniki przywiodły wiedzę do 1907 r., kiedy to McCollum udowodnił istnienie czynnika rozpuszczalnego w tłuszczach i nazwał go „czynnikiem A rozpuszczalnym w tłuszczach, w przeciwieństwie do innych czynników B rozpuszczalnych w wodzie” [35, 36]. W późniejszych latach „czynnik A” został określony mianem witaminy A. Intensywne badania nad retinoidami przyniosły dwukrotnie nagrodę Nobla – w 1929 r. otrzymał ją Frederick Hopkins, a w 1937 r. – Paul Karrer [37]. Ostateczny szlak metaboliczny i pełną syntezę chemiczną ukończył Isler z grupą współpracowników [35] w latach 1947–1948. W 1925 r. Wolbach i Howe dowiedli, że witamina A ma wpływ na proces keratynizacji nabłonka u szczurów. Kilka lat później powiązano niedobór retinoidów w skórze z dermatozami związanymi z rogowaceniem naskórka, takimi jak rybia łuska, hiperkeratoza mieszkowa, łupież pstry i choroba Dariera [38].

2.1. Budowa chemiczna i podział retinoidów

Według Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) oraz Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (ang. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, IUBMB)



Rysunek 6. Wzór strukturalny retinolu (opracowanie własne).

retinoidy to związki złożone z czterech jednostek izoprenowych o strukturze głowa – ogon [39, 40]. Cała grupa retinoidów ma strukturę cyklicznej grupy terminalnej (pierścień β -jononu) i polienowego łańcucha bocznego zakończonego grupą polarną [41] (rys. 6), która w zależności od związku może być modyfikowana. Odkąd w 1969 r. prof. Kligman zastosował retinol w leczeniu trądziku, zsyntetyzowano ponad 2500 nowych postaci związków z grupy retinoidów [42, 43]. Syntetyczne i naturalne analogi systematycznie powiększają rodzinę retinoidów, dlatego konieczne stało się usystematyzowanie jej pod względem budowy chemicznej. Wyodrębniono cztery grupy (generacje) retinoidów, omówione poniżej.

I generacja – to związki naturalne, monoaromatyczne, otrzymywane przez modyfikację grup polarnych na końcu łańcucha bocznego cząsteczki. Są związkami nieselektywnymi, w związku z tym łączą się z wieloma rodzajami receptorów retinolowych znajdujących się w skórze. Zdolność ta związana jest z elastycznością polienowego łańcucha bocznego [33]. Do tej grupy zaliczamy retinol, aldehyd retinowy (retinal) oraz izomery kwasu retinowego (izotretynoinę, tretynoinę) [41, 44]. Związki z tej generacji wykazują szeroki zakres aktywności w leczeniu różnych postaci trądziku i jako jedyne działają przeciwstarzeniowo poprzez stymulowanie syntezy kolagenu i elastyny oraz regulowanie procesu odnowy komórek naskórka [42].

II generacja – to syntetyczne, monoaromatyczne analogi retinolu. W budowie tych substancji pierścień cykloheksenowy zastąpiony jest pierścieniem benzenowym [41, 44]. Do grupy należą m.in. acytretyna i motretynid. Związki te wykorzystujemy do leczenia m.in. łuszczycy oraz choroby Dariera [45].

III generacja – to retinoidy o poliaromatycznej budowie, zwane arotinoidami. Podobnie jak związki II generacji, są to substancje syntetyczne. Do grupy można zaliczyć: adapalen, tazaroten i beksaroten. Tazaroten wykorzystywany jest w terapiach łuszczycy [42] i w leczeniu trądziku [46]. Związki te mają mniej elastyczne struktury i w związku z tym wykazują większą selektywność wobec właściwych sobie receptorów znajdujących się w skórze [33, 41, 44].

IV generacja – to retinoidy uwzględniane w niektórych zestawieniach. Stanowią pochodne pironu i są reprezentowane przez trifaroten oraz seletinoid G. Trifaroten stosowany jest do leczenia trądziku pospolitego. Ma także działanie komedolityczne oraz depigmentacyjne. Seletinoid G natomiast wzmacnia syntezę prokolagenu typu I, tropoelastyny i fibryny-1, a także redukuje aktywność metaloproteinazy 1 (MMP-1) w skórze, wpływając tym samym na zmniejszenie zmian związanych z fotouszkodzeniami zachodzącymi w skórze [47].

Baumann uważa, że kolejne generacje retinoidów powstawały w wyniku modyfikacji szkieletu kwasu retinowego. Dzięki temu retinoidy III generacji są bardziej fotostabilne w porównaniu z cząsteczkami retinoidów I i II generacji oraz wykazują znacznie mniejszy potencjał drażniący [48]. Z kolei substancje z generacji IV nie wykazują działania drażniącego, natomiast działają przeciwzapalnie [47].

2.2. Metabolizm i szlak przemian retinoidów

Szczegółowy przebieg przemian metabolicznych retinoidów w skórze został opisany w artykule:

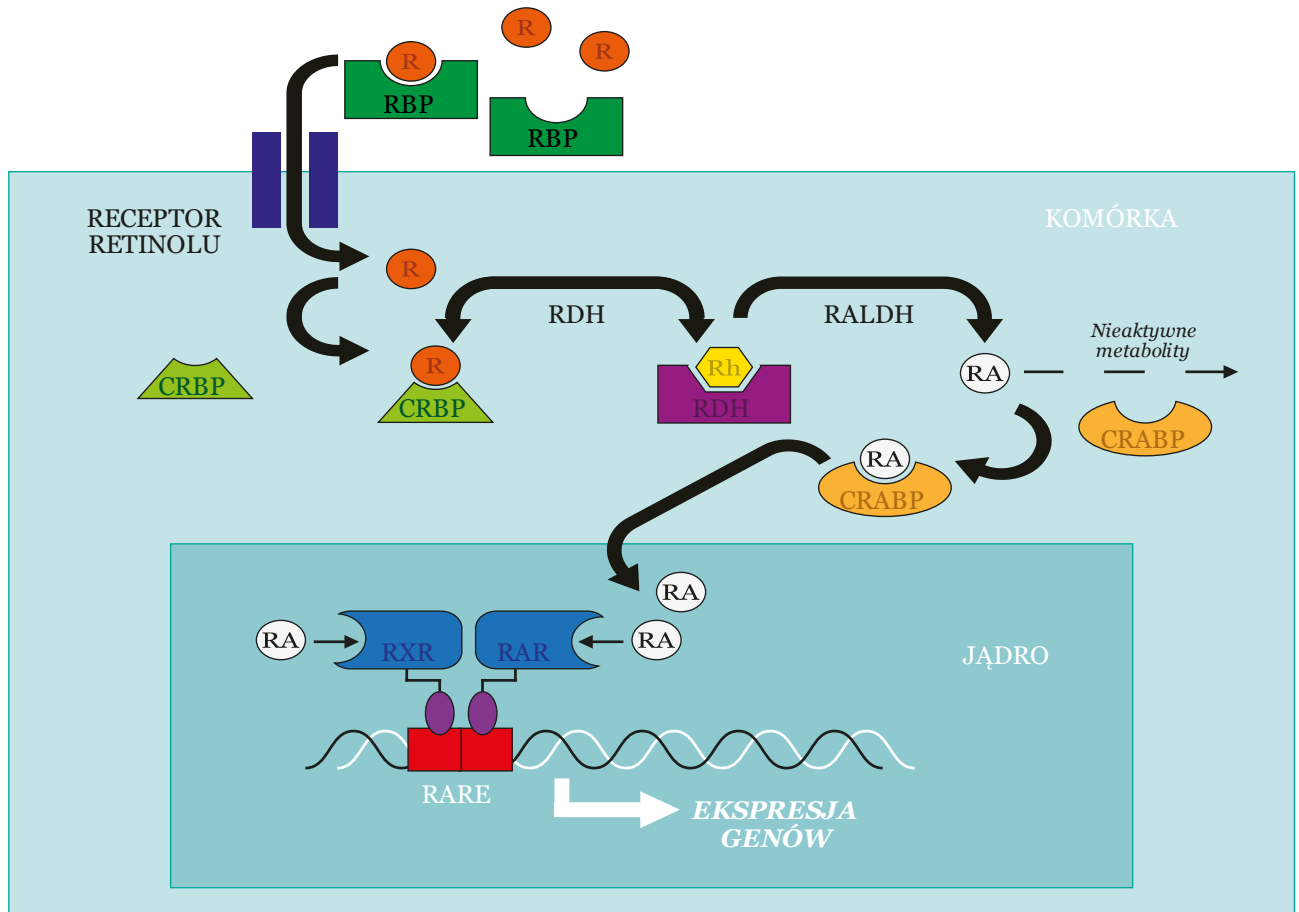
[D1] Retinoidy. Chemiczna różnorodność dla zdrowia i urody;
Retinoids. Chemical diversity for health and beauty,

który ukazał się w czasopiśmie „Przemysł Chemiczny” 102/2 (2023).

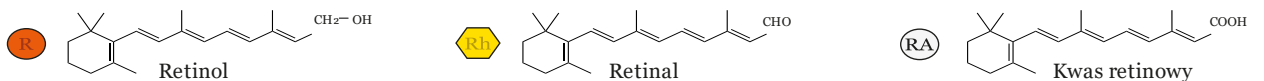


W pracy przedstawiono przemiany retinolu w komórce. Wyszczególniono receptory zlokalizowane w błonie komórki oraz w jądrze komórkowym, które determinują skuteczność przemian i umożliwiają zamknięcie pełnego cyklu w szlaku metabolicznym retinolu (rys. 7). Retinol, będący podstawową formą przemian witaminy A w komórkach, musi zostać dostarczony do organizmu z zewnątrz drogą pokarmową, w postaci suplementów diety lub miejscowo na skórę. Retinol związany z białkiem RBP jest transportowany do komórki. Podobnie postacie estrowe retinolu są magazynowane

w komórce. Kilkuetapowe utlenianie zachodzące wewnątrz komórki prowadzi do przekształcenia nieaktywnej biologicznie formy estru, a następnie retinolu, do retinalu, a ten ostatecznie konwertowany jest do formy kwasu retinowego, będącej aktywną biologicznie postacią witaminy A.

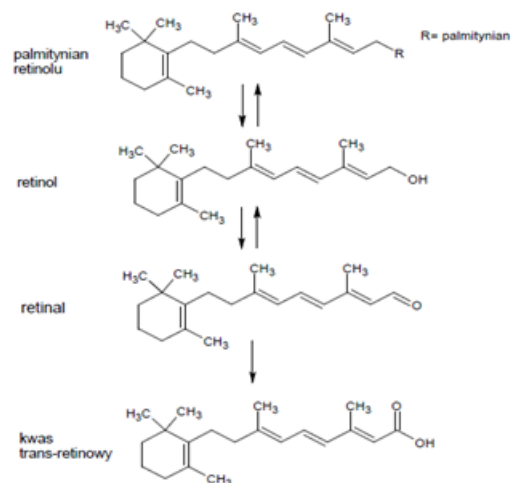


LEGENDA:



Rysunek 7. Szlak metaboliczny retinoidów w komórce (źródło: „Przemysł Chemiczny” [D1]).

Procesy zachodzące między poszczególnymi etapami mogą przebiegać dwukierunkowo. Jedynie konwersja retinalu do formy kwasowej jest trwała. Charakter tego procesu może wskazywać na dodatkowy mechanizm regulujący miejscowe stężenie retinolu w tkankach. Produkt powstający w wyniku reakcji staje się naturalnym ligandem receptorów w jądrze komórkowym i odzwierciedla właściwą aktywność witaminy A [49]. Podczas całego procesu przemian aż 95% retinalu jest konwertowane do retinolu i dalej do postaci estrowej, a tylko 5% ulega przemianom do aktywnej postaci kwasu retinowego [50] (rys. 8).



Rysunek 8. Szlak przemian metabolicznych retinoidów w skórze (opracowanie własne).

2.3. Działanie na skórę

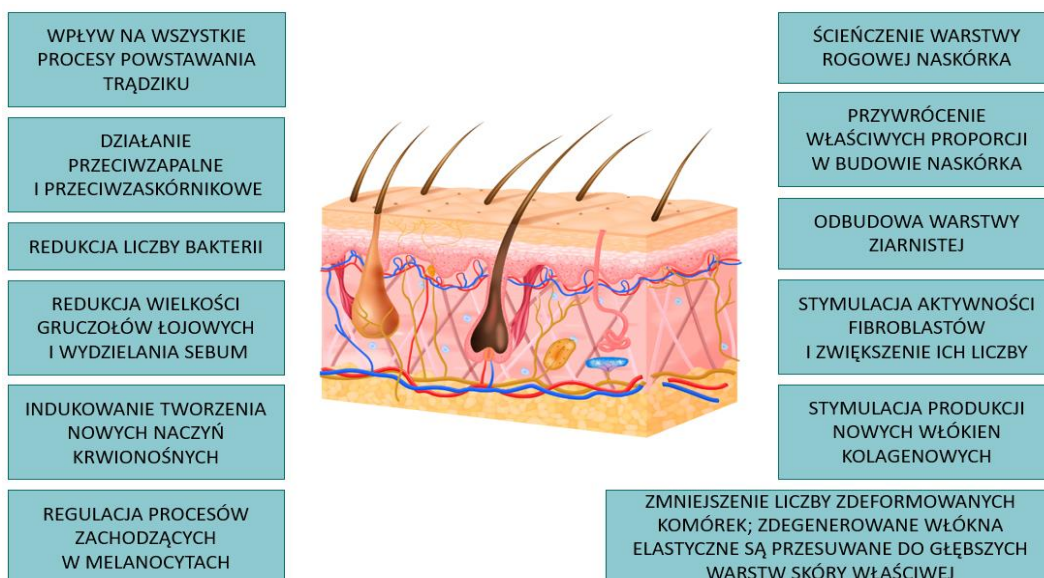
Dzięki swojej wszechstronnej aktywności retinoidy mają wpływ na liczne struktury w skórze (rys. 9). W warstwie naskórka przyspieszają różnicowanie keratynocytów i proces regeneracji. W konsekwencji wzmacniane są funkcje ochronne bariery naskórkowej oraz następuje regulacja procesu przynaskórkowej utraty wody [41, 44]. W skórze właściwej natomiast retinoidy pobudzają aktywność fibroblastów, dzięki czemu wzrasta liczba włókien kolagenowych, w szczególności typu VII [41, 44, 51]. Ponadto retinoidy regulują pracę gruczołów łojowych [41] oraz melanocytów – wpływają na prawidłowy rozkład melaniny w skórze [33, 52]. Aktywność retinoidów sprawia, że związki te są wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym jako produkty do pielęgnacji skóry starzejącej się i z objawami licznych dermatoz.

Wpływ retinoidów na skórę opisano szerzej w artykule:

[D1] Retinoidy. Chemiczna różnorodność dla zdrowia i urody;
Retinoids. Chemical diversity for health and beauty,

który ukazał się w czasopiśmie „Przemysł Chemiczny” 102/2 (2023).





Rysunek 9. Wpływ retinoidów na poszczególne struktury skóry (opracowanie własne na podstawie: Boryczka i wsp. [33], Kaźmierska i wsp. [51], Mukherjee i wsp. [53]).

2.4. Wady i przeciwwskazania

Stosowanie retinoidów wiąże się z licznymi ograniczeniami i przeciwwskazaniami. Głównym i bezwzględnie przeciwwskazaniem jest ciąża i okres laktacji – z powodu działania embriotoksycznego i teratogennego [49]. Ponadto nie powinno się łączyć retinoidów z innymi preparatami o analogicznym składzie i działaniu ze względu na ryzyko hiperwitaminozy [44, 54]. Podczas stosowania witaminy A na skórę należy także uważać z ekspozycją na promieniowanie UV (słońce, solarium), które może mieć wpływ na nasilenie podrażnienia skóry [33]. Wśród objawów ubocznych i niepożądanych można wymienić ponadto zaczerwienienie i łuszczenie się naskórka. Częstym objawem są także: uczucie pieczenia, wysypka i świąd [51].

2.5. Retinoidy w produktach kosmetycznych

Zgodnie z aktualnym prawem w produktach kosmetycznych można stosować jedynie estry retinolu, tj. octan retinyli (INCI: *retinyl acetate*) i palmitynian retinyli (INCI: *retinyl palmitate*), a także retinol (INCI: *retinol*) i retinal (INCI: *retinal*). Kwas retinowy jest natomiast substancją do użytku wyłącznie w produktach medycznych i w produktach leczniczych [54].

Zgodnie z Rozporządzeniem Komisji (UE) 2024/996 z dnia 3 kwietnia 2024 r. zmieniającym rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 w odniesieniu do stosowania w produktach kosmetycznych witamina A została uznana za bezpieczną. Jednak Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów (ang. *Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS*) uznał, że „ogólne narażenie populacji na witaminę A może przekroczyć górny poziom spożycia ustanowiony przez Europejski Urząd ds.

Bezpieczeństwa Żywności”. Ponadto dodał, że „udział witaminy A z produktów kosmetycznych w ogólnym narażeniu konsumentów, choć niski, może budzić obawy w przypadku konsumentów najbardziej narażonych na witaminę A (5% całej populacji) z żywności i suplementów diety”. Dlatego „stosowanie witaminy A w produktach kosmetycznych stwarza potencjalne ryzyko dla zdrowia ludzkiego, jeżeli jej stężenie przekracza określone poziomy” [55]. W raporcie stwierdzono, że maksymalne dozwolone stężenie retinolu w produktach kosmetycznych powinno wynosić: 0,3% wag. w produktach niespłukiwanych, 0,05% wag. w balsamach do ciała oraz 0,03% wag. w kremach do pielęgnacji okolicy oczu [55]. Z raportu SCCS wynika, że największą siłą działania – w przeliczeniu na jednostki międzynarodowe (IU) i 1 mg retinoidu – ma retinol (3330 IU), następnie octan retinyli (2900 IU) i forma palmitynianowa (1830 IU) [54].

W związku ze zmianami w ustawodawstwie każdy producent zobligowany jest do umieszczenia na opakowaniu produktu kosmetycznego zawierającego witaminę A ostrzeżenia o możliwości nadmiernego narażenia w wyniku stosowania związków z tej grupy. Od 1 listopada 2025 r. na opakowaniu każdego kosmetyku zawierającego retinoid będzie musiało się znajdować oznakowanie: „Zawiera witaminę A. Przed użyciem należy uwzględnić jej dzienne pobranie” [55].

2.6. Retinol w nośnikach lipidowych

Retinoidy wykazują specyficzne właściwości fizykochemiczne, takie jak niska stabilność związków pod wpływem temperatury, obecności tlenu oraz promieniowania UV [33]. Z tego powodu podjęto próby enkapsulacji tej grupy związków jako substancji bioaktywnych w nośnikach lipidowych. W większości były to jednak substancje używane w produktach medycznych, a tylko nieliczne reprezentowały grupę substancji dozwolonych do użytku w kosmetykach. Poniżej przedstawiono wybrane przykłady nanocząstek lipidowych inkorporowanych retinoidami wszystkich trzech generacji, gdzie uwzględniono metodę otrzymywania nośników, inkorporowaną substancję czynną oraz wartości parametrów fizykochemicznych uzyskanych struktur nanolipidowych (tab. 1).

Tabela 1. Nanocząstki lipidowe inkorporowane retinoidami – przegląd literaturowy.

RODZAJ NANOCZĄSTKI LIPODOWEJ	METODA OTRZYMYWANIA	INKORPOROWANY RETINOID	ŚREDNIA WIELKOŚĆ NANOCZĄSTEK [nm]	WSKAŹNIK POLIDYSERSYJNOŚCI [-]	ŹRÓDŁO
SmartLipids®	HPH na ciepło	retinol	200	0,300	[56]
SLN	HPH na ciepło	retinol	224	0,205	[57]
SLN	HPH	retinol	> 200	BD*	[58]
SLN	sonikacja	all-trans retinol	120	BD*	[59]
NLC	sonikacja	all-trans retinol	119–242	BD*	[59]
NLC	HPH	retinol	242	0,209	[60]
SLN	HPH	all-trans retinol	> 228	> 0,198	[60]
SLN	sonikacja	all-trans retinol	> 95	> 0,240	[61]
BD*	odparowanie rozpuszczalnika	retinol	> 189	BD*	[62]
NLC	HSH	retinol	> 183,1	> 0,220	[63]
SLN	HPH	retinol	224	0,205	[57]
NLC	HPH	retinol	186	0,113	[57]
NLC	sonikacja	retinoidy	> 134,5	> 0,187	[64]
SLN	HSH	palmitynian retinyłu	> 130,4	> 0,145	[65]
NLC	HPH	palmitynian retinyłu	> 197,6	< 0,300	[66]

*BD – BRAK DANYCH

PODSUMOWANIE – NAWIĄZANIE DO PUBLIKACJI

Przedstawiony podrozdział opiera się na publikacji [D1] pt.:

***Retinoids. Chemical diversity for health and beauty;
Retinoidy. Chemiczna różnorodność dla zdrowia i urody***

„Przemysł Chemiczny” 102/2 (2023) doi: 10.15199/62.2023.2.8

W publikacji przeglądowej opisano historię, budowę i właściwości rodziny retinoidów. Szczególną uwagę zwrócono na wpływ procesów zachodzących w skórze pod wpływem witaminy A, na jej działania pożądane i niepożądane oraz na istotne przeciwwskazania. przedstawiono także związki z grupy retinoidów stosowane w przemyśle zarówno kosmetycznym, jak i farmaceutycznym.



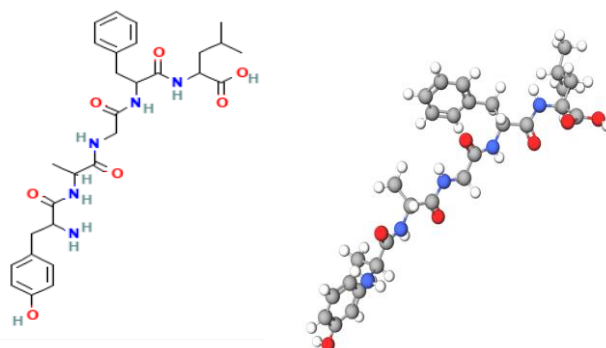
3.2.1. Neuropeptydy

Pełnią funkcję inhibitorów neurotransmiterów. Zwane są też peptydami rozkurczającymi [22]. Ich działanie wiąże się ze zdolnością blokowania receptorów, co zmniejsza przepływ impulsów z komórek nerwowych. Ograniczeniu ulega tym samym kurczenie się mięśni twarzy, możliwe dzięki uwalnianiu neuroprzekaźników z komórek do układu nerwowego [67, 71]. Ograniczenie wydzielania neurotransmiterów w mięśniach twarzy może prowadzić do redukcji tworzenia się zmarszczek mimicznych [22, 67, 71]. Syntetyczne peptydy będące analogami łańcuchów aminokwasowych białka synaptycznego SNAP-25 (ang. *SyNaptosome-Associated Protein, 25kDa*) mogą przejmować funkcję inhibitorów i wpływać na pożądane zakłócenia w kompleksie SNARE (ang. *SNAP receptors – Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor*) oraz na hamowanie jego aktywności. Acetylocholina, główny neuroprzekaźnik biorący udział w tym procesie, jest uwalniana z pęcherzyków w wyniku reakcji, której pośredniczy białko receptora SNAP. Kompleks SNARE pod wpływem acetylocholiny jest odpowiedzialny za kurczenie się mięśni mimicznych i tym samym za utrwalanie zmarszczek na skórze. Natomiast peptydy o sekwencji podobnej do białek budujących synapsy mają potencjał hamowania tej reakcji [70].

Do neuropeptydów należą np.: *Acetyl Hexapeptide-8 (Ac-Glu-Glu-Met-Gln-Arg-Arg-NH₂)*, *Pentapeptide-18 (H-Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu-OH)*.

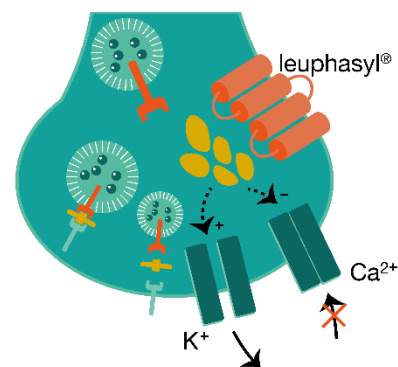
3.2.1.1. Pentapeptyd-18 – właściwości

Leuphasyl® (INCI: *pentapeptide-18*) to nazwa handlowa peptydu z grupy neuropeptydów złożonego z sekwencji aminokwasów *H-Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu-OH* (rys. 11). Związek ten został zarejestrowany przez firmę Lipotec® (Hiszpania) w 2015 r. jako peptyd hamujący uwalnianie neuroprzekaźników.



Rysunek 11. Budowa strukturalna *pentapeptide-18*; Leuphasyl® (źródło: Lipotec®, Hiszpania, PubChem).

W swoim działaniu naśladuje naturalną ścieżkę enkefalin. Enkefaliny należą do grupy neuropeptydów opioidowych, które łączą się z receptorami opioidowymi poza komórką nerwową. Połączenie enkefalin z odpowiednim receptorem powoduje uwolnienie białka G. Dzięki procesowi asocjacji uwalniane białka G powodują zamknięcie kanałów wapniowych. Pozwala to uniknąć fuzji pęcherzyków i zmniejszyć wydzielanie acetylocholin w synapsie, odpowiedzialnej za skurcz mięśni (rys. 12). Opisany mechanizm pozwala utrzymać neuron w fazie spoczynku, dzięki czemu dochodzi do osłabienia kurczenia się mięśni; tym samym możliwe staje się przeciwdziałanie powstawaniu zmarszczek mimicznych [69, 72].



Rysunek 12. Synapsa nerwowa. Opracowanie własne na podstawie materiałów Lipotec®.

Leuphasyl® redukuje głębokość zmarszczek spowodowanych skurczem mięśni mimicznych twarzy, zmniejszając aktywność neuronów i regulując wydzielanie acetylocholin. Zgodnie z deklaracją producenta peptyd charakteryzuje się działaniem przeciwmarszczkowym. Przeprowadzone badania *in vivo* potwierdzają efektywność działania pentapeptydu – osiągnięto wynik redukcji zmarszczek o 11,64% [70, 73].

3.2.2. Peptydy sygnałowe

Peptydy sygnałowe poprzez wysyłanie „sygnału” inicjują procesy wewnątrzkomórkowe, a także stymulują fibroblasty do produkcji włókien kolagenowych i elastynowych oraz fibronektyny – glikoproteiny występującej w macierzy pozakomórkowej, która reguluje oddziaływanie komórki; macierz bierze udział w adhezji i proliferacji komórek [22]. Peptydy te wpływają na redukcję zmarszczek i drobnych linii oraz uszkodzeń skóry spowodowanych fotostarzeniem [70, 71].

Do tej grupy należą np.: *Palmitoyl Hexapeptide-12 (Pal-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-OH)*, *Palmitoyl Pentapeptide-4 (Pal-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser-OH)*.

3.2.3. Peptydy transportujące

Peptydy transportujące, zwane także nośnikowymi, to substancje aktywne w skórze, które mają zdolność stabilizacji i transportu kationów miedzi [69, 70, 74], manganu [70] oraz magnezu [74], niezbędnych w procesach gojenia się ran i w procesach antyoksydacyjnych [70]; są składnikami wielu enzymów [22].

Do peptydów transportujących należą np.: *Copper tripeptide-1 (Cu(II) H-Gly-His-Lys-OH)*, *Manganese Tripeptide-1 (Mn(II) H-Gly-His-Lys-OH)*.

Schagen oprócz powyższych wyszczególnił dwie kolejne grupy peptydów, przy czym zwrócił uwagę na brak szczegółowych informacji na temat sposobu ich działania [67]:

- **peptydy hamujące enzymy** – oligopeptydy sojowe, fibryna jedwabiu i peptydy ryżowe – stymulują lub hamują aktywność wybranych enzymów;
- **peptydy na bazie białek strukturalnych** (keratyny) – mają właściwości hemostatyczne, nawilżające i naprawcze [67, 75].

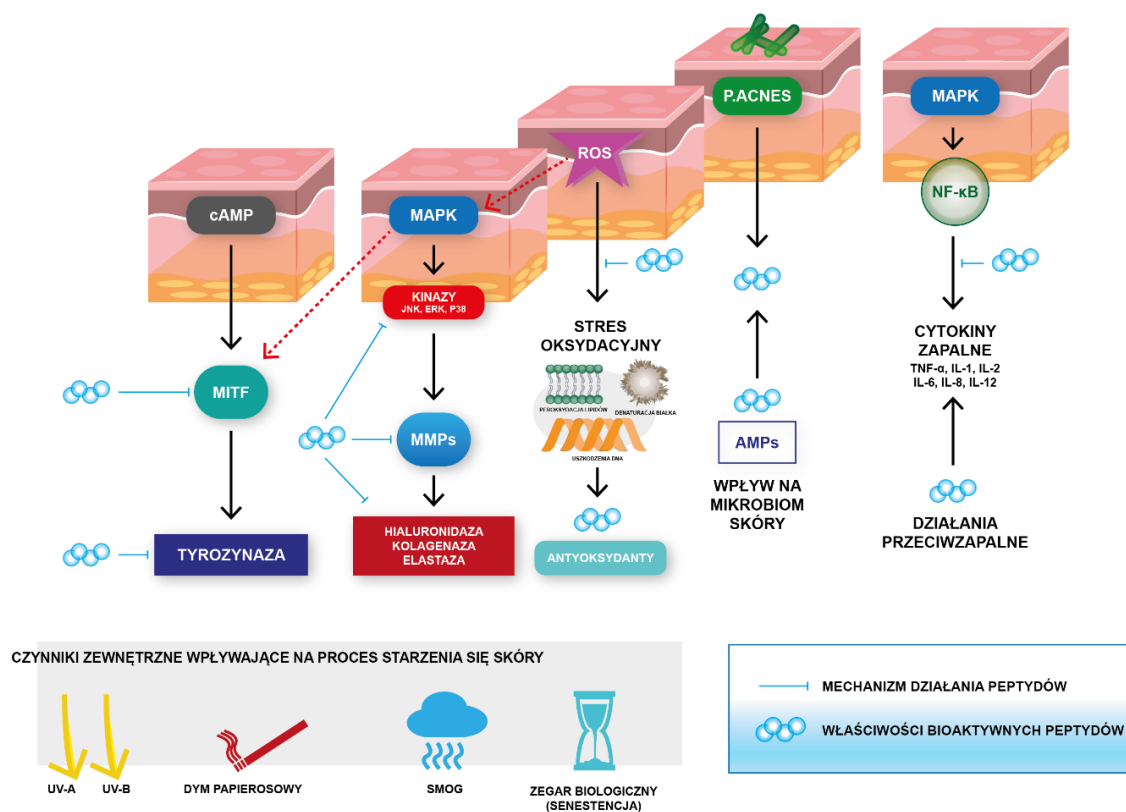
3.3. Wpływ peptydów na skórę

Wielokierunkowa bioaktywność peptydów i ich wpływ na skórę zostały szeroko opisane w licznych artykułach naukowych, w których zwracano uwagę na ogólną poprawę kondycji skóry oraz na redukcję negatywnego wpływu czynników zewnętrznych poprzez wspieranie mechanizmów ochronnych skóry przez peptydy (rys. 13). Podstawową i najbardziej docenianą cechą peptydów jest regulacja aktywności enzymatycznej. Przykładem może być hamowanie oddziaływania hialuronidazy, kolagenazy i elastazy, które mają degradujący wpływ na struktury komórkowe skóry właściwej i naskórka, oraz hamowanie tyrozynazy odpowiedzialnej za powstawanie przebarwień w skórze [76]. Te procesy biochemiczne zachodzą zgodnie z indywidualnym zegarem biologicznym każdego organizmu, a ponadto mogą mieć bardziej nasilony przebieg pod wpływem czynników zewnętrznych, takich jak: promieniowanie UV, zanieczyszczenia powietrza oraz dym papierosowy [77].

Funkcja enzymatycznego oddziaływania peptydów na skórę redukuje tym samym stopień starzenia się skóry, przejawiający się typowymi objawami w postaci zmarszczek, hiperpigmentacji oraz spadku jędrności i elastyczności [78].

Aktywność peptydów zauważalna jest także w licznych procesach fizjologicznych, takich jak [78]:

- wpływ na mikrobiom skóry i działanie przeciwdrobnoustrojowe,
- działanie przeciwzapalne,
- redukcja stresu oksydacyjnego i działanie antyoksydacyjne,
- wpływ na nawilżenie skóry poprzez ograniczenie transepidermalnej ucieczki wody (TEWL).



Rysunek 13. Sposoby oddziaływania peptydów w produktach kosmetycznych na skórę. cAMP: cykliczny adenozyńmonofosforan; MITF: czynnik transkrypcyjny związany z mikroftalmią; MAPK: kinazy białkowe aktywowane mitogenami; JNK: c-jun N-końcowa kinaza; ERK: kinazy regulowane sygnałem pozakomórkowym; MMPs: metaloproteinazy macierzy; ROS: reaktywne formy tlenu; AMPs: peptydy przeciwdrobnoustrojowe; TNF- α : czynnik martwicy nowotworów- α ; IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12: interleukiny zapalne. Czarne strzałki wskazują mechanizm bezpośredni; przerywane czerwone strzałki wskazują mechanizm pośredni (źródło: „Chemik” [D2]).

3.4. Peptydy w produktach kosmetycznych

Glosariusz wydany przez Komisję Europejską w 2019 r., obejmujący nazwy wszystkich składników dozwolonych do stosowania w produktach kosmetycznych, zawiera ponad 1840 wpisów ze słowem „peptyd” [79]. Ponadto Agencja Żywności i Leków (FDA) [74], Przegląd Składników Kosmetycznych (ang. *Cosmetic Ingredient Review*, CIR) oraz Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów (SCCS) [80] potwierdziły bezpieczeństwo stosowania tych substancji. Zgodnie z obowiązującym raportem uznano stężenie 0,005% wag. jako bezpieczne do stosowania w produkcie kosmetycznym. Popularność peptydów wiąże się z ich wysokim profilem bezpieczeństwa, hipoalergicznością oraz ekonomicznym procesem produkcyjnym [78]. Procesy biochemiczne, podczas których syntetyzuje się związki peptydowe, inspirowane są peptydami występującymi w sposób naturalny w skórze. Na przykład matrykiny stanowią element macierzy międzykomórkowej, a jednocześnie mogą być pozyskiwane poprzez syntezę chemiczną lub przetwarzane drogą biochemiczną [74]. Na biodostępność peptydów mają wpływ dwa czynniki: charakter

hydrofliowy, który determinuje zerową asymilację pasywną, w związku z czym mogą one być przyswajane wyłącznie drogą międzykomórkową [6], oraz estryfikacja łańcuchami alkilowymi [6, 74, 81].

Stabilność i kompatybilność peptydów z formułą kosmetyczną jest kluczowym aspektem podczas uwalniania związku w aktywnej postaci z podłoża kosmetycznego, a następnie penetracji do głębszych warstw naskórka. Peptydy mają zdolność przenikania drogą dyfuzji, drogą penetracji międzykomórkowej i za pośrednictwem nośników [6].

Wymagania skutecznej i bezpiecznej terapii, które powinny spełniać związki peptydowe, brzmią następująco:

- skuteczna i udowodniona bioaktywność o widocznych efektach;
- udowodniona bioaktywność nie powinna przynosić negatywnych skutków terapeutycznych;
- cząsteczka peptydu nie powinna wykazywać cytotoksyczności, działania drażniącego, immunogenności ani mutagenności;
- cząsteczka peptydu powinna dotrzeć do założonej lokalizacji w formie nienaruszonej i aktywnej;
- budowa fizykochemiczna peptydu powinna być stabilna, kompatybilna z innymi składnikami produktu kosmetycznego [82].

3.5. Peptydy w nośnikach lipidowych

Wykorzystanie nośników lipidowych w celu ułatwienia penetracji i absorpcji peptydowych związków aktywnych zostało opisane w licznych publikacjach i badaniach. Dotyczą one jednak w przeważającej większości leków. Tylko bardzo nieliczne prace badawcze mają związek z enkapsulacją peptydów jako składowej przeznaczonej dla produktów kosmetycznych. Najczęściej stosowane metody inkorporacji peptydów do SLN przedstawia tabela 2.

Tabela 2. Nanocząstki lipidowe inkorporowane związkami peptydowymi – przegląd literaturowy.

RODZAJ NANOCZĄSTKI LIPIDOWEJ + INKORPOROWANY PEPTYD	METODA OTRZYMYWANIA	EFEKTYWNOŚĆ METODY [%]	ŚREDNIA WIELKOŚĆ NANOCZĄSTEK [nm]	ŹRÓDŁO
SLN + cyklosporyna	metoda mikroemulsji	13	BD	[83]
SLN + insulina	metoda mikroemulsji	38–90	BD	[84]
SLN + lizozym	HPH	59	BD	[85]
SLN + cyklosporyna	HPH	95–98	BD	[86]
SLN + białko	HSH	BD	433,53–447,10	[87]
SLN + oligopeptyd	HSH	BD	134,7	[88]

PODSUMOWANIE – NAWIĄZANIE DO PUBLIKACJI



Prezentowany podrozdział opiera się na publikacji [D2] pt.:

Peptydy w nośnikach lipidowych i ich zastosowanie w produktach kosmetycznych;

Peptides in lipid carriers and their application in cosmetic products

„Chemik” 9.2024 r., doi: 10.15199/4.2024.2.3.

Artykuł obejmuje charakterystykę związków peptydowych i ich zastosowanie w przemyśle kosmetycznym. W publikacji przeglądowej opisano budowę, właściwości i wpływ peptydów na procesy zachodzące w skórze. Przedstawiono także przykłady zastosowania stałych nanocząstek lipidowych (SLN) jako skutecznej metody transportu przeznaskórkowego związków białkowych wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym.



III. CEL PRACY

Celem badań naukowych prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej było **opracowanie produktów kosmetycznych** z wykorzystaniem cząsteczki **retinolu** oraz odpowiednio dobranego **peptydu** (w formie **nanocząstek lipidowych**), przeznaczonych do pielęgnacji skóry z problemami **trądzikowymi**, z **niedoskonałościami** oraz skóry **starzejącej się**. Cel pracy zrealizowano w następujących etapach.

I. OPTIMALIZACJA STAŁYCH NANOCZĄSTEK LIPIDOWYCH INKORPOROWANYCH RETINOLEM I OLIGOPEPTYDEM – SKŁAD, METODA OTRZYMYWANIA

- Optymalizacja składu dyspersji nanocząstek lipidowych inkorporowanych retinolem i oligopeptydem, otrzymywanych metodą homogenizacji bazującą na emulsji wielokrotnej typu W/O/W, z wykorzystaniem homogenizatora wysokoobrotowego (ang. *high shear homogenization*, HSH). Metoda miała docelowo zostać przeniesiona z laboratorium na skalę produkcyjną.
- Ocena stabilności otrzymanych dyspersji nanocząstek lipidowych na podstawie wartości średniej wielkości cząstek, wskaźnika polidispersyjności oraz potencjału zeta.
- Ocena efektywności enkapsulacji i pojemności ładunkowej związków aktywnych oraz charakterystyka matrycy lipidowej wytworzonych nanocząstek lipidowych (dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego – ang. *X-ray diffraction*, XRD; skaningowa kalorymetria różnicowa – ang. *differential scanning calorimetry*, DSC).

II. NOŚNIKI LIPIDOWE INKORPOROWANE RETINOLEM I PEPTYDEM JAKO SUROWIEC KOSMETYCZNY W PRODUKCJI PREPARATÓW KOSMETYCZNYCH

- Wprowadzenie dyspersji nanocząstek lipidowych inkorporowanych retinolem i pentapeptydem-18 do opracowanej receptury produktu kosmetycznego o charakterze emulsji typu O/W.
- Analiza zmian pH otrzymanych produktów kosmetycznych w czasie i w różnych temperaturach przechowywania (4°C, 25°C, 45°C).
- Ocena stabilności otrzymanych emulsji kosmetycznych z wykorzystaniem metody wielokrotnego rozpraszania światła (ang. *multiple light scattering*, MLS).
- Ocena efektywności działania i potwierdzenie założonego przekazu marketingowego (poziom nawilżenia skóry i przesnaskórkowej utraty wody, elastyczność skóry, regulacja aktywności gruczołów łojowych oraz produkcji sebum, parametry topografii i makrorzeźby skóry) opracowanych produktów kosmetycznych z wykorzystaniem badań *in vivo* o charakterze aplikacyjno-aparaturowym.



IV. CZĘŚĆ BADAWCZA

4. Optymalizacja stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych retinolem i oligopeptydem – skład, metoda otrzymywania [D3]

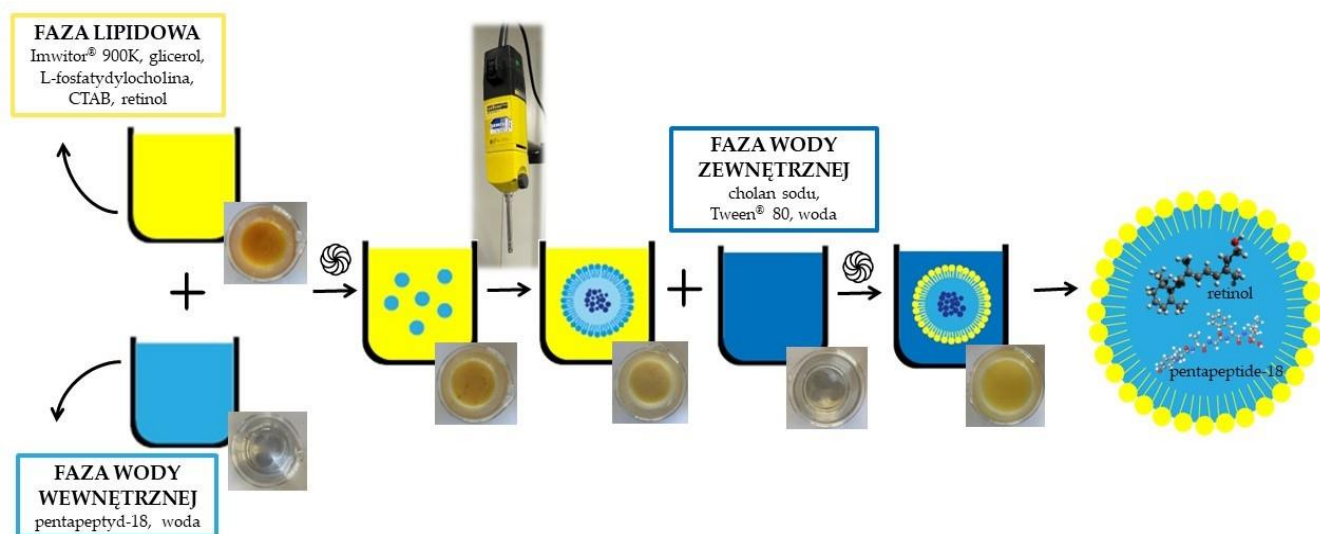
4.1. Odczynniki chemiczne

Wewnętrzną fazę wodną dyspersji optymalizowanych nanocząstek lipidowych stanowił **peptyd Leuphasyl®** (INCI: *pentapeptide-18*/Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu; Lipotec®; Barcelona, Hiszpania) zdyspergowany w wodzie destylowanej. Do fazy lipidowej wprowadzono: lipid stały (wybrany w toku eksperymentu *lipid screening* – patrz podrozdział 4.3.), **glicerol** (Chempur, Piekary Śląskie, Polska), **CTAB** – bromek heksadecylotrimetyloamoniowy (Sigma-Aldrich, Poznań, Polska), który pełnił rolę kationowego środka powierzchniowo czynnego, oraz **L-fosfatydylocholinę** (Merck; Darmstadt, Niemcy). W ramach fazy lipidowej uwzględniono również jedną z substancji aktywnych – **retinol** (INCI: *retinol*; DSM, Kaiseraugst, Szwajcaria). Ostatnią fazę stanowiła zewnętrzna faza wodna, na którą składały się: wybrany surfaktant niejonowy (patrz podrozdział 4.3.) oraz **cholan sodu** (Acros Organics, Antwerp, Belgium) – substancja z grupy jonowych substancji powierzchniowo czynnych.

4.2. Metoda otrzymywania SLN

Stale nanocząstki lipidowe otrzymano metodą homogenizacji z wykorzystaniem homogenizatora wysokoobrotowego (*ang. high shear homogenization*, HSH) opartą na emulsji wielokrotnej typu W/O/W. Pierwszym etapem było wprowadzenie składników zewnętrznej fazy wodnej (I) do szklanej zlewki – cholan sodu (0,1% wag.) oraz surfaktant niejonowy (1,5% wag.) zdyspergowano w wodzie destylowanej i podgrzano do temperatury 35°C przy jednoczesnym mieszaniu z prędkością 250–300 obr./min przez 15 minut. Następnie układ schłodzono do temperatury pokojowej. Jednocześnie do dwóch niezależnych szklanych zlewek wprowadzono składniki fazy tłuszczowej (II) – wybrany lipid stały (1,0% wag.), CTAB (0,5% wag.) oraz L-fosfatydylocholinę (0,25% wag.), które podgrzano do temperatury topnienia lipidu stałego, oraz oddzielnie glicerynę, ogrzaną do temperatury 60°C. Kolejnym etapem było stopniowe przelanie podgrzanej gliceryny do zlewki z fazą tłuszczową (II) oraz poddanie otrzymanej mieszaniny ciągłemu mieszaniu przez 10 minut. W tym samym czasie w szklanej fiolce przygotowano wewnętrzną fazę wodną (III), którą dodano następnie do fazy tłuszczowej (II) przy jednoczesnym mieszaniu. Kluczowym etapem było poddanie otrzymanego w ten sposób układu homogenizacji (Ultra-Turrax® DI 25 Basic, IKA-Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Niemcy) z prędkością 8000 obr./min przez 15 minut. Uzyskaną emulsję typu W/O połączono w ostatnim etapie z zewnętrzną fazą wodną (I) przy jednoczesnym mieszaniu z prędkością 500 obr./min przez 15 minut (rys. 14). Podczas produkcji SLN inkorporowanych badanymi związkami

aktywnymi substancje te wprowadzono w odpowiednich etapach produkcji – retinol (2% wag.) do podgrzanej fazy tłuszczowej (II) oraz pentapeptyd-18 (0,1% wag.) do wewnętrznej fazy wodnej (III).



Rysunek 14. Schemat przedstawiający proces produkcyjny SLN inkorporowanych retinolem i pentapeptydem-18 (fotografie i opracowanie własne).

4.3. Optymalizacja składu SLN [D3]

Optymalizację składu nanocząstek lipidowych rozpoczęto od doboru stałego lipidu (ang. *lipid screening*), który byłby kompatybilny z retinolem, ponieważ to właśnie matryca lipidowa nośników ma kluczowe znaczenie dla stabilności SLN [89]. Do eksperymentu wybrano cztery lipidy stałe:

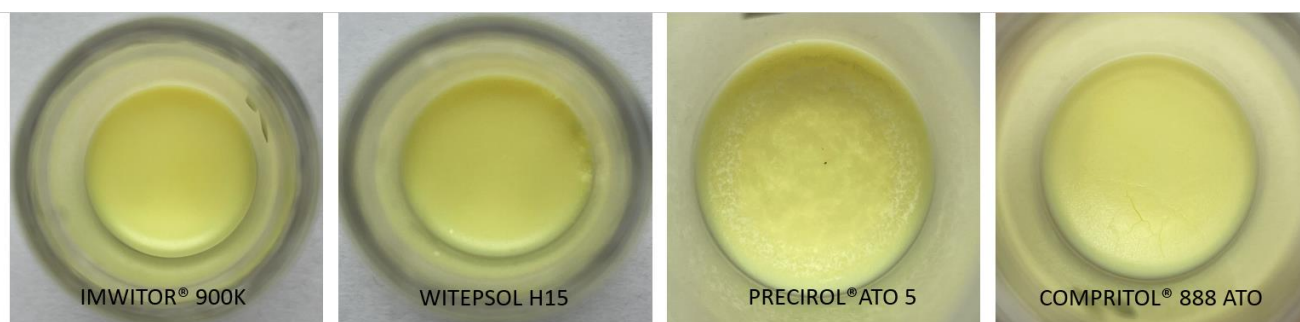
- **Compritol® 888 ATO** (dibehenian glicerolu), Gattefossé (Lyon, Francja);
- **Precirol® ATO 5** (distearynian glicerolu), Gattefossé (Lyon, Francja);
- **Imwitor® 900 K** (monostearynian glicerolu), IOI Oleo GmbH (Hamburg, Niemcy);
- **Witepsol H15** (mieszanka tri-, di- oraz monoglicerydów kwasów tłuszczowych), IOI Oleo GmbH (Hamburg, Niemcy).

Po odważeniu odpowiednich ilości wymienionych powyżej lipidów stałych oraz retinolu składniki te podgrzano do temperatury przekraczającej temperaturę topnienia lipidu stałego. Tak otrzymane mieszaniny poddano obserwacji (tab. 3) w określonych punktach czasowych: po 15 minutach, po 30 minutach, po 1 godzinie, po 24 godzinach oraz po 72 godzinach od momentu zestalenia układu. Celem eksperymentu było uzyskanie kompatybilnej i jednolitej mieszaniny, powstałej w wyniku połączenia retinolu z lipidem.

Tabela 3. Kompatybilność lipidów stałych z retinolem mierzona w czasie do 72 h.

LIPID STAŁY	TEMPERATURA TOPNIENIA	0 min	15 min	30 min	60 min	24 h	72 h
IMWITOR® 900 K	61°C	+	+	+	+	+	+
WITEPSOL H15	33,5-35,5°C	+	+/-	+/-	+/-	-	-
PRECIROL® ATO 5	50-60°C	-	-	-	-	-	-
COMPRITOL® 888 ATO	65-77°C	+	+	+	+	+/-	+/-

Na podstawie obserwacji końcowych, tj. po 72 godzinach eksperymentu (rys. 15), wybrane lipidy – Imwitor® 900 K oraz Compritol® 888 ATO (obydwa w ilości 1% wag.) – wykorzystano do dalszej optymalizacji produkcji dyspersji nanocząstek lipidowych z wykorzystaniem metody HSH (opisanej szczegółowo w podrozdziale 4.2.).



Rysunek 15. Wygląd mieszaniny lipidu stałego z retinolem po 72 h (fotografie i opracowanie własne).

Dla otrzymanych próbek SLN, różniących się zastosowanym lipidem stałym, określono parametry fizykochemiczne (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Wielka Brytania). Pod uwagę brano następujące parametry: średnią wielkość cząstek (ang. *mean particle size*, Z-Ave), wskaźnik polidispersyjności (ang. *polydispersity index*, PDI) oraz potencjał zeta (ang. *zeta potential*, ZP). Przed przystąpieniem do pomiarów dyspersje SLN rozcieńczano w wodzie destylowanej w proporcji: 60 µl dyspersji SLN oraz 15 ml wody destylowanej. Pomiarów powtórzono trzykrotnie dla każdej z próbek, a następnie obliczono średnią arytmetyczną wraz z odchyleniem standardowym.

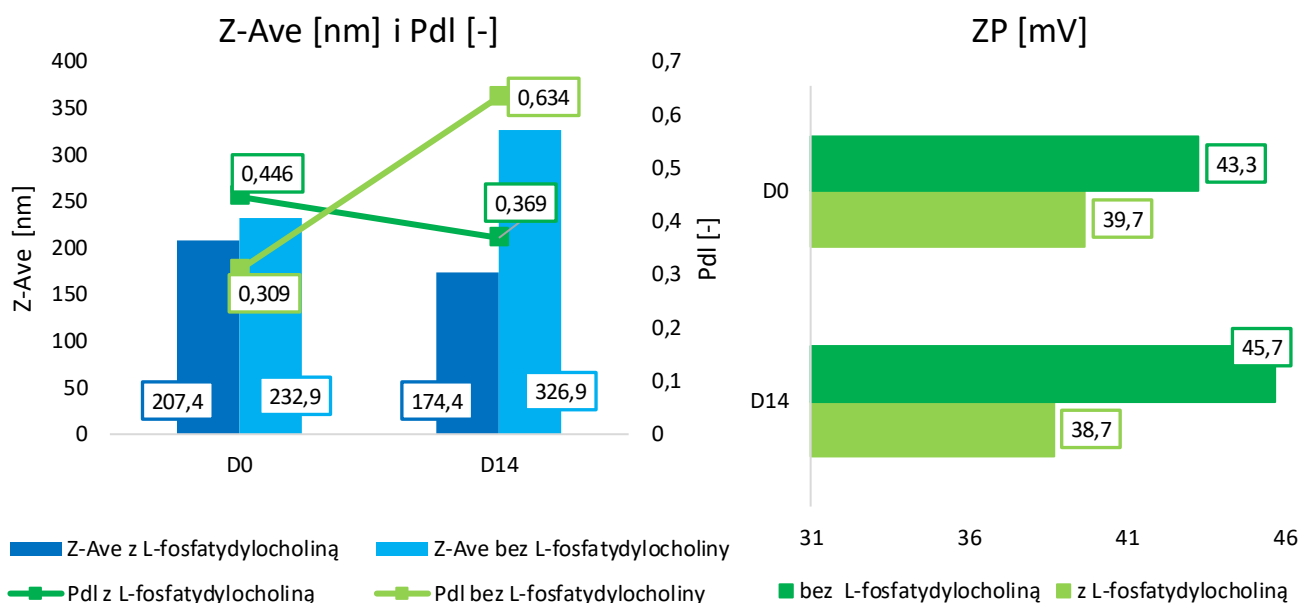
Badanie przeprowadzono w dniu otrzymania dyspersji (D0) i uzyskano następujące wyniki:

- **Compritol® 888 ATO** – Z-Ave = 560,2 nm ± 7,4; PDI = 0,563 ± 0,040; ZP = 45,7 mV ± 0,4;
- **Imwitor® 900 K** – Z-Ave = 207,4 nm ± 1,1; PDI = 0,446 ± 0,015; ZP = 39,7 mV ± 0,2.

Celem ponownego badania po 14 dniach było potwierdzenie słuszności doboru lipidu stałego. Ze względu na niezadowalające wartości parametrów oznaczonych dla dyspersji zawierającej Compritol® 888 ATO w D0, po 14 dniach (D14) badanie powtórzono wyłącznie dla próbki zawierającej Imwitor® 900 K – **Z-Ave** = 174,4 nm ± 0,8; **PDI** = 0,369 ± 0,026; **ZP** = 38,7 mV ± 0,3.

Zgodnie z wnioskami przedstawionymi w publikacji („**International Journal Of Molecular Sciences**” – [D3]) matryca lipidowa bazująca na lipidzie Imwitor® 900 K zapewniała najkorzystniejsze wyniki, biorąc pod uwagę przyjęte założenie dotyczące oczekiwanych rozmiarów badanych struktur lipidowych (Z-Ave < 300 nm). Dobór odpowiedniego lipidu stałego może mieć kluczowy wpływ na efektywność uwalniania substancji aktywnej z SLN, w szczególności substancji peptydowych [85]. Zdaniem Fanguery i współpracowników [16] właściwości matrycy lipidowej zależą nie tylko od rodzaju wykorzystanego lipidu; znacząca jest także ilość lipidów oraz zastosowanie odpowiednich substancji powierzchniowo czynnych. Imwitor® 900 K okazał się najlepszym wyborem spośród wstępnie wyselekcjonowanych lipidów stałych, ponieważ – jak to zauważyli Almeida i Souto [85] – ma on niższą temperaturę topnienia, co przekłada się na kompatybilność otrzymanej dyspersji pod kątem jej zastosowania kosmetycznego, a także stabilności inkorporowanego do wnętrza SLN retinolu.

Kolejnym etapem optymalizacji była weryfikacja wpływu dodatku L-fosfatydylocholiny na parametry fizykochemiczne dyspersji SLN – zdaniem Vanić [90] fosfolipid ten może zwiększać stabilność nanocząstek lipidowych. W ramach optymalizacji składu nanocząstek lipidowych otrzymano dyspersje (metodą HSH), które różniły się obecnością lub brakiem tej substancji. Parametry uzyskane dla dyspersji niezawierającej L-fosfatydylocholiny porównano z parametrami próbki zawierającej tę substancję w ilości 0,25% wag. (rys. 16). Odnotowano widocznie większe zmiany oznaczanych parametrów w czasie w przypadku próbki niezawierającej L-fosfatydylocholiny (wzrost Z-Ave o 40%, Pdl o 105%, ZP o 6%), podczas gdy dla dyspersji z L-fosfatydylocholiną w składzie zaobserwowano stabilizację wartości tychże parametrów w czasie dwóch tygodni (zmiana Z-Ave o 16%, Pdl o 17%, ZP o 2%).



Rysunek 16. Porównanie parametrów fizykochemicznych dyspersji nanocząstek lipidowych ze względu na obecność fosfatydylocholiny (opracowanie własne).

Zgodnie z wnioskami przedstawionymi w publikacji („**International Journal Of Molecular Sciences**” – [D3]) L-fosfatydylocholina wpłynęła korzystnie na stabilizację dyspersji SLN [87]. Ponadto jest odpowiednim rozwiązaniem w formulacjach, które wymagają niższej temperatury podczas procesu otrzymywania, m.in. ze względu na wrażliwość termiczną inkorporowanych związków aktywnych. Wzmacnia także zdolności penetracji enkapsulowanych związków czynnych przez warstwy naskórka [29, 90]. Salvioni i inni zwracają natomiast uwagę na fakt, iż L-fosfatydylocholina nie wykazuje właściwości drażniących, co jest kluczowe przy zastosowaniu optymalizowanej dyspersji SLN w recepturze produktu kosmetycznego [91].

Ostatnim aspektem optymalizacji dyspersji nanocząstek lipidowych był dobór układu surfaktantów, czyli związków powierzchniowo czynnych odpowiedzialnych za właściwości agregacyjne na granicy faz. Ich aktywność zauważalna jest dopiero przy określonym stężeniu surfaktantu [92]. Podczas optymalizacji wykorzystano cztery związki powierzchniowo czynne. Pierwszym z nich był **Tween® 80** (Pol-Aura, Zawroty, Polska) – surfaktant niejonowy – mieszanina polietoksyloowanych pochodnych sorbitanu i kwasu oleinowego. Drugim zastosowanym surfaktantem z tej grupy był **Lutrol® F68** (kopolimer blokowy tlenu etylenu i tlenu propylenu; Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy). Do badań włączono także **cholan sodu**, należący do anionowych substancji powierzchniowo czynnych. Zdaniem Cserhati [93] surfaktanty anionowe charakteryzują się dobrymi właściwościami fizykochemicznymi i wysokim stopniem biodegradowalności. Ostatnim testowanym związkiem był bromek heksadecylotrimetyloamoniowy – **CTAB**, czyli surfaktant kationowy. Ujemnie naładowana powierzchnia skóry oraz dodatnio naładowane nanocząstki lipidowe mogą oddziaływać pomiędzy sobą elektrostatycznie i mieć wpływ na

zwiększone przenikanie substancji aktywnych przez poszczególne warstwy naskórka [94]. W celu optymalizacji składu SLN pod kątem zastosowanego układu związków powierzchniowo czynnych wykonano pięć wariantów dyspersji (tab. 4), a następnie potwierdzono ich parametry fizykochemiczne w dniu wykonania dyspersji (D0) oraz po 14 dniach (D14) przechowywania w temperaturze pokojowej (25°C). Metodyka otrzymywania dyspersji SLN była identyczna jak w przypadku doboru lipidu stałego oraz weryfikacji konieczności użycia L-fosfatydylocholiny. Uzyskane rezultaty zebrano w tabeli 4.

Tabela 4. Porównanie parametrów fizykochemicznych dyspersji nanocząstek lipidowych ze względu na zastosowany układ surfaktantów.

		PARAMETR	D0	D14
Próbka 1	Tween® 80 (1,5% wag.)	Z-Ave [nm]	165,1 ± 0,5	173,9 ± 0,9
	Cholan sodu (0,1% wag.)	PdI [-]	0,379 ± 0,001	0,286 ± 0,002
	CTAB (0,5% wag.)	ZP [mV]	42,3 ± 1,3	42,7 ± 0,4
Próbka 2	Tween® 80 (1,5% wag.)	Z-Ave [nm]	200,0 ± 0,7	185,7 ± 1,5
	-	PdI [-]	0,403 ± 0,004	0,417 ± 0,013
	CTAB (0,5% wag.)	ZP [mV]	45,6 ± 0,2	43,9 ± 2,3
Próbka 3	Lutrol® F68 (1,5% wag.)	Z-Ave [nm]	203,5 ± 2,4	475,8 ± 19,8
	Cholan sodu (0,1% wag.)	PdI [-]	0,456 ± 0,012	0,489 ± 0,042
	CTAB (0,5% wag.)	ZP [mV]	43,6 ± 1,1	39,6 ± 5,2
Próbka 4	Lutrol® F68 (1,5% wag.)	Z-Ave [nm]	192,1 ± 0,4	180,9 ± 0,5
	-	PdI [-]	0,396 ± 0,005	0,374 ± 0,019
	CTAB (0,5% wag.)	ZP [mV]	39,7 ± 0,4	38,1 ± 0,7
Próbka 5	Lutrol® F68 (1,5% wag.)	Z-Ave [nm]	5618,0 ± 33,0	-
	Cholan sodu (0,1% wag.)	PdI [-]	0,380 ± 0,022	-
	-	ZP [mV]	-	-

W toku analizy wyników odnotowano, że:

- I. W D0 dla próbek 1–4, zawierających CTAB, uzyskane wartości Z-Ave potwierdziły pożądaną wielkość < 300 nm. Wielkość cząstek w próbce 5 znacząco przekraczała oczekiwany zakres. Na tej podstawie nie powtarzano już wariantu dyspersji niezawierającej CTAB. Potwierdzono tym samym konieczność zastosowania surfaktantu kationowego (0,5% wag.) jako składnika fazy lipidowej optymalizowanej dyspersji.
- II. Porównując próbki zawierające różne surfaktanty niejonowe – próbka 1 (Tween® 80 + cholan sodu + CTAB) oraz próbka 3 (Lutrol®F68 + cholan sodu + CTAB) – wskazano na korzystniejszy układ surfaktantów zawierający Tween® 80 (próbka 1). Należy przy tym zaznaczyć, że parametry próbki 4 – zarówno Z-Ave, jak i Pdl – także mieściły się w oczekiwanym zakresie. Jednak zmiany wartości Pdl dla próbki zawierającej Tween® 80 miały tendencję spadkową w czasie, co jest aspektem istotnym z punktu widzenia optymalizacji składu SLN.
- III. Wartości potencjału zeta dla wszystkich próbek, zarówno w D0, jak i w D14, utrzymywały się na pożądanym poziomie – przy wartości wyższej niż $|\pm 30 \text{ mV}|$ układ jest uważany za fizycznie stabilny [14]. Według Dąbrowskiej et al. [95] na wysokie i dodatnie wartości potencjału zeta wpływ miała obecność surfaktantu CTAB i jego kationowy charakter.

PODSUMOWANIE



W wyniku optymalizacji ustalono finalny skład ilościowy i jakościowy dyspersji SLN:

- I. **ZEWNĘTRZNA FAZA WODNA (I)** zawierała: 0,1% wag. cholanu sodu + 1,5% wag. Tween® 80 zdyspergowane w wodzie destylowanej;
- II. **FAZA TŁUSZCZOWA (II)** była złożona z: 1% wag. Imwitor® 900 K + 0,5% wag. CTAB + 0,25% wag. L-fosfatydylocholiny + 37,5% wag. gliceryny;
- III. **WEWNĘTRZNA FAZA WODNA (III)** – woda destylowana.

Nanocząstki lipidowe (otrzymane w oparciu o zoptymalizowany skład) charakteryzowały się następującymi parametrami fizykochemicznymi, które uznano za wyjściowe:

Z-Ave = $165,1 \pm 1,1 \text{ nm}$; **PDI** = $0,379 \pm 0,007 [-]$; **ZP** = $42,7 \pm 0,9 \text{ mV}$

4.4. Stabilność SLN

Kolejnym etapem badań, następującym po optymalizacji składu SLN, była inkorporacja nanocząstek lipidowych wspomnianymi wcześniej substancjami aktywnymi: retinolem (2% wag.) oraz oligopeptydem (0,1% wag.). Badanie stabilności przeprowadzono dla próbek w trzech kombinacjach:

- **Próbka 1 (B)** – „puste” – nieinkorporowane SLN;
- **Próbka 2 (R)** – SLN zawierające 2% wag. retinolu;
- **Próbka 3 (P + R)** – SLN enkapsulowane 0,1% wag. pentapeptydu-18 oraz 2% wag. retinolu.

Stabilność uzyskanych dyspersji zweryfikowano z wykorzystaniem urządzenia Zetasizer Nano ZS, uwzględniając ich trzy podstawowe parametry fizykochemiczne: Z-Ave [nm], Pdl [-] oraz ZP [mV]. Badanie przeprowadzono w dniu otrzymania nanocząstek lipidowych (D0) oraz po 7 (D7), 14 (D14), 21 (D21) i 28 dniach (D28) ich przechowywania w temperaturach 4°C, 25°C i 45°C. Procedura przygotowania próbek była analogiczna jak w opisana w podrozdziale 4.3. Ocena stabilności dyspersji nanocząstek lipidowych była konieczna ze względu na fakt, iż dyspersja ta miała się docelowo stać jedną ze składowych receptury kosmetycznej. Dobór warunków podwyższonej temperatury (45°C) związany był z testami starzeniowymi formułacji kosmetycznej, które wykonano w kolejnych etapach badań [95]. Wyniki uzyskane dla analizowanych dyspersji zebrano w tabeli 5, gdzie przedstawiono je w postaci wyrażonych w % zmian wartość poszczególnych parametrów fizykochemicznych w czasie przechowywania dyspersji SLN w różnych warunkach temperaturowych.

Tabela 5. Wpływ temperatur na parametry fizykochemiczna dyspersji SLN – badane stabilności.

	TEMPERATURA	Z-Ave [nm]	Pdl [-]	ZP [mV]
Próbka 1 (B)	4°C	↑ 4%	↑ 20%	↓10%
	25°C	↑ 35%	↑ 37%	↓28%
	45°C	↑ 77%	↑ 35%	↑5%
Próbka 2 (R)	4°C	↑ 62%	↑ 41%	↓9%
	25°C	↓ 4%	↑ 12%	↑19%
	45°C	↑ 24%	↑ 54%	↑4%
Próbka 3 (P+R)	4°C	↑ 37%	↑ 36%	↓4%
	25°C	↓ 16%	↓ 6%	↓7%
	45°C	↑ 32%	↑ 39%	↓2%

Na podstawie uzyskanych danych określono, że zmiany wartości średniej wielkości cząstek oraz wskaźnika polidispersyjności dyspersji uzależnione były zauważalnie od obecności substancji aktywnej. W toku badania potwierdzono stabilność badanych dyspersji nanocząstek lipidowych poddawanych działaniu różnych temperatur. **Najkorzystniejsze wyniki Z-Ave oraz Pdl uzyskano dla próbki numer 3, zawierającej obydwie substancje aktywne, tj. oligopeptyd oraz retinol.** Można także zauważyć, że najmniejsze wahania wartości oznaczanych parametrów odnotowano dla próbek przechowywanych w temperaturze 25°C, którą uznano za rekomendowaną dla docelowej dyspersji SLN. Co istotne, pomimo zauważalnych zmian wartości Z-Ave dla dyspersji 3, bez względu na warunki przechowywania, nie została przekroczona wartość 300 nm, natomiast wartość Pdl dla tej próbki nie przekroczyła wartości 0,3, uznanej w badaniu za wartość stanowiącą o stabilności dyspersji [28]. **Nie odnotowano istotnych statystycznie zmian wartości potencjału zeta** badanych próbek. Nie wykazano również korelacji pomiędzy obecnością lub brakiem inkorporowanych substancji aktywnych oraz zmiennymi warunkami temperaturowymi a uzyskanymi wynikami ZP. We wszystkich trzech próbkach (B, R, P+R) wartości te wynosiły więcej niż pożądana wartość ± 30 mV, zarówno w dniu otrzymania próbek (D0), jak i po 28 dniach (D28). Korzystne wyniki badania stabilności potwierdziły właściwy dobór poszczególnych składników zaprojektowanej dyspersji stałych nanocząstek lipidowych, przeznaczonej do wykorzystania w roli surowca kosmetycznego, w przypadku którego konieczne jest zastosowanie wysoce stabilnych struktur nośnikowych [85].

4.5. Badanie pH SLN

Oznaczenie pH dyspersji nanocząstek lipidowych wykonano równoległe z badaniem stabilności dla analogicznych próbek (podrozdział 4.4.). Badanie zostało wykonane w dniu produkcji (dzień 0, D0) i po 28 dniach (D28) przechowywania w trzech temperaturach (4°C, 25°C i 45°C). Procedurę pomiarową powtórzono trzykrotnie dla każdej badanej próbki (pH-metr EcoSense® pH 10 pH/Temperature Meter, Pen Style (VMR International, Radnor, USA), a uzyskane wyniki wyrażono jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe. Zmiany wartości pH badanych dyspersji w czasie i pod wpływem różnej temperatury przechowywania przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Zmiany pH dyspersji SLN przechowywanych w różnych warunkach temperaturowych przez 4 tygodnie.

	D0	D28/4°C	D28/25°C	D28/45°C
Próbka 1 (B)	5,47 \pm 0,04	5,01 \pm 0,02	5,33 \pm 0,06	4,65 \pm 0,01
Próbka 2 (R)	4,89 \pm 0,03	4,64 \pm 0,03	4,45 \pm 0,01	3,91 \pm 0,02
Próbka 3 (P+R)	4,64 \pm 0,04	4,53 \pm 0,03	4,37 \pm 0,05	3,97 \pm 0,02

Na podstawie analizy wyników uzyskanych po 4 tygodniach przechowywania dyspersji SLN w różnych temperaturach odnotowano, że:

- I. Obecność substancji aktywnych wpłynęła na nieznaczne obniżenie wartości pH dyspersji nanocząstek lipidowych. Różnica ta widoczna była zarówno w D0, jak i w D28, we wszystkich temperaturach przechowywania.
- II. Największy spadek wartości pH zaobserwowano dla próbek przechowywanych w podwyższonej temperaturze (45°C).
- III. Zmiany wartości pH dyspersji przechowywanych w pozostałych temperaturach nie były na tyle istotne, aby miały wpłynąć na stabilność inkorporowanych substancji aktywnych (ze względu niską wrażliwość retinolu oraz pentapeptydu wobec pH) [96], jak i stabilność docelowego produktu kosmetycznego, zawierającego optymalizowaną dyspersję SLN.

4.6. Charakterystyka SLN – pozostałe parametry [D3]

Podczas oceny skuteczności inkorporacji substancji aktywnych do nanocząstek lipidowych wykorzystano dwa parametry: (i) **efektywność enkapsulacji** (ang. *encapsulation efficiency*, EE) określaną jako stosunek ilości substancji aktywnej zainkorporowanej do nanocząstek lipidowych do całkowitej ilości wyjściowej, jaką zastosowano podczas ich produkcji, oraz (ii) **pojemność ładunkową** (ang. *loading capacity*, LC) wyrażającą ilość załadowanej substancji czynnej w stosunku do całkowitej masy składników lipidowych nośnika (Souto-bioavail). Według Guimaraes i Ré [97] EE dla związku czynnego o charakterze lipofilowym mieści się zazwyczaj w zakresie 90–98%, natomiast związki hydrofilowe, ze względu na słabsze powinowactwo do matrycy lipidowej, osiągają zauważalnie niższe wartości tego parametru. Efektywność enkapsulacji i pojemność ładunkową wykorzystywanych w badaniu związków aktywnych – retinolu oraz oligopeptydu – określono w sposób pośredni z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej (spektrofotometr UV-Vis Varian Cary 50 Bio, Varian Inc./Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), oznaczając ilość niezainkorporowanych substancji czynnych znajdujących w zewnętrznej fazie wodnej dyspersji SLN. Szczegółowa procedura pomiarowa opisana została szerzej w publikacji IJMS [D3]. Rozważając wyniki uzyskane dla pentapeptydu-18 – EE wynoszącą $75,7 \pm 0,4\%$ oraz LC na poziomie $21,6 \pm 0,1\%$ – odnotowano, że wartości te znacznie przekroczyły te uzyskiwane zwyczajowo dla związków o wysokim powinowactwie do wody. Jako powód tak skutecznej enkapsulacji oligopeptydu do SLN wskazano zastosowaną metodę produkcji nanocząstek, bazującą na emulsji wielokrotnej, gdzie peptyd znajduje się w fazie wody wewnętrznej. Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane dla retinolu, który był drugim związkiem aktywnym – EE = $91,9 \pm 0,3\%$ i LC = $52,5 \pm 0,1\%$ – potwierdzono prawidłowość wyboru danej metody otrzymywania SLN (metoda HSH) oraz odpowiedni dobór ilości retinolu względem zawartości składników matrycy lipidowej.

Dodatkowo matryce lipidowe SLN zostały scharakteryzowane z wykorzystaniem techniki dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego – **XRD** (dyfraktometr proszkowy D8 Advance w połączeniu z monochromatorem Johanssona/Bruker, Billerica, MA, USA) – oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej – **DSC** (skaningowy kalorymetr różnicowy DSC 8500/PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Analizie poddano zarówno próbki lipidów stałych, jak i dyspersje nanocząstek lipidowych (B – nieinkorporowane SLN; R – SLN zawierające retinol; P+R – SLN zawierające peptyd oraz retinol). Szczegółowe procedury pomiarowe oraz analizę wyników przedstawiono szerzej w publikacji IJMS [D3]. W toku analizy dyfraktogramu lipidu stałego Imwitor® 900 K zidentyfikowano dwa typowe refleksy dyfrakcyjne przy kącie $2\theta = 19,5^\circ$ i $23,2^\circ$, co wskazało na obecność metastabilnej formy polimorficznej β' lipidu. Z kolei na profilach krystalizacji uzyskanych dla wszystkich trzech dyspersji SLN zaobserwowano wyłącznie charakterystyczny pojedynczy sygnał, przypisany w tym przypadku formie α , w której znajduje się lipid tworzący matrycę SLN ze względu na przejście do wyższego poziomu energetycznego po wytworzeniu struktury nośnikowej. W ramach analizy DSC termogram uzyskany dla monostearynianu glicerolu przedstawiał pojedynczy pik przy temperaturze około 65°C . Natomiast na termogramach wykonanych dla dyspersji nanocząstek lipidowych odnotowano spadek temperatury topnienia o około $3\text{--}4^\circ\text{C}$, porównując lipid stały oraz badane dyspersje SLN. Stwierdzono, że kluczowe znaczenie w zakresie stanu polimorficznego lipidu miał tutaj sam proces produkcji SLN, gdyż otrzymanie struktur nanolipidowych wiązało się z przejściem lipidu z formy β poprzez formę β' i z powrotem do pożądanej formy α , co w pełni korespondowało z przedstawionymi wcześniej rezultatami analizy XRD. Nie odnotowano również wpływu inkorporacji związków aktywnych na postać polimorficzną lipidu matrycy SLN i jej stabilność, gdyż przesunięcie maksimum pików w kierunku niższych wartości temperatury było obserwowalne na zbliżonym poziomie na termogramach zarówno nieinkorporowanych, jak i enkapsulowanych dyspersji SLN.

Otrzymane wyniki zostały szerzej przedstawione oraz omówione w publikacji:

[D3] *Solid Lipid Nanoparticles Incorporated with Retinol and Pentapeptide-18 – Optimization, Characterization and Cosmetic Application,*

wydanym w czasopiśmie “International Journal of Molecular Sciences” 2024, 25,



5. Nośniki lipidowe inkorporowane retinolem i peptydem w produkcie kosmetycznym [D4]

5.1. Produkty kosmetyczne – preparatyka

Badania w ramach pracy doktorskiej przeprowadzono na czterech kremach do twarzy oraz dwóch kremach do pielęgnacji okolicy oczu do stosowania na noc, produkowanych przez firmę Dottore Polska Sp. z o.o. z siedzibą w Poznaniu, oznaczonych następująco:

AAN (anti-aging NANO)

PRZECIWMARSZCZKOWY KREM DO TWARZY NA NOC ZAWIERAJĄCY NANOCZĄSTKI LIPIDOWE INKORPOROWANE RETINOLEM I PENTAPEPTYDEM-18 (10,0% WAG.)

Ingredients (INCI): Aqua (A), Tripelargonin (D), Glycerin (D), Isopropyl Palmitate (D), Polyglyceryl-3 Dicitrate/Stearate (E), Persea Gratissima Oil (E), Glyceryl Stearate (E), Retinol (F), Pentapeptide-18 (G), Tocopheryl Acetate (F), Xanthan Gum (F), Benzyl Alcohol (F), Benzoic Acid (F), Polysorbate 80 (F), Dehydroacetic Acid (G), Tocopherol (G), Phosphatidylcholine (G), Cetrimonium Bromide (G), Sodium Cholate (G), Sodium Hydroxide (H), Tetrasodium Glutamate Diacetate (G), Parfum (F)

AAB (anti-aging BAZA)

PRZECIWMARSZCZKOWY KREM DO TWARZY NA NOC BEZ NANOCZĄSTEK LIPIDOWYCH

Ingredients (INCI): Aqua (A), Tripelargonin (D), Glycerin (D), Isopropyl Palmitate (D), Polyglyceryl-3 Dicitrate/Stearate (E), Persea Gratissima Oil (E), Glyceryl Stearate (E), Tocopheryl Acetate (F), Xanthan Gum (F), Benzyl Alcohol (F), Benzoic Acid (F), Dehydroacetic Acid (G), Tocopherol (G), Sodium Hydroxide (H), Tetrasodium Glutamate Diacetate (G), Parfum (F)

ACN (anti-acne NANO)

PRZECIWRĄDZIKOWY KREM DO TWARZY NA NOC ZAWIERAJĄCY NANOCZĄSTKI LIPIDOWE INKORPOROWANE RETINOLEM I PENTAPEPTYDEM-18 (5,0% WAG.)

Ingredients (INCI): Aqua (A), Citrullus Lanatus Seed Oil (D), Propanediol (E), Citrus Limon Fruit Extract (E), Isopropyl Palmitate (E), Glyceryl Stearate Citrate (E), Cetearyl Alcohol (E), Pentylene Glycol (E), Glyceryl Stearate (E), Squalane (E), Cannabis Sativa Seed Oil (E), Glycerin (E), Sodium PCA (E), Succinoglycan (F), Pentapeptide-18 (G), Retinol (F), Phosphatidylcholine (G), Cetrimonium Bromide (G), Sodium Cholate (G), Polysorbate 80 (F), Cannabidiol (G), Bioflavonoids (G), Raspberry Ketone (F), Tocopherol (G), Helianthus Annuus Seed Oil (F), Potassium Sorbate (G), Tetrasodium Glutamate Diacetate (G), Sodium Hydroxide (H), Trisodium NTA (H), Parfum (F)

ACB (anti-acne BAZA)

PRZECIWTRĄDZIKOWY KREM DO TWARZY NA NOC BEZ NANOCZĄSTEK LIPIDOWYCH

Ingredients (INCI): Aqua (A), Citrullus Lanatus Seed Oil (D), Propanediol (E), Citrus Limon Fruit Extract (E), Isopropyl Palmitate (E), Glyceryl Stearate Citrate (E), Cetearyl Alcohol (E), Pentylene Glycol (E), Glyceryl Stearate (E), Squalane (E), Cannabis Sativa Seed Oil (E), Glycerin (E), Sodium PCA (E), Succinoglycan (F), Cannabidiol (G), Bioflavonoids (G), Raspberry Ketone (F), Tocopherol (G), Helianthus Annuus Seed Oil (F), Potassium Sorbate (G), Tetrasodium Glutamate Diacetate (G), Sodium Hydroxide (H), Trisodium NTA (H), Parfum (F)

EYEN (anti-aging EYE-NANO)

PRZECIWSTARZENIOWY KREM POD OCZY NA NOC ZAWIERAJĄCY NANOCZĄSTECZKI LIPIDOWE INKORPOROWANE RETINOLEM I PENTAPEPTYDEM-18 (1,0% WAG.)

Ingredient (INCI): Aqua (A), Butylene Glycol (D), Coco-Caprylate/Caprata (D), Pentylene Glycol (E), Propanediol (E), Cetyl Alcohol (E), Glyceryl Stearate (E), Simmondsia Chinensis Seed Oil (E), Triisostearin (E), Glyceryl Stearate Citrate (E), Butyrospermum Parkii Butter (E), Theobroma Cacao Seed Butter (E), Glycerin (E), Cetyl Ricinoleate (E), Persea Gratissima Oil (E), Sodium Hyaluronate (E), Retinol (F), Acetyl Tetrapeptide-5 (G), Palmitoyl Tripeptide-5 (G), Palmitoyl Dipeptide-5 Diaminobutyroyl Hydroxythreonine (G), Tetradecyl Aminobutyroyl-valylaminobutyric Urea Trifluoroacetate (G), Pentapeptide-18 (G), Phosphatidylcholine (G), Cetrimonium Bromide (G), Sodium Cholate (G), Potassium Cocoyl Hydrolyzed Rice Protein (G), Sodium Cocoyl Amino Acids (G), Caprylic/Capric Triglyceride (F), Tocopheryl Acetate (F), Tocopherol (G), Helianthus Annuus Seed Oil (F), Raspberry Ketone (F), Stearyl Alcohol (F), Polysorbate 80 (F), Xanthan Gum (F), Magnesium Chloride (H), Tetrasodium Glutamate Diacetate (G), Sodium Hydroxide (H), Trisodium NTA(H), Parfum (F)

EYEB (anti-aging EYE-BAZA)

PRZECIWSTARZENIOWY KREM POD OCZY NA NOC BEZ NANOCZĄSTEK LIPIDOWYCH

Ingredients (INCI): Aqua (A), Butylene Glycol (D), Coco-Caprylate/Caprata (D), Pentylene Glycol (E), Propanediol (E), Cetyl Alcohol (E), Glyceryl Stearate (E), Simmondsia Chinensis Seed Oil (E), Triisostearin (E), Glyceryl Stearate Citrate (E), Butyrospermum Parkii Butter (E), Theobroma Cacao Seed Butter (E), Glycerin (E), Cetyl Ricinoleate (E), Persea Gratissima Oil (E), Sodium Hyaluronate (E), Acetyl Tetrapeptide-5 (G), Palmitoyl Tripeptide-5 (G), Palmitoyl Dipeptide-5 Diaminobutyroyl Hydroxythreonine (G), Tetradecyl Aminobutyroylvalylaminobutyric Urea Trifluoroacetate (G), Potassium Cocoyl Hydrolyzed Rice Protein (G), Sodium Cocoyl Amino Acids (G), Caprylic/Capric Triglyceride (F), Tocopheryl Acetate (F), Tocopherol (G), Helianthus Annuus Seed Oil (F), Raspberry

Ketone (F), Stearyl Alcohol (F), Xanthan Gum (F), Magnesium Chloride (H), Tetrasodium Glutamate Diacetate (G), Sodium Hydroxide (H), Trisodium NTA (H), Parfum (F)

Wprowadzenie nanocząstek lipidowych do produktów bazowych (AAB, ACB i EYEB) polegało na połączeniu bazy kosmetycznej z odpowiednią ilością dyspersji nanocząstek lipidowych przy ciągłym mieszaniu. Proces ten kontynuowano aż do uzyskania odpowiedniej konsystencji formułacji kosmetycznych wzbogaconych o nośniki lipidowe (AAN, ACN i EYEN). Zamieszczone powyżej składy INCI badanych kremów do twarzy i do pielęgnacji okolicy oczu przedstawiają również przybliżone zawartości poszczególnych składników w recepturze poprzez przypisanie ich do jednego z następujących zakresów: (A) 50-100% wag.; (B) 25-50% wag.; (C) 10-25% wag.; (D) 5-10% wag.; (E) 1-5% wag.; (F) 0,1-1% wag.; (G) < 0,1% wag.; (H) śladowe ilości.

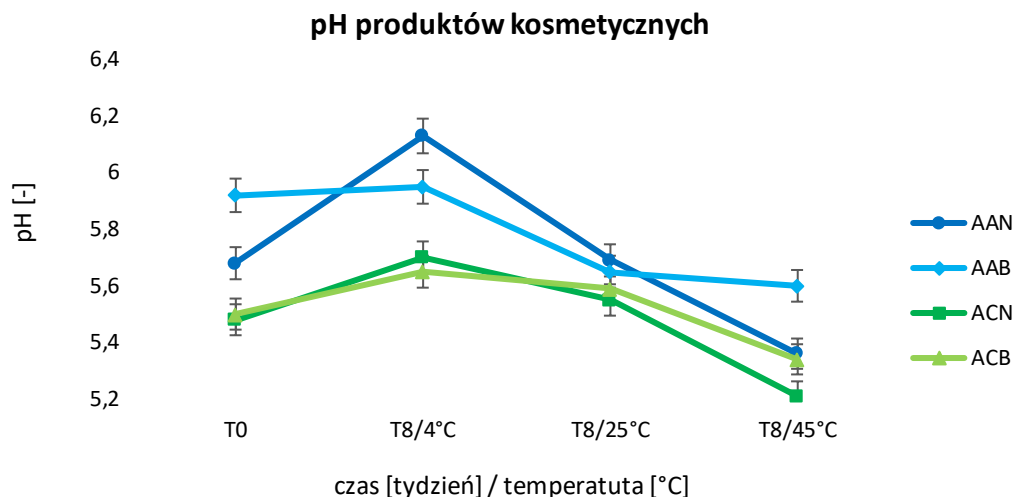
5.2. Badania fizykochemiczne produktów kosmetycznych

5.2.1. Badanie pH produktu kosmetycznego

Produkty kosmetyczne z grupy AA (anti-aging) i AC (anti-acne) zostały przebadane pod kątem stabilności pH w czasie przechowywania w różnych warunkach temperaturowych (4°C, 25°C, 45°C). Pomiar przeprowadzono w dniu wykonania emulsji (T0) oraz po 8 tygodniach ich przechowywania (T8). Wykonanie pomiaru związane było z przygotowaniem wodnego roztworu badanego preparatu kosmetycznego (0,1 mg kremu/ 20 ml wody destylowanej). Każdy pomiar pH wykonywano w trzech powtórzeniach. Z uzyskanych wyników obliczono wartość średnią \pm odchylenie standardowe.

W dniu rozpoczęcia badania (T0) pH badanych produktów kosmetycznych wyniosło: $5,68 \pm 0,03$ oraz $5,92 \pm 0,02$ odpowiednio dla AAN i AAB, oraz $5,48 \pm 0,03$ i $5,50 \pm 0,01$, odpowiednio dla ACN i ACB (rys.17). Po 8 tygodniach przechowywania próbek (T8) w różnych temperaturach zaobserwowano, że:

- niezależnie od składu samej bazy kosmetycznej i obecności SLN obniżenie temperatury przechowywania do 4°C wpłynęło na nieznaczny wzrost pH produktu, średnio o 8, 1, 4 oraz 3%, odpowiednio dla AAN, AAB, ACN oraz ACB;
- najmniejsze wahania wartości pH uzyskano dla próbek produktów kosmetycznych przechowywanych w temperaturze pokojowej, którą uznano z tego powodu za rekomendowaną temperaturę przechowywania preparatów kosmetycznych opracowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej;
- przechowywanie produktów w temperaturze podwyższonej (45°C) spowodowało obniżenie pH wszystkich testowanych formułacji kosmetycznych. W przypadku kremów z grupy AA odnotowano spadek pH o 6% (AAN) i 5% (AAB). Natomiast dla preparatów z grupy AC obniżenie pH zostało określone na poziomie 5% dla ACN, natomiast 3% dla ACB.



Rysunek 17. Zmiany pH formułacji kosmetycznych przechowywanych w różnych temperaturach (4°C, 25°C, 45°C) przez 8 tygodni (opracowanie własne).

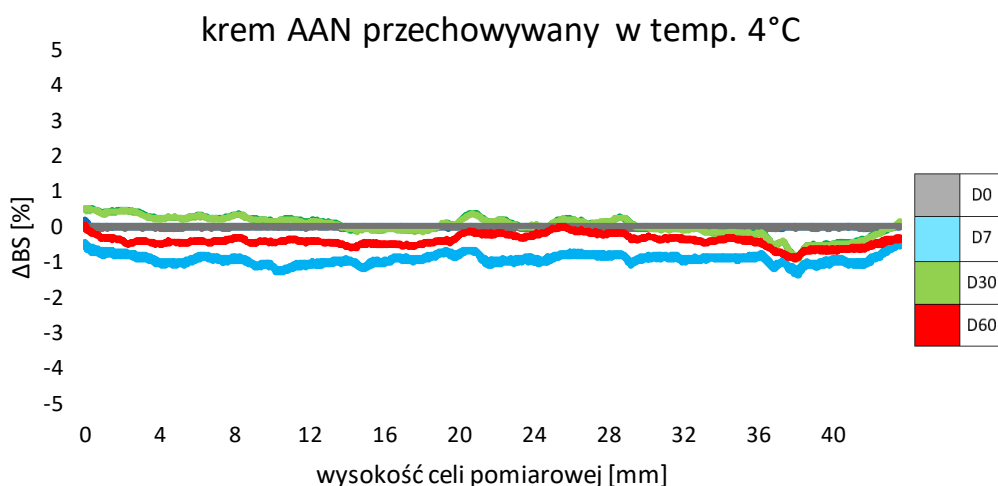
5.2.2. Badanie stabilności masy kosmetycznej – TurbiScan®

Badanie stabilności opracowanych produktów kosmetycznych przeprowadzono z wykorzystaniem metody wielokrotnego rozpraszania światła (ang. *multiple light scattering*, MLS), biorąc pod uwagę: (i) zmiany **intensywności wstecznego rozpraszania światła** (ang. *backscattering*, ΔBS), umożliwiające wykrycie niewidocznych gołym okiem zjawisk destabilizujących w nietransparentnym i nierozcieńczonym układzie dyspersyjnym [98], oraz (ii) **wskaźnik stabilności** (ang. *Turbiscan stability index*, TSI), który odzwierciedla wszystkie zjawiska o charakterze niestabilności pojawiające się w próbce [28], [99]. Przyjmuje się, że im niższa wartość TSI, tym bardziej stabilna jest oceniana formułacja kosmetyczna [100].

Kremy z grupy AA i AC przechowywano przez 60 dni w trzech temperaturach: 4°C, 25°C oraz 45°C. Rozważając wyniki dotyczące wskaźnika stabilności określono, że:

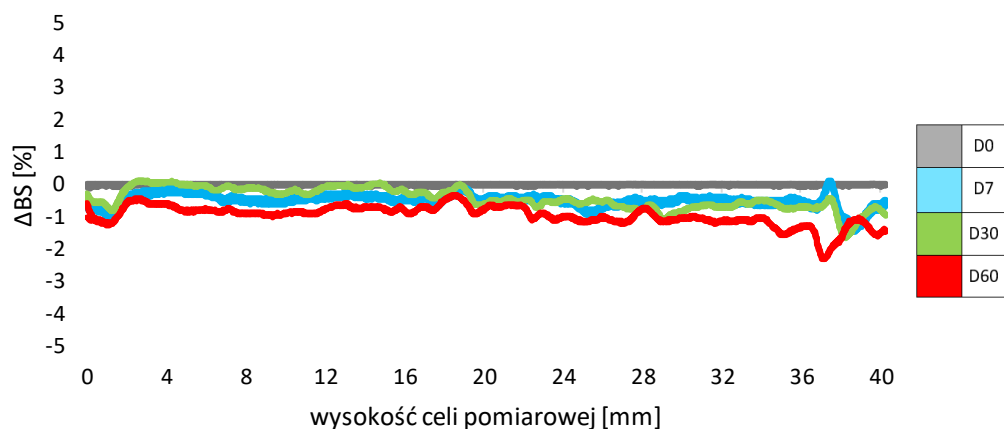
- temperatury przechowywania 4°C oraz 25°C nie miały znaczącego wpływu na stabilność emulsji z grupy AA zawierającej nanocząstki lipidowe (AAN) oraz samej bazy kosmetycznej (AAB). Wartości TSI po 60 dniach badania nie przekraczały 2. Wynik ten świadczył o braku obecności zjawisk o charakterze niestabilności. Analogiczne wyniki uzyskano w przypadku preparatów z grupy AC, gdzie TSI w dniu 60. nie przekroczyło, zarówno dla ACN oraz ACB, wartości 1,5;
- przechowywanie produktów z grupy AA w temperaturze 45°C skutkowało znaczącym wzrostem wartości TSI, odnotowanym dla próbki AAN z 1,75 (D30) do 7,55 (D60), natomiast dla próbki AAB z 5,61 (D30) do 9,09 (D60). W przypadku kosmetyków z grupy AC, odnotowane wzrosty TSI nie były aż tak znaczące, a wartości parametru w dniu 60. wyniosły 2,56 oraz 5,67, odpowiednio dla ACB oraz ACN.

Dla każdej analizowanej próbki preparatu kosmetycznego otrzymano również wyniki w postaci profilu ΔBS , gdzie oś odciętych odzwierciedla wysokość fiolki pomiarowej, natomiast na osi rzędnych przedstawiona została intensywność światła wstecznie odbitego [28, 99, 101]. Wnioski sformułowane na podstawie analizy profili ΔBS produktów kosmetycznych (rys. 18–29) korespondowały z przedstawionymi powyżej wynikami dotyczącymi wskaźnika stabilności. Odnotowano porównywalną zmianę intensywności światła wstecznie odbitego w całej objętości próbki emulsji przechowywanych w temperaturze obniżonej 4°C oraz pokojowej 25°C przez okres 60 dni. Różnice zdeterminowano wyłącznie w wyższych partiach fiolki pomiarowej. Co jednak istotne, pojawiające się zmiany o charakterze niestabilności nie przekraczały poziomu 10%, uznawanego za wartość graniczną dla formułacji stabilnych [102]. Nie zaobserwowano również zmian kształtu profili ΔBS świadczących o pojawieniu się zjawiska śmietanowania czy sedimentacji. Podobnie jak w przypadku TSI, najmniej korzystne wyniki, otrzymane na podstawie profilu ΔBS , uzyskano dla próbek kosmetyków przechowywanych w temperaturze 45°C, która okazała się zdecydowanie nieodpowiednia do przechowywania produktów kosmetycznych opracowanych w ramach pracy doktorskiej.



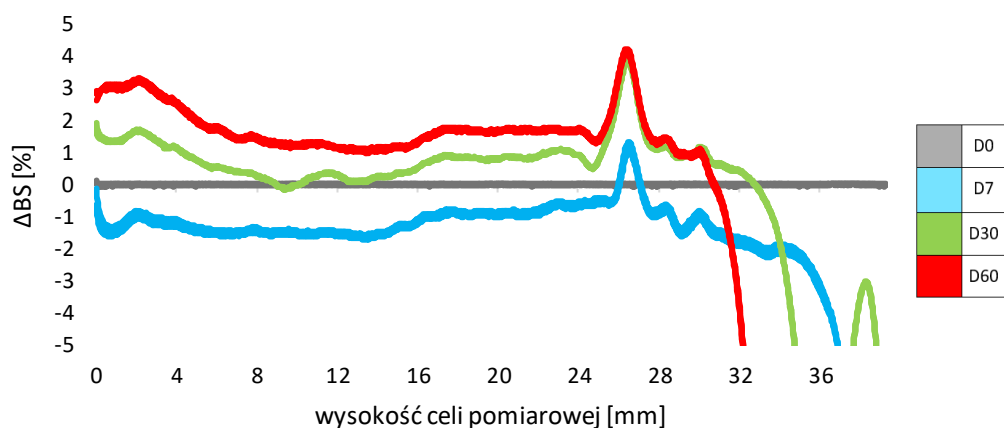
Rysunek 18. Zmiany intensywności światła rozproszonego wstecznie dla AAN przechowywanego w temperaturze 4°C przez 60 dni (opracowanie własne).

krem AAN przechowywany w temp. 25°C



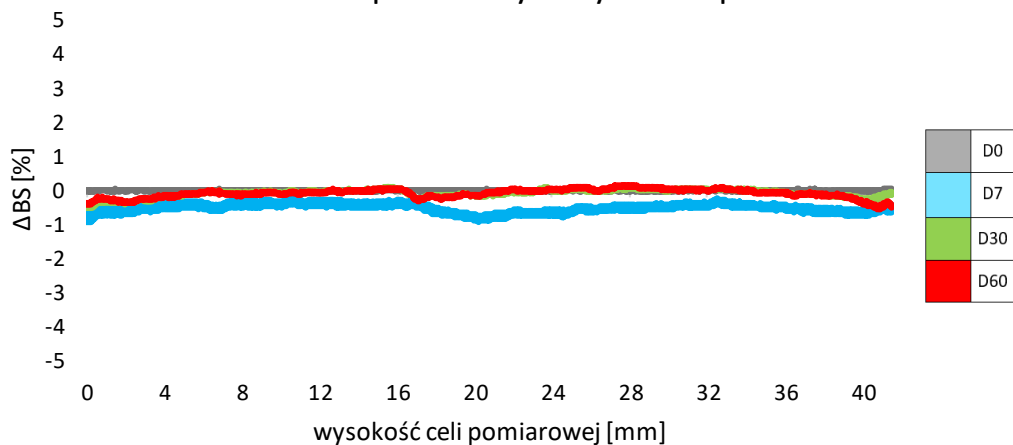
Rysunek 19. Zmiany intensywności światła rozproszonego wstecznie dla AAN przechowywanego w temperaturze 25°C przez 60 dni (opracowanie własne).

krem AAN przechowywany w temp. 45°C



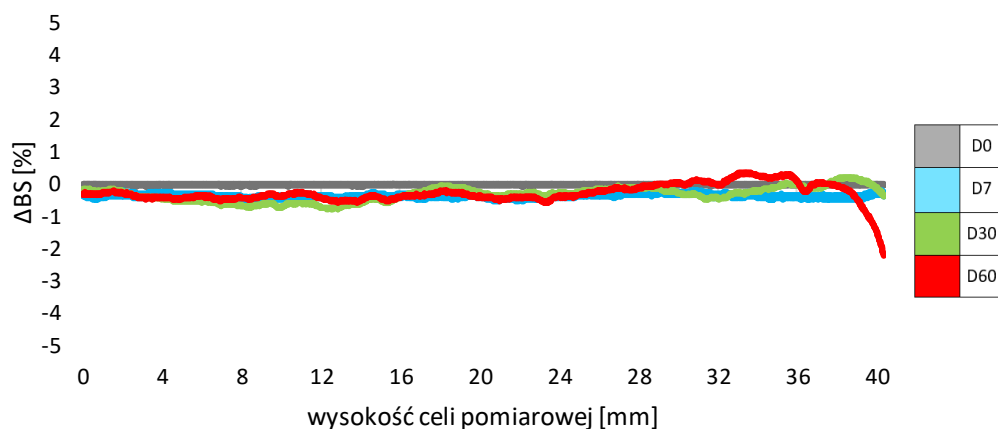
Rysunek 20. Zmiany intensywności światła rozproszonego wstecznie dla AAN przechowywanego w temperaturze 45°C przez 60 dni (opracowanie własne).

krem AAB przechowywany w temp. 4°C



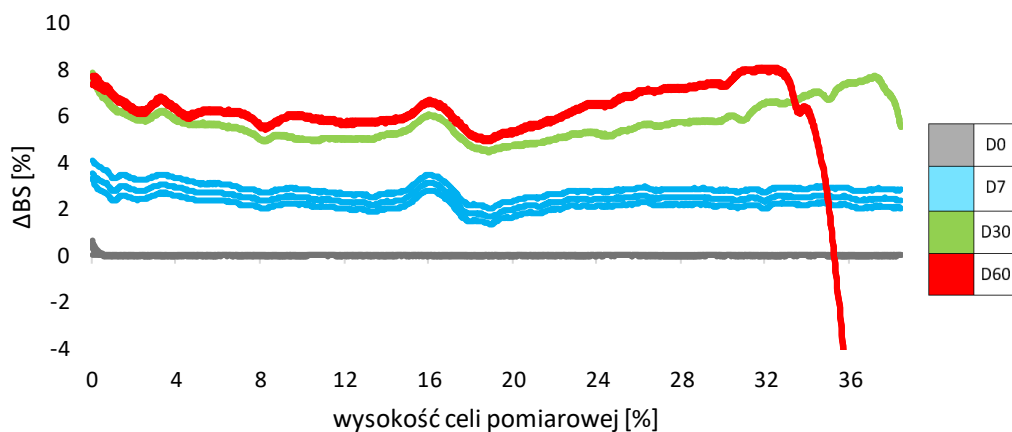
Rysunek 21. Zmiany intensywności światła rozproszonego wstecznie dla AAB przechowywanego w temperaturze 4°C przez 60 dni (opracowanie własne).

krem AAB przechowywany w temp. 25°C



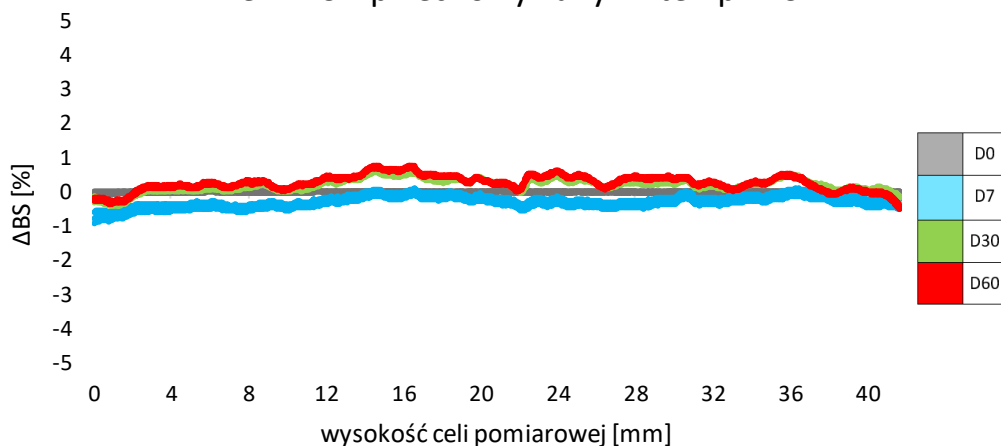
Rysunek 22. Zmiany intensywności światła rozproszonego wstecznie dla AAB przechowywanego w temperaturze 25°C przez 60 dni (opracowanie własne).

krem AAB przechowywany w temp. 45°C



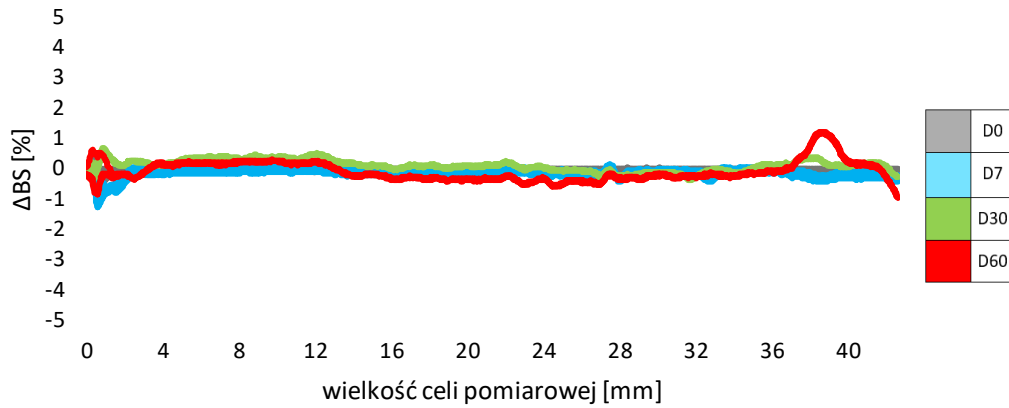
Rysunek 23. Zmiany intensywności światła rozproszonego wstecznie dla AAB przechowywanego w temperaturze 45°C przez 60 dni (opracowanie własne).

krem ACN przechowywany w temp 4°C



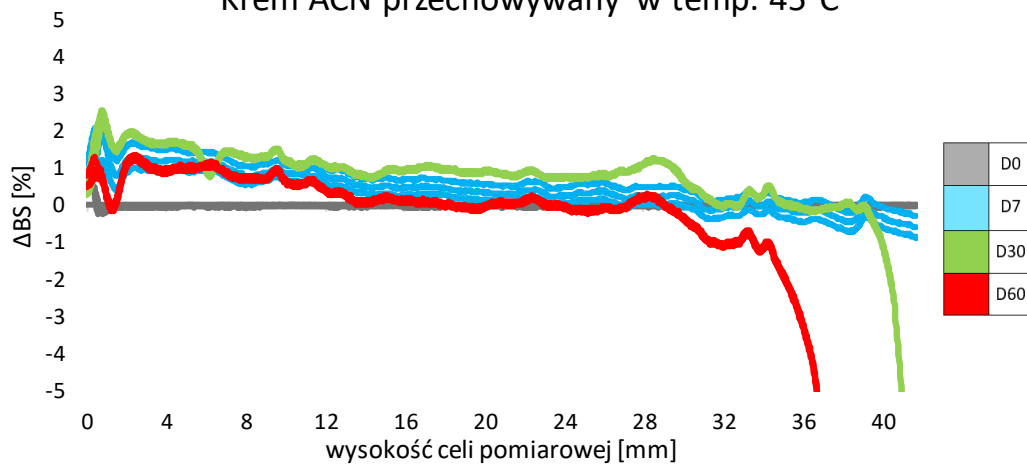
Rysunek 24. Zmiany intensywności światła rozproszonego wstecznie dla ACN przechowywanego w temperaturze 4°C przez 60 dni (opracowanie własne).

krem ACN przechowywany w temp. 25°C



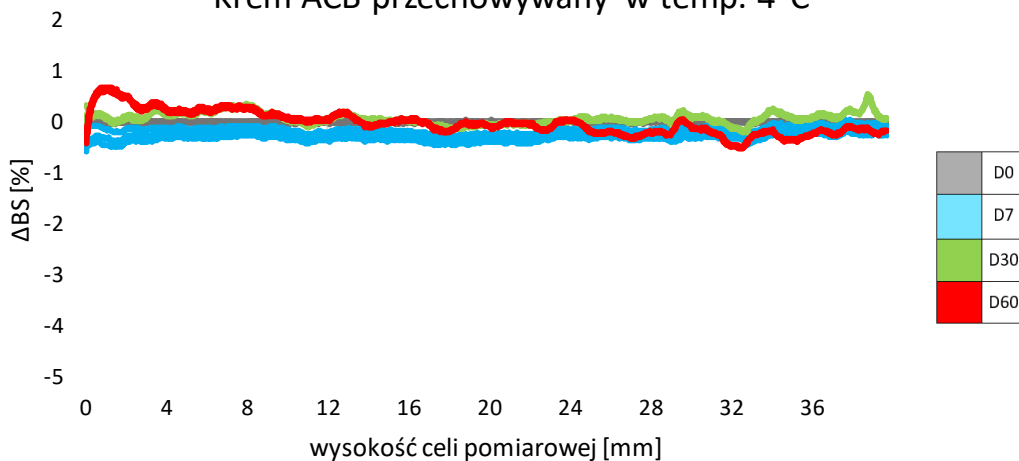
Rysunek 25. Zmiany intensywności światła rozproszonego wstecznie dla ACN przechowywanego w temperaturze 25°C przez 60 dni (opracowanie własne).

Krem ACN przechowywany w temp. 45°C



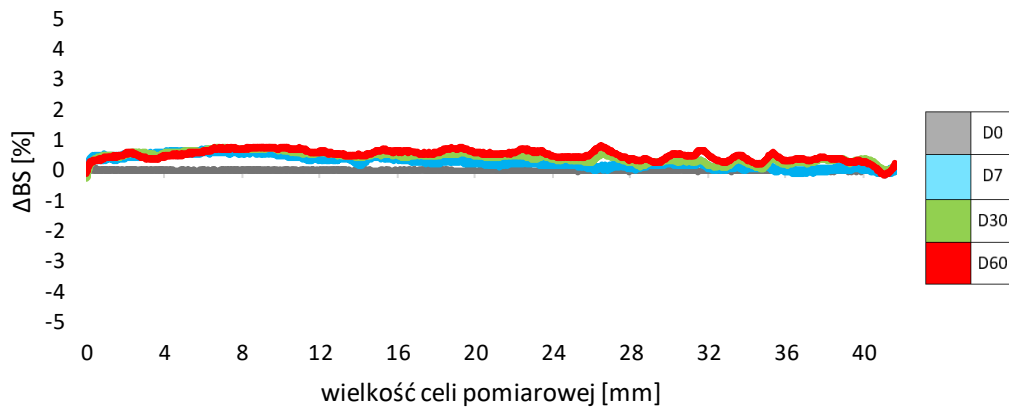
Rysunek 26. Zmiany intensywności światła rozproszonego wstecznie dla ACN przechowywanego w temperaturze 45°C przez 60 dni (opracowanie własne).

Krem ACB przechowywany w temp. 4°C



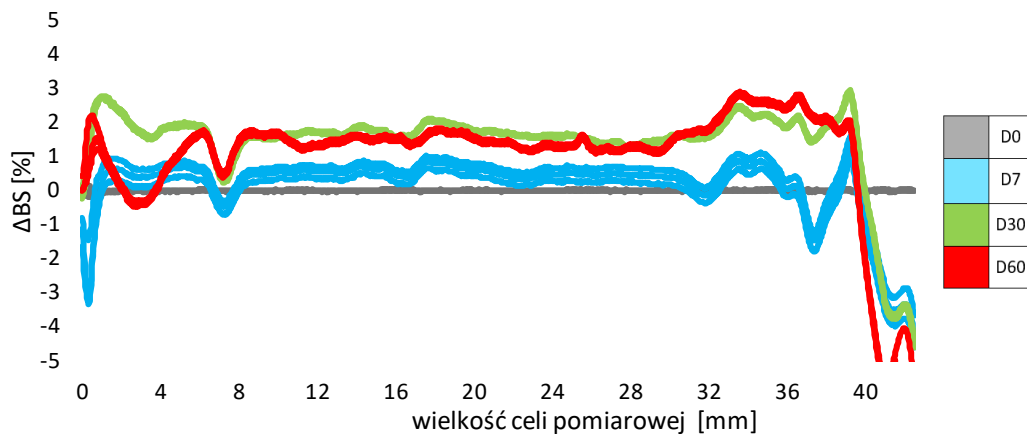
Rysunek 27. Zmiany intensywności światła rozproszonego wstecznie dla ACB przechowywanego w temperaturze 4°C przez 60 dni (opracowanie własne).

krem ACB przechowywany w temp. 25°C



Rysunek 28. Zmiany intensywności światła rozproszonego wstecznie dla ACB przechowywanego w temperaturze 25°C przez 60 dni (opracowanie własne).

Krem ACB przechowywany w temp. 45°C



Rysunek 29. Zmiany intensywności światła rozproszonego wstecznie dla ACB przechowywanego w temperaturze 45°C przez 60 dni (opracowanie własne).

Dokładny przebieg badania stabilności produktów kosmetycznych w deklarowanym czasie oraz warunkach przechowywania przedstawiono w artykule:

[D4] Retinol and Oligopeptide-loaded Lipid Nanocarriers as Effective Raw Material in Anti-acne and Anti-aging Therapies,

w czasopiśmie „Life” 2024, 14 (10), 1212.



5.3. Badanie efektywności działania produktów kosmetycznych (*in vivo*)

Ostatnim etapem oceny skuteczności zaprojektowanych formułacji kosmetycznych oraz ich wpływu na parametry skóry było badanie *in vivo* przeprowadzone z wykorzystaniem nieinwazyjnych metod w celu potwierdzenia deklarowanych właściwości badanych produktów kosmetycznych. Panel ochotników składał się z dwóch 20-osobowych grup. Kryteriami wyboru ochotniczek do pierwszej grupy (anti-aging, AA), w przedziale wiekowym 30–65 lat, były objawy starzenia się skóry, tj. zmarszczki oraz utrata elastyczności i jędrności skóry. W przypadku grupy drugiej (anti-acne, AC), w przedziale wiekowym 18–65 lat, przyjęto kryteria takie jak: niedoskonałości oraz stany zapalne skóry, z naciskiem na trądzikowe podłoże zmian. Każda ochotniczka otrzymała do testowania po dwa produkty kosmetyczne (kremy do twarzy na noc): grupa AA – krem AAN (anti-aging NANO) oraz AAB (anti-aging BAZA); grupa AC – ACN (anti-acne NANO) oraz ACB (anti-acne BAZA). Ponadto spośród wszystkich 40 aplikantek wybrano 20 osób, które poza kremami do twarzy otrzymały także produkt do pielęgnacji okolicy oczu. Wytypowane ochotniczki w wieku 30–65 lat wykazywały objawy starzenia się skóry w okolicy oczu, takie jak zmarszczki oraz wiotkość skóry. Każda z tych ochotniczek otrzymała dwa preparaty kosmetyczne: EYEN (krem pod oczy NANO) oraz EYEB (krem pod oczy BAZA).

Badanie aplikacyjne trwało 8 tygodni, a pomiary parametrów biofizycznych skóry były wykonywane w dniu rozpoczęcia badania (T0) oraz w tygodniu 4 i 8 (T4 i T8). W pierwszym dniu testów wszystkie ochotniczki zostały poinformowane o charakterze prowadzonych działań, podpisały formularz świadomej zgody na uczestnictwo w badaniu (załącznik 1) oraz otrzymały pisemne materiały informacyjne o stosowaniu testowanych produktów kosmetycznych (załącznik 2). W 8. tygodniu badania, po zakończeniu okresu stosowania produktów kosmetycznych, ochotniczki wypełniły subiektywną ankietę dotyczącą odczuć aplikacyjnych i efektywności działania testowanych produktów. Wszelkie działania niepożądane miały być zgłaszane badaczowi na dowolnym etapie trwania testów aplikacyjnych.

Badanie *in vivo* zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w dniu 12 października 2023 r. uchwałą nr 768/23. Pomiary wybranych parametrów biofizycznych skóry zostały przeprowadzone z wykorzystaniem zestawu urządzeń Courage + Khazaka electronic GmbH (Kolonia, Niemcy): (i) **Tewameter® TM 300** (poziom przesnaskórkowej utraty wody, TEWL); (ii) **Corneometer® CM 825** (poziom nawilżenia skóry); (iii) **Cutometer® MPA 580** (elastyczność skóry); (iv) **Sebumeter® SM 815** (ilość sebum wydzielanego przez skórne gruczoły łojowe); (v) **Visioline® VL 650** (parametry makrorzeźby skóry); (vi) **Visioscan® VC 98** (parametry topografii skóry).

Szczegółowy przebieg badań aplikacyjnych oraz analiza otrzymanych wyników zostały szerzej opisane w artykułach:

[D3] *Solid Lipid Nanoparticles Incorporated with Retinol and Pentapeptide-18 – Optimization, Characterization, and Cosmetic Application*,

w czasopiśmie „INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES” 2024, 25, 10078; (produkt kosmetyczny z grupy EYE)



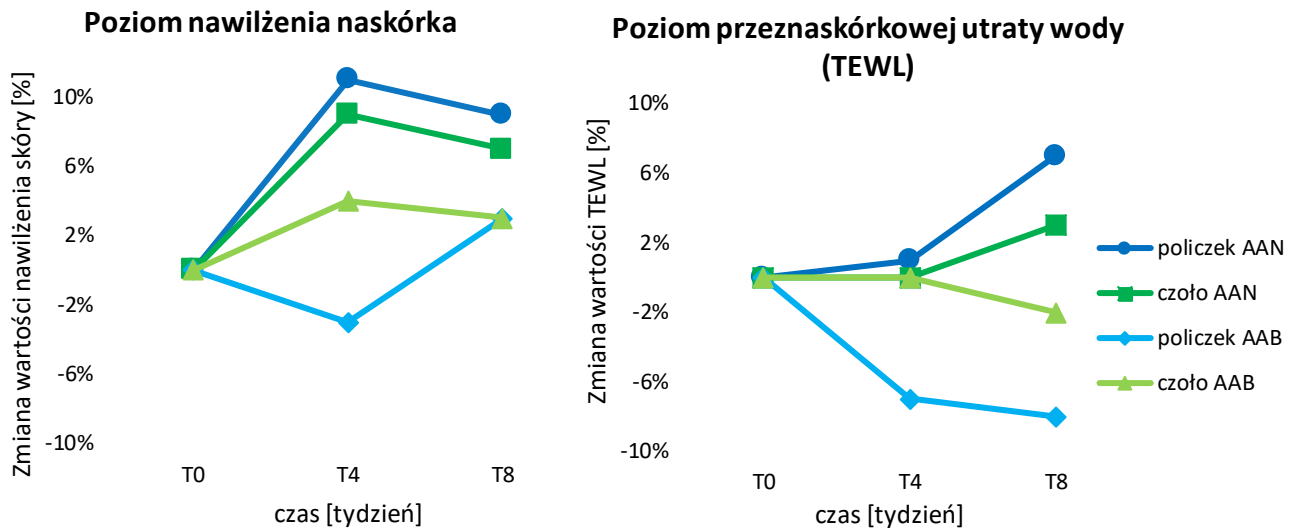
[D4] *Retinol and Oligopeptide-loaded Lipid Nanocarriers as Effective Raw Material in Anti-acne and Anti-aging Therapies*,

w czasopiśmie „Life” 2024, 14 (10), 1212; (produkty kosmetyczne z grupy AA oraz AC)

5.3.1. Poziom nawilżenia skóry i przesnaskórkowej utraty wody

Produkty kosmetyczne z grupy AA (anti-aging)

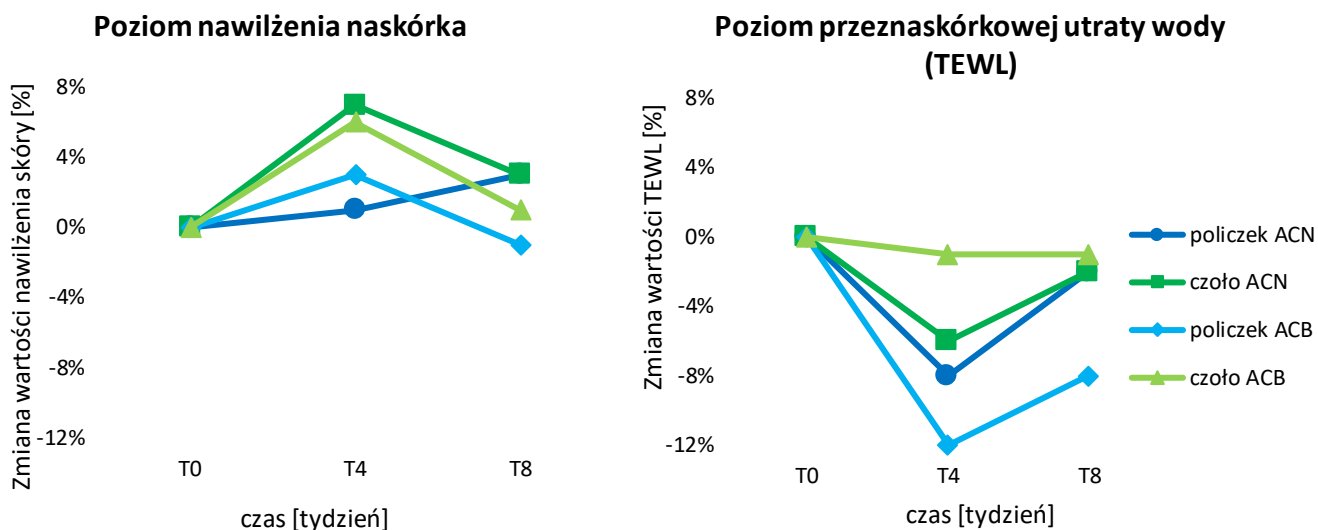
Produkt kosmetyczny AAN, zawierający SLN inkorporowane retinolem i oligopeptydem (10% wag.), wykazał silniejsze właściwości nawilżające w porównaniu z bazą kosmetyczną (preparat AAB), niezawierającą nanocząstek z substancjami aktywnymi (rys. 30, lewa strona). Po 8 tygodniach stosowania kremu AAN poziom nawilżenia skóry w porównaniu z tygodniem 0. wzrósł o 9% w przypadku policzka oraz o 7% w okolicy czoła ($p < 0,05$). W przypadku AAB odnotowano jedynie 3-procentowy wzrost nawilżenia dla obu badanych obszarów skóry ($p < 0,05$). Analizując wyniki uzyskane w zakresie TEWL (rys. 30, prawa strona), po 8 tygodniach stosowania produktu AAN zaobserwowano 7-procentowy wzrost wartości tego parametru na skórze policzka oraz 3-procentowy, biorąc pod uwagę czoło ($p < 0,05$). Natomiast aplikacja kremu AAB wpłynęła na obniżenie wartości TEWL w okolicy policzka średnio o 8% ($p < 0,05$). W przypadku skóry czoła zmiany uznano za nieistotne statystycznie w porównaniu ze stanem wyjściowym.



Rysunek 30. Zmiany nawilżenia skóry i przesnaskórkowej utraty wody (TEWL) określone dla preparatów AAN i AAB podczas badań *in vivo* po 8-tygodniowym okresie stosowania (opracowanie własne).

Produkty kosmetyczne z grupy AC (anti-acne)

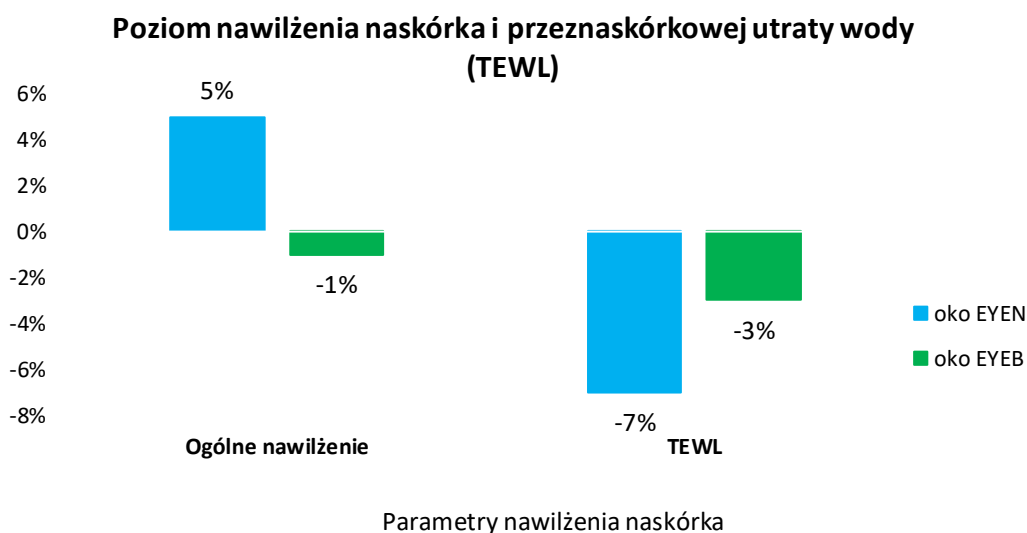
W przypadku drugiej grupy testowanych produktów kosmetycznych (anti-acne) – w tym kosmetyku ACN z 5-procentową zawartością opracowanej dyspersji SLN – zaobserwowano wzrost nawilżenia skóry po 8 tygodniach (T8) stosowania produktu, który wyniósł 3% zarówno w okolicy policzka i czoła ($p < 0,05$) (rys. 31, lewa strona). Dla porównania, wyniki odnotowane w T8 dla kremu ACB (bazy bez SLN) wykazały wartości nieistotnie statystycznie w porównaniu ze stanem wyjściowym w T0. Co więcej, w przypadku preparatu ACN zauważono spadek wartości TEWL – zarówno na policzku, jak i na czole – o 2% dla obu badanych obszarów w 8. tygodniu testów aplikacyjnych (T8) w porównaniu z wyjściowymi parametrami zebranymi w dniu rozpoczęcia badań (T0) ($p < 0,05$) (rys. 31, prawa strona). W przypadku produktu ACB zaobserwowano natomiast redukcję wartości TEWL o 8% na policzku ($p < 0,05$), natomiast zmiany w okolicy czoła określono jako statystycznie nieznaczące.



Rysunek 31. Zmiany nawilżenia skóry i przesnaskórkowej utraty wody (TEWL) określone dla preparatów ACN i ACB podczas badań *in vivo* po 8-tygodniowym okresie stosowania (opracowanie własne).

Produkty kosmetyczne z grupy EYE (anti-aging EYE)

Poziom zawartości wody w naskórku wzrósł o 5% po 8 tygodniach stosowania (T8) kremu pod oczy EYEN ($p < 0,05$) (rys. 32). W przypadku parametru TEWL odnotowano 7-procentowy spadek jego wartości w porównaniu z wartościami wyjściowymi ($p < 0,05$). Dla porównania preparat EYEB, który nie zawierał nanocząstek lipidowych, spowodował nieznaczny spadek stopnia nawilżenia naskórka – o 1% – oraz 3-procentowy spadek poziomu TEWL w porównaniu z badaniem wykonanym w T0 ($p < 0,05$).



Rysunek 32. Zmiany nawilżenia skóry i przesnaskórkowej utraty wody (TEWL) określone dla preparatów EYEN i EYEB podczas badań *in vivo* po 8-tygodniowym okresie stosowania (opracowanie własne).

Obecność nanocząstek lipidowych w składzie opracowanych produktów kosmetycznych wpłynęła na wzrost nawilżenia w niższych warstwach naskórka przy jednoczesnym zachowaniu funkcji barierowych skóry. Zależność ta wynikała ze zdolności

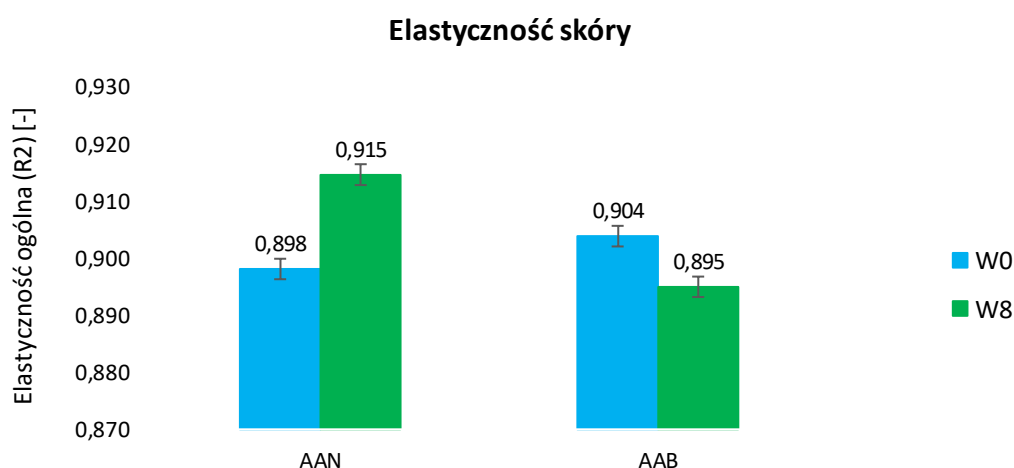
nanocząstek lipidowych do regeneracji zewnętrznych warstw skóry poprzez wbudowywanie związków lipidowych w macierz międzykomórkową warstwy rogowej naskórka [95]. Zaobserwowano różnicę w poziomach nawilżenia naskórka, będącą wynikiem aplikacji kremów zawierających substancje aktywne w postaci SLN (AAN, ACN, EYEN) – w porównaniu do ich odpowiedników bazowych (AAB, ACB, EYEB). Zmiany związane z nieznacznym wzrostem transepidermalnej ucieczki wody, które odnotowano po 8 tygodniach stosowania produktów kosmetycznych, spowodowane były obecnością retinolu, który wykazuje keratolityczne działanie na skórę [103]. Niemniej jednak, pomimo wzrostu wartości TEWL, poziom nawilżenia skóry utrzymywał się na optymalnym poziomie, a jego wartość była nawet wyższa niż przed rozpoczęciem badania (T0).

5.3.2. Elastyczność skóry

Określenie parametrów biomechanicznych skóry, w tym bezwymiarowego współczynnika elastyczności ogólnej R2, umożliwiło ocenę skuteczności przeciwstarzeniowej produktów kosmetycznych z grupy AA oraz EYE. Im wyższa jest wartość współczynnika R2 i im bardziej zbliża się ona do jedności (1), tym bardziej elastyczna i jędrna jest skóra badanego obszaru [104].

Produkty kosmetyczne z grupy AA (anti-aging)

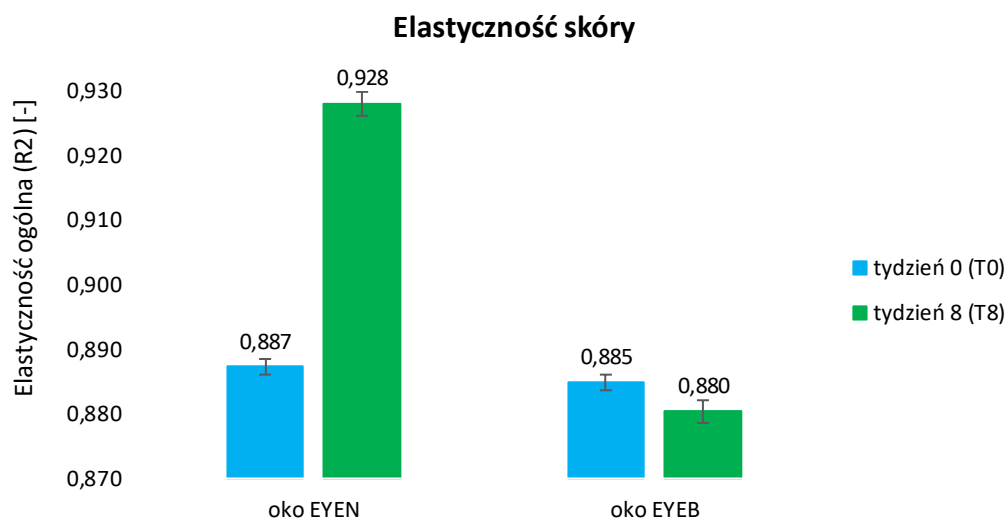
Po 8 tygodniach stosowania preparatu AAN odnotowano poprawę elastyczności skóry o około 2% ($p < 0,05$), podczas gdy formuła AAB nie spowodowała zmian w elastyczności skóry uznawanych za istotne statystycznie (rys. 33).



Rysunek 33. Zmiana elastyczności i sprężystości skóry w czasie stosowania produktów kosmetycznych z grupy anti-aging AA (AAN i AAB) podczas badań *in vivo* po 8-tygodniowym okresie stosowania ($p < 0,05$) (opracowanie własne).

Produkty kosmetyczne z grupy EYE (anti-aging EYE)

Poprawa elastyczności i jędrności skóry została zweryfikowana po stosowaniu kremów EYEN i EYEB trwającym 8 tygodni. W przypadku EYEN zauważono znaczny wzrost współczynnika R2. Odnotowano 4-procentową poprawę elastyczności skóry dla kremu EYEN (z nanocząstką) i 1-procentowy spadek elastyczności skóry dla kremu EYEB (rys. 34), co w odniesieniu do wyników z dnia rozpoczęcia badania uznano za zmianę nieistotną statystycznie.

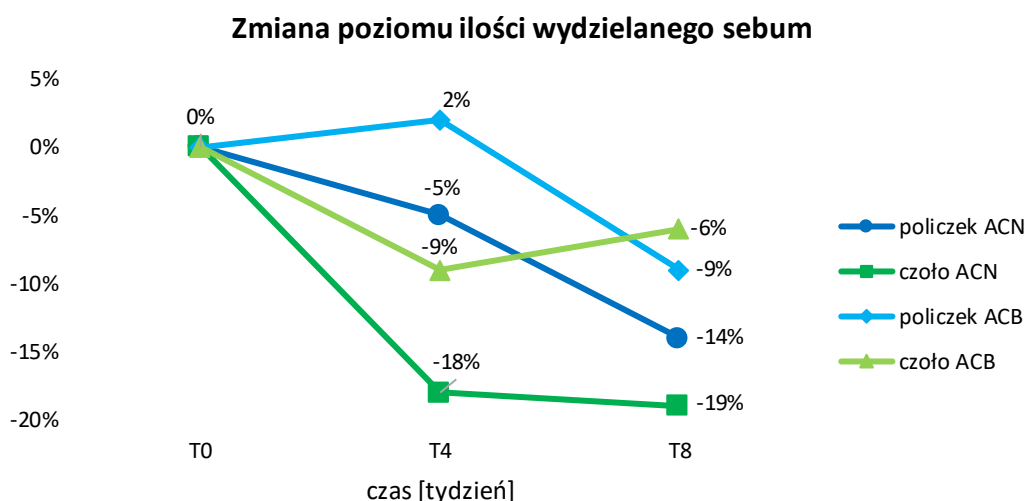


Rysunek 34. Zmiana elastyczności i sprężystości skóry w czasie stosowania produktów kosmetycznych z grupy anti-aging EYE (EYEN i EYEB) podczas badań *in vivo* po 8-tygodniowym okresie stosowania ($p < 0,05$) (opracowanie własne).

Podczas analizy otrzymanych wyników zarówno w przypadku formułacji AAN, jak i w przypadku formułacji EYEN zauważono znaczną poprawę sprężystości i jędrności skóry w porównaniu z formułacjami bazowymi (AAB i EYEB). Addytywne działanie retinolu oraz oligopeptydu spowodowało poprawę gęstości i elastyczności skóry. Mogło to wynikać z działania tych substancji aktywnych na struktury skóry poprzez korzystny wpływ w zakresie syntezy kolagenu oraz elastyny [105]. Na poprawę elastyczności skóry mogło wpłynąć także właściwe nawilżenie naskórka. Skóra sucha i odwodniona jest zazwyczaj mniej elastyczna i bardziej sztywna w porównaniu ze skórą charakteryzującą się odpowiednim stopniem nawodnienia [106].

5.3.3. Poziom sebum (grupa AC)

Produkty kosmetyczne z grupy AC, z powodu obecności substancji aktywnych przeznaczonych dla skór tłustych i mieszanych, zostały przebadane także przy pomocy głowicy Sebumeter®. Zgodnie z założeniami pomiaru poziomu wydzielanego sebum, im bliższy 0 jest uzyskany wynik, tym większą aktywność seboregulującą wykazuje skóra [107]. Podczas 8-tygodniowego użytkowania produktu ACN i ACB zauważono wyraźną poprawę w zakresie zmniejszenia produkcji sebum we wszystkich badanych obszarach (na skórze policzków oraz czoła) (rys. 35). Stosowanie ACN pozwoliło zredukować wartość parametru związanego z seboregulacją o 14% w okolicy policzka oraz o 18% na czole ($p < 0,05$). Parametr ten poprawił się nieznacznie także pod wpływem aplikacji kremu ACB, jednak w tym przypadku redukcja osiągnęła poziom odpowiednio 9% i 6% w okolicach policzka i czoła (T8) ($p < 0,05$).

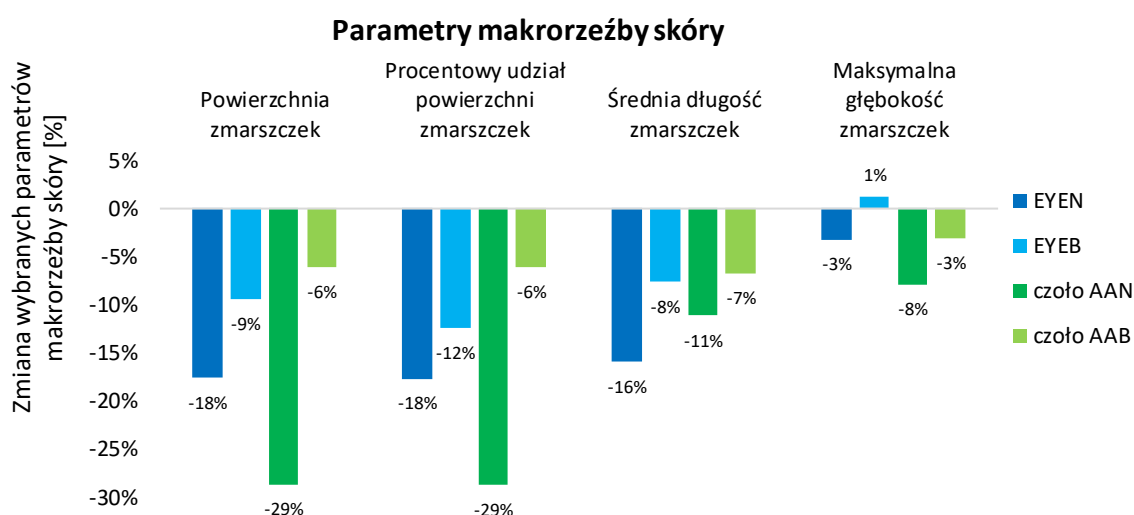


Rysunek 35. Redukcja ilości sebum wydzielanego przez skórę w czasie stosowania produktów kosmetycznych ACN i ACB podczas badań *in vivo* po 8-tygodniowym okresie stosowania (opracowanie własne).

Na podstawie uzyskanych wyników uznano, że dobór surowców konsystencjotwórczych kremów z grupy AC był dostosowany do pielęgnacji skóry wymagającej regulacji pracy gruczołów łojowych i tym samym regulacji ilości wydzielanego sebum. Natomiast obecność substancji aktywnych powodowała efekt addytywny. Kremy z grupy AC wykazały wysoką skuteczność w pielęgnacji u ochotniczek ze skórą trądzikową i z niedoskonałościami. Można jednoznacznie stwierdzić, iż przy długotrwałym stosowaniu kosmetyk ACN przyniósł wymierne korzyści – zarówno zmniejszenie nadprodukcji sebum, jak i redukcję stanów zapalnych.

5.3.4. Parametry makrorzeźby skóry

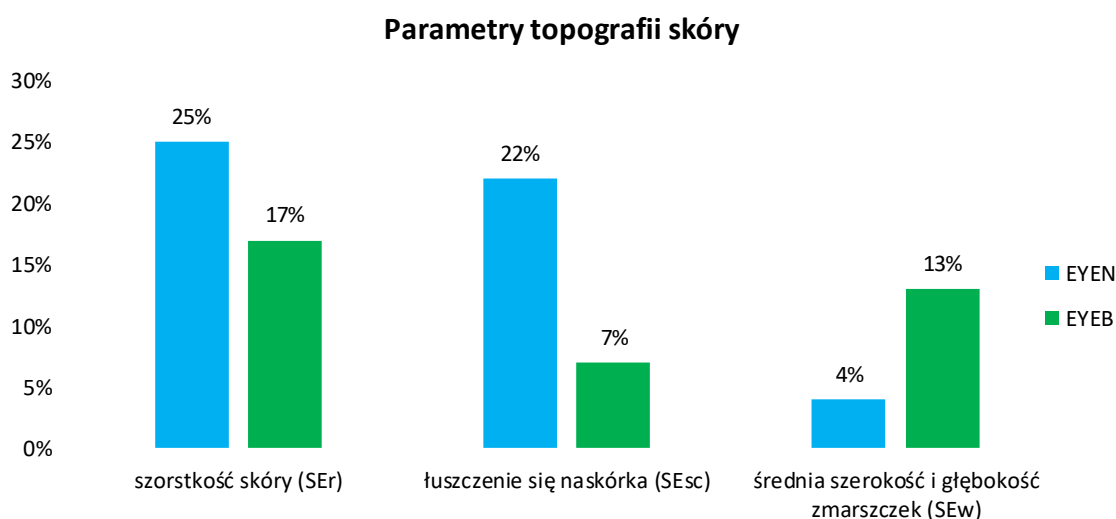
Analiza makrorzeźby badanych obszarów skóry umożliwiła ocenę powierzchni skóry pod kątem obecności, liczby i głębokości zmarszczek. Produkty kosmetyczne AAN i EYEN – dzięki zawartości retinolu i oligopeptydu, którymi inkorporowane były nanocząstki lipidowe – spowodowały zmianę liczby zmarszczek średnio o –18% w okolicy oczu (EYEN) i o –29% w okolicy czoła (AAN) ($p < 0,05$), podczas gdy w przypadku AAB oraz EYEB uzyskane wyniki kształtowały się na poziomie odpowiednio –6% oraz –9% ($p < 0,05$) (rys. 36). Istotną różnicę zaobserwowano również w średniej długości zmarszczek. W okolicy oczu wartość tego parametru została zredukowana o 16% (EYEN), natomiast na czole o 11% (AAN) ($p < 0,05$). W przypadku preparatów kosmetycznych niezawierających zauważono redukcję zmarszczek o 7% i 8%, odpowiednio dla AAB i EYEB ($p < 0,05$). Wyniki w zakresie parametru dotyczącego maksymalnej głębokości zmarszczek również potwierdziły skuteczne działanie przeciwstarzeniowe badanych produktów kosmetycznych. Dla AAN po 8 tygodniach stosowania kremu odnotowano 8-procentową redukcję w przypadku zmarszczek na czole oraz na poziomie 3% w okolicy oczu ($p < 0,05$). Tymczasem w przypadku EYEB zauważono 1-procentowe pogorszenie się kondycji skóry, natomiast w przypadku AAB zmiany odpowiadające 3-procentowemu obniżeniu się wartości tego parametru. Otrzymane wyniki dotyczące parametrów makrorzeźby skóry jednoznacznie potwierdziły działanie przeciwzmarszczkowe opracowanych produktów kosmetycznych AAN oraz EYEN.



Rysunek 36. Zmiany wybranych parametrów makrorzeźby skóry określone dla preparatów kosmetycznych anti-aging AA (AAN i AAB) oraz anti-aging EYE (EYEN i EYEB) podczas badań *in vivo* po 8-tygodniowym okresie stosowania (opracowanie własne).

5.3.5. Parametry topografii skóry (grupa EYE)

Dla diagnostyki kondycji naskórka i stopnia nasilenia procesów keratolitycznych istotna jest także analiza parametrów topografii skóry, w tym: **SEr**, czyli parametru charakteryzującego szorstkość skóry, **SEsc** – parametru złuszczenia oraz **SEw** – parametru obliczanego na podstawie średniej szerokości i głębokości zmarszczek. Wartość SEr odnotowana po 8 tygodniach stosowania EYEN wskazała na wzrost stopnia szorstkości o 25%, podczas gdy w przypadku EYEB wzrost wyniósł 17% w porównaniu do wyników otrzymanych w T0 ($p < 0,05$). Dodatkowo parametr SEsc dla produktu EYEN zwiększył swoją wartość o 22% w ciągu 8 tygodni, natomiast dla EYEB – zaledwie o 7% ($p < 0,05$). Biorąc pod uwagę parametr SEw – po 8 tygodniach odnotowano 4-procentowy wzrost wartości parametru w przypadku aplikacji EYEN oraz wzrost na poziomie 13% dla EYEB ($p < 0,05$) (rys. 37). Analiza wyników wybranych parametrów topografii skóry wskazała na przyspieszony i zintensyfikowany proces łuszczenia warstwy rogowej (dla EYEN), przy czym zjawisko to mogło wpływać także na szorstkość powierzchni naskórka oraz na zmiany parametrów średniej głębokości i szerokości zmarszczek. Z całą pewnością łuszczenie było związane z obecnością retinolu zawartego w matrycy SLN, który aktywnie wpływa na skórę, przyspieszając odnowę komórkową i zwiększając intensywność procesu keratynizacji [44]. Jednak co ważne, nie miało to istotnego wpływu na wartość omawianych już wcześniej parametrów odzwierciedlających poziom nawilżenia skóry oraz zdolności barierowe naskórka.



Rysunek 37. Zmiany wybranych parametrów topografii skóry określone dla preparatów kosmetycznych anti-aging EYE (EYEN i EYEB) podczas badań *in vivo* po 8-tygodniowym okresie stosowania (opracowanie własne).

5.4. Sprawozdanie z badań aplikacyjnych subiektywnych

Po zakończeniu okresu stosowania produktów kosmetycznych wszystkie aplikantki wypełniły subiektywną ankietę dotyczącą odczuć aplikacyjnych i efektywności działania testowanych produktów. Sprawozdanie z badań aplikacyjno-użytkowych przedstawione jest w formie załączników:

- **Krem z retinolem i peptydem do skóry starzejącej się (załącznik 3)** reprezentujący krem AA
- **Krem z retinolem i peptydem do skóry z trądzikiem i niedoskonałościami (załącznik 4)** reprezentujący krem AC
- **Krem z retinolem i peptydem do pielęgnacji starzejącej się skóry wokół oczu (załącznik 5)** reprezentujący krem EYE

5.5. Wdrożenie gotowych produktów kosmetycznych na rynek

5.5.1. Przekaz marketingowy

Nanocząstki lipidowe są innowacyjnym nośnikiem substancji aktywnych. Zapewniają skuteczną penetrację związków przez naskórek, dzięki czemu wzmacniają i wydłużają działanie kosmetyku.

Włączenie do nanocząstek lipidowych retinolu i oligopeptydu skutkuje powstaniem układu o addytywnym charakterze. Oznacza to, że obie substancje nie tylko działają zgodnie z własnymi właściwościami, lecz także wzajemnie maksymalizują swój wpływ na skórę. Dzięki temu efekty pielęgnacyjne całej formułacji są doskonałe już przy najniższych działających stężeniach substancji.

Kosmetyki na bazie nanocząstek lipidowych z retinolem i oligopeptydem spowalniają starzenie się skóry, zwalczają niedoskonałości oraz wzmacniają barierę hydrolipidową i przywracają do normy poziom nawilżenia.

Retinol w stężeniu 0,1% korzystnie wpływa na każdą strukturę zawartą w skórze. Działa dwutorowo: od zewnątrz redukuje grubość warstwy rogowej naskórka, a od wewnątrz pobudza syntezę kolagenu i elastyny oraz reguluje pracę gruczołów łojowych. Dzięki enkapsulacji do nanocząstek lipidowych retinol nie powoduje efektów niepożądanych charakterystycznych dla tej substancji.

Oligopeptyd z grupy neuropeptydów, zastosowany w stężeniu 0,05%, działa w głębokich warstwach skóry: wpływa na redukcję już istniejących zmarszczek mimicznych i ogranicza powstawanie nowych.

Linia pielęgnacyjna obejmuje trzy produkty kosmetyczne, które dzięki swoim recepturom doskonale wpisują się w trend *skin minimalismu*.

Krem z retinolem i peptydem do skóry starzejącej się oraz krem z retinolem i peptydem do pielęgnacji starzejącej się skóry wokół oczu są odpowiedzią na potrzeby filozofii *slow aging* – holistycznego podejścia do pielęgnacji skóry z nastawieniem na

długotrwałą, ale skuteczną terapię. Naturalnego zegara biologicznego nie zatrzymamy, jednak możemy spowolnić oznaki upływającego czasu widoczne na skórze.

Krem z retinolem i peptydem do skóry z trądzikiem i niedoskonałościami to doskonała propozycja dla skór młodszych z problemem nadprodukcji sebum oraz ze zmianami o podłożu trądzikowym. Kosmetyk umożliwia pielęgnację skóry w stylu pre-aging – jeszcze zanim procesy starze zaczęły być widoczne oraz gdy pojawią się pierwsze ich symptomy. Jednocześnie krem jest skutecznym rozwiązaniem dla osób, które borykają się z problemem niedoskonałości.

5.5.2. Gotowe produkty kosmetyczne

Przeprowadzone badania w certyfikowanych laboratoriach zewnętrznych, potwierdzają zgodność receptur w wytycznych Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009r. dotyczącego produktów kosmetycznych (Dz.Urz.UE L 342 z 22.12.2009), które obowiązuje od dnia 11 lipca 2013 r. z późniejszymi zmianami.

Produkt kosmetyczny **RETIN-PEPT wellaging**, **RETIN-PEPT preaging** oraz **RETIN-PEPT eye** o zadeklarowanym przez producenta składzie spełnia wymagania nałożone przez Ustawę o kosmetykach z dnia 30 marca 2001r. (Dz. U. Nr 42 poz. 473 z późniejszymi zmianami), stosowany zgodnie z przewidywanym przeznaczeniem i sposobem użycia – nie stanowi zagrożenia dla zdrowia człowieka. Na opakowaniu zostaną umieszczone ostrzeżenia o obecności Witaminy A w składzie produktu zgodnie z rozporządzeniem Komisji (UE) 2024/996 z dnia 3 kwietnia 2024 załącznik III.

W wyniku przeprowadzonych badań przygotowane do wprowadzenie na rynek kosmetyczny zostały trzy produkty:

Retin-Pept wellaging

Krem z retinolem i peptydem do skóry starzejącej się

Cream with retinol and peptide for aging skin

Krem jest odpowiednikiem produktu AAN, który zawiera 10% wag. stężenie dyspersji SLN. Kosmetyk będzie opakowany w 50ml jednościankową butelkę typu airless, która dodatkowo zabezpieczy substancje aktywne przed czynnikami zewnętrznymi oraz papierowy kartonik jednostkowy (rys. 38). Butelka oraz jej elementy spełniają wymagania Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 94/62/WE ze zmianami w sprawie opakowań i odpadów opakowaniowych.

W celu wdrożenia na rynek przeprowadzono badania w laboratorium zewnętrznym – tabela 7.

Tabela 7. Zestaw badań niezbędnych do rejestracji produktu **Retin-Pept wellaging**.

BADANIE	NUMER SPRAWOZDANIA
Cytotoksyczność*	K/0/07/2022/309/F/1 + załącznik 20220729-AB-GBA-33
Test konserwacji	K/0/01/2023/527/M/1 + załącznik M/23057/01
Mikrobiologia	B-84108/38757/23
Dermatologia	B-84108/20526/23
Fizykochemia podstawowa	21/03/23/FCH/2
Stabilność produktu	01/07/22/TS/3
Kompatybilność masy z opakowaniem	01/07/22/TS/3

*Cytotoksyczność była wykonywana wyłącznie dla kremu z 10% wag. stężeniem stałych nanocząstek lipidowych. Otrzymany wynik dla najwyższego stężenia w badanych produktach w pozostałych produktach będzie tożsamy bądź niższy.

Produkt jest gotowy do wdrożenia na rynek Polski.

Planowane rozpoczęcie wprowadzania produktu na rynek ze względu na obecność retinolu w składzie kremu JESIEŃ 2025r.



Rysunek 38. Pojemnik i opakowanie jednostkowe **Retin-Pept wellaging**.

Retin-Pept preaging

Krem z retinolem i peptydem do skóry z trądzikiem i niedoskonałościami

Cream with retinol and peptide for skin with acne and imperfections

Krem jest odpowiednikiem produktu ACN, który zawiera 5% wag. stężenie dyspersji SLN. Kosmetyk będzie opakowany w 50ml jednościankową butelkę typu airless, która dodatkowo zabezpieczy substancje aktywne przed czynnikami zewnętrznymi oraz papierowy kartonik jednostkowy- rys. 39 . Butelka oraz jej elementy spełniają wymagania Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 94/62/WE ze zmianami w sprawie opakowań i odpadów opakowaniowych.

W celu wdrożenia na rynek przeprowadzono badania w laboratorium zewnętrznym- tab. 8.

Tabela 8. Zestaw badań niezbędnych do rejestracji produktu **Retin-Pept preaging** .

BADANIE	NUMER SPRAWOZDANIA
Cytotoksyczność*	K/0/07/2022/309/F/1 + załącznik 20220729-AB-GBA-33
Test konserwacji	K/0/02/2024/241/M/1 + załącznik M/12281/02
Mikrobiologia	01/02/24/DOTT/K
Dermatologia	15/02/24/D/5
Fizykochemia podstawowa	15/02/24/FCH/5
Stabilność produktu	K/0/02/2024/304/F/1 + załącznik F/16886/02
Kompatybilność masy z opakowaniem	K/0/02/2024/304/F/1 + załącznik F/16886/02

Produkt jest gotowy do wdrożenia na rynek Polski.

Planowane rozpoczęcie wprowadzania produktu na rynek ze względu na obecność retinolu w składzie kremu JESIEŃ 2025r.



Rysunek 39. Pojemnik i opakowanie jednostkowe **Retin-Pept preaging**.

Retin-Pept eye

Krem z retinolem i peptydem do pielęgnacji starzejącej się skóry wokół oczu

Cream with retinol and peptide for aging skin around the eyes

Krem jest odpowiednikiem produktu EYEN, który zawiera 1% wag. stężenie dyspersji SLN. Kosmetyk będzie opakowany w 15ml jednościankową butelkę typu airless, która dodatkowo zabezpieczy substancje aktywne przed czynnikami zewnętrznymi oraz papierowy kartonik jednostkowy – rys. 40. Butelka oraz jej elementy spełniają wymagania Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 94/62/WE ze zmianami w sprawie opakowań i odpadów opakowaniowych.

W celu wdrożenia na rynek na chwilę obecną przeprowadzono badania w laboratorium zewnętrznym - tab. 9.

Tabela 9. Zestaw badań niezbędnych do rejestracji produktu **Retin-Pept eye**.

BADANIE	NUMER SPRAWOZDANIA
Cytotoksyczność*	K/0/07/2022/309/F/1 + załącznik 20220729-AB-GBA-33
Test konserwacji	K/0/04/2024/660/M/2 + załącznik M/42480/04
Mikrobiologia	K/0/05/2024/82/M/1

Pozostałe badania produktu są planowane na początku 2025r.

Planowane rozpoczęcie wprowadzania produktu na rynek ze względu na obecność retinolu w składzie kremu JESIEŃ 2025r.



Rysunek 40. Pojemnik i opakowanie jednostkowe **Retin-Pept eye**.



V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Retinol i oligopeptyd (*Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu*) zostały przebadane celem weryfikacji skuteczności ich działania w roli składników aktywnych formułacji kosmetycznych. Wprowadzenie tych związków w postaci nośników lipidowych (stałych nanocząstek lipidowych o rozmiarach nieprzekraczających 200 nm) zapewniło otrzymanie stabilnych produktów kosmetycznych charakteryzujących się przedłużonym w czasie działaniem na skórę. Udowodniono, iż pomimo keratolitycznego charakteru retinolu testowane preparaty kosmetyczne wykazały właściwości zapewniające odpowiedni poziom nawilżenia naskórka. Obecność nanocząstek lipidowych wpłynęła pozytywnie na funkcje barierowe skóry, dzięki właściwościom okluzyjnym SLN, oraz ograniczyła niepożądane działanie retinolu, pojawiające się w podczas stosowania tego związku w klasycznej postaci. Potwierdzono przeciwstarzeniowe działanie produktu kosmetycznego z grupy anti-aging (AA) – stosowanie kremu AAN (wzbogaconego nanocząstkami lipidowymi) skutkowało poprawą elastyczności skóry ($\uparrow 2\%$), wpływającą na polepszenie ogólnej kondycji skóry, a właściwości te przypisano zawartości peptydu w składzie formułacji kosmetycznej. Efekt anti-aging odnotowano także w toku analizy wyników parametrów makrorzeźby skóry – zmniejszenie liczby zmarszczek ($\downarrow 29\%$) oraz redukcja ich średniej długości ($\downarrow 11\%$) i głębokości ($\downarrow 8\%$) w czasie 8 tygodni stosowania preparatu AAN jednoznacznie wskazała na efektywne działanie kosmetyku. Analogiczne wyniki odnotowano dla produktu przeznaczonego do pielęgnacji skóry wokół oczu (EYEN), gdzie obecność inkorporowanych SLN wpłynęła na redukcję widoczności linii i zmarszczek na jej powierzchni ($\downarrow 18\%$). Synergiczne działanie retinolu oraz oligopeptydu zostało także udowodnione w przypadku produktu z grupy anti-acne (AC) – zaobserwowano znaczącą funkcję sebo regulacyjną ($\downarrow 19\%$) substancji aktywnych zawartych w tej recepturze (AAC) oraz ich działanie przeciwtrądzikowe. Badania przeprowadzone w ramach przedłożonej rozprawy doktorskiej udowodniły skuteczność testowanych produktów kosmetycznych przy zachowaniu założeń obecnego trendu *skin minimalism*. Osiągnięto mierzalne efekty stosowania opracowanych kosmetyków zawierających stałe nanocząstki lipidowe przy jednoczesnym zastosowaniu najniższych efektywnych stężeń składników aktywnych (retinolu i oligopeptydu) w recepturze formułacji kosmetycznej.



VI. CYTOWANA LITERATURA

- [1] PKO Bank Polski, "Branża Kosmetyczna: Sytuacja bieżąca i prognozy do 2028". **2024**.
- [2] Ch. Fang, I. Aljuffali, "Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles." *Ther. Deliv*, vol. 5, no. 9, pp. 991–1006, **2014**.
- [3] C. S. Ved, "Solid Lipid Nanoparticles : A Novel Carrier for in Skin Diseases." *Inven. Journals*, no. 4, pp. 1–9, **2014**.
- [4] K. Cal, J. Stefanowska, "Metody zwiększania przenikania substancji leczniczych przez skórę." *Farm. Pol.*, vol. 66, no. 7, pp. 514–520, **2010**.
- [5] H. Wosicka, J. Lulek, "Stałe nanocząstki lipidowe i nanostrukturalne nośniki lipidowe w nowoczesnych kosmetykach." *Polish J. Cosmetol.*, vol. 12, no. 1, pp. 23–37, **2009**.
- [6] L. Anil, K. Kannan, "Microemulsion as drug delivery system for peptides and proteins." *J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 10, no. 1, pp. 16–25, **2018**.
- [7] W. Czerwonka, D. Puchalska, M. Lipińska, A. Habrat, "Mechanizmy i metody przenikania substancji czynnych przez barierę lipidową skóry." *Kosmetologia Estet. 6*, vol. 7, pp. 667–670, **2018**.
- [8] M. Jaworska, E. Sikora, and J. Ogonowski, "Czynniki wpływające na penetrację składników aktywnych przez skórę. Factors influencing the percutaneous penetration of active ingredients." *Wiadomości Chem.*, vol. 65, pp. 3–4, **2011**.
- [9] P. Ghasemiyeh, S. Mohammadi-Samani, "Potential of nanoparticles as permeation enhancers and targeted delivery options for skin: Advantages and disadvantages." *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 14, pp. 3271–3289, **2020**, doi: 10.2147/DDDT.S264648.
- [10] A. A. Shaikh, J. B. Pawar, S. J. Anbhule, V. V. Kakade, "Review on nanoparticles for topical drug delivery." *Int. J. Pharm. Chem. Anal.*, vol. 10, no. 1, pp. 8–14, **2023**, doi: 10.18231/j.ijpca.2023.003.
- [11] P. G. Kakadia and B. R. Conway, "Lipid nano particles for dermal drug delivery." *Am. J. Pharmacol. Sci.*, vol. 2, pp. 1–21, **2014**.
- [12] H. Wosicka, K. Cal, "Targeting to the hair follicles: Current status and potential." *J. Dermatological Sci. Sci.*, vol. 57, pp. 83–89, **2010**, doi: 10.1016/j.dermsci.2009.12.005.
- [13] R. Ferreira, J. Napoli, T. Enver, L. Bernardino, L. Ferreira, "Advances and challenges in retinoid delivery systems in regenerative and therapeutic medicine." *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 4265, pp.1–14, **2020**, doi: 10.1038/S41467-020-18042-2.
- [14] A. Saupe, T. Rades, "Nanocarrier Technologies." Springer, **2006**.

- [15] R. H. Müller, S. A. Runge, V. Ravelli, A. F. Thünemann, W. Mehnert, E. B. Souto, "Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®): Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation." *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 68, no. 3, pp. 535–544, **2008**, doi: 10.1016/j.ejpb.2007.07.006.
- [16] J. F. Fanguero, T. Andreani, M. A. Egea, M. L. Garcia, S. B. Souto, E. B. Souto, "Experimental factorial design applied to mucoadhesive lipid nanoparticles via multiple emulsion process." *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 100, pp. 84–89, **2012**, doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.04.014.
- [17] S. A. Wissing, R. H. Müller, "Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN)." *Int. J. Pharm.*, vol. 254, no. 1, pp. 65–68, **2003**, doi: 10.1016/S0378-5173(02)00684-1.
- [18] D. K. Patel, R. Kesharwani, V. Kumar, "Lipid Nanoparticle Topical and Transdermal Delivery: A Review on Production, Penetration Mechanism to Skin." *Int. J. Pharm. Investig.*, vol. 9, no. 4, pp. 148–153, **2019**, doi: 10.5530/ijpi.2019.4.28.
- [19] E.B. Souto, I. Baldim, W.P. Oliveira, R. Rao, N. Yadav, F.M. Gama, S. Mahant, "SLN and NLC for topical, dermal, and transdermal drug delivery." *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 17, no. 3, pp. 357–377, **2020**, doi: 10.1080/17425247.2020.1727883.
- [20] R. H. Müller, M. Radtke, S. A. Wissing, "Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations." *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, no. SUPPL., pp. 131–155, **2002**, doi: 10.1016/S0169-409X(02)00118-7.
- [21] R. H. Müller, E. B. Souto, *Lipid Nanoparticles: Effect on Bioavailability and Pharmacokinetic Changes*. Springer, **2010**. doi: 10.1007/978-3-642-00477-3_4.
- [22] A. Śliwowska, "Badanie właściwości fizykochemicznych i aplikacyjnych formułacji kosmetycznych zawierających jasmonidy wraz z oceną kinetyki ich przenikania przez bariery imitujące skórę." *Rozpr. doktorska – Uniw. Adama Mickiewicza w Pozn.*, p. 182, **2017**.
- [23] F. Olechowski, R. H. Müller, S. M. Pyo, "Bergacare smartLipids: Commercial lipophilic active concentrates for improved performance of dermal products." *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 10, pp. 2152–2162, **2019**, doi: 10.3762/bjnano.10.208.
- [24] R. H. Müller, R. Ruick, C. M. Keck., "smartLipids®—the next generation of lipid nanoparticles by optimized design of particle matrix." *Proc. Annu. Meet. Ger. Pharm. Soc.*, **2014**.
- [25] A. J. Almeida, S. Runge, and R. H. Müller, "Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of production parameters." *Int. J. Pharm.*, vol. 149, no. 2, pp. 255–265, **1997**, doi: 10.1016/S0378-5173(97)04885-0.
- [26] E. Lasoń J. Ogonowski, "Stałe Nanocząsteczki Lipidowe – charakterystyka, zastosowanie i otrzymywanie." *Chemik*, vol. 65, no. 10, pp. 960–967, **2011**.

- [27] N. Yadav, S. Khatak, U. Vir, S. Sara, "Solid lipid nanoparticles-a review." *Int. J. Appl. Pharm.*, vol. 5, no. 2, pp. 8–18, **2013**.
- [28] M. A. Dąbrowska, "Optymalizacja właściwości fizykochemicznych oraz aplikacyjnych formułacji kosmetycznych zawierających wybrane glikozydy irydoidowe." *Rozpr. doktorska – Uniw. Adama Mickiewicza w Pozn.*, p. 167, **2019**.
- [29] E. Musielak, A. Feliczak-Guzik, I. Nowak, "Optimization of the Conditions of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) Synthesis." *Molecules*, vol. 27, no. 7, **2022**, doi: 10.3390/molecules27072202.
- [30] E. Musielak, A. Feliczak-Guzik, I. Nowak, "Synthesis and Potential Applications of Lipid Nanoparticles in Medicine." *Materials (Basel)*, vol. 15, no. 682, **2022**, doi:10.3390/ma15020682.
- [31] A. Zielińska, "Synteza i charakterystyka stałych nanocząsteczek oraz nanostrukturalnych nośników lipidowych przeznaczonych do celów kosmetycznych i farmaceutycznych." *Rozpr. doktorska – Uniw. Adama Mickiewicza w Pozn.*, p. 287, **2018**.
- [32] M. Zasada A. Adamczyk, "Witamina A." *Kosmetologia Estet.*, vol. 7, no. 5, pp. 517–521, **2018**.
- [33] M. Boryczka, B. Pasker, M. Sosada, "Retinoidy jako substancje czynne produktów leczniczych, kosmetyków i suplementów diety." *Farm. Przegląd Nauk.*, vol. 8, no. 67, pp. 8–16, **2010**.
- [34] R. K. Murray, D. K. Gramner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell, *Biochemia Harpera*. **1995**.
- [35] G. Wolf, "A History of Vitamin A and Retinoids." *FASEB J.*, vol. 10, no. 9, pp. 1102–1107, **1996**, doi: 10.1096/fasebj.10.9.8801174.
- [36] A. Sommer, "Vitamin A Deficiency and Clinical Disease: An Historical Overview." *J. NutThe J. Nutr. Hist. Nutr.*, vol. 138, pp. 1835–1839, **2008**.
- [37] B. Tarnowska, *Nagrody Nobla*. PWN, **2001**.
- [38] D. M. W. Balak, "Topical trifarotene: a new retinoid." *Br. J. Dermatol.*, vol. 179, no. 2, pp. 231–232, **2018**, doi: 10.1111/bjd.16733.
- [39] Recommendations 1981, "Nomenclature of retinoids." *Eur. J. Biochem.*, vol. 129, no. 1, pp. 1–5, **1982**, doi: 10.1351/pac198855040721.
- [40] H. Marona, A. Gunia, E. Pękała, "Retinoidy – rola w farmakoterapii w aspekcie komórkowego mechanizmu działania." *Farm Pol*, vol. 66, no. 3, pp. 187–192, **2010**.
- [41] P. Zawadzka, "Witamina A jako substancja aktywna w terapii trądziku i profilaktyce przeciwstarzeniowej." *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Choroby*, **2017**, pp. 60–65.

- [42] A. Czarnota, "Retinoidy. Mechanizm działania, właściwości oraz zakres stosowania w dermatologii i kosmetologii." *Kosmetologia Estet.*, vol. 7, no. 4, pp. 371–376, **2018**.
- [43] M. Ramos-E-Silva, D. M. Hexsel, M. S. Rutowitsch, M. Zechmeister, "Hydroxy acids and retinoids in cosmetics." *Clin. Dermatol.*, vol. 19, no. 4, pp. 460–466, **2001**, doi: 10.1016/S0738-081X(01)00189-4.
- [44] H. Bojarowicz A. Płowiec, "Wpływ witaminy A na kondycję skóry." *Probl. Hig. i Epidemiol.*, vol. 91, no. 3, pp. 352–356, **2010**.
- [45] W. Li, Y. Liu, Q. Luo, X. M. Li, X. B. Zhang, "Off-label uses of retinoids in dermatology." *Our Dermatology Online*, vol. 3, no. Suppl.1, pp. 259–279, **2012**, doi: 10.7241/ourd.20123.62.
- [46] M. Chaudhari, P. Stern, D. Lebwohl, *Treatment of Psoriasis*. **2008**.
- [47] M. Glenc-Ambroży, L. Piejko, "Retinoidy w profilaktyce fotostarzenia." *Aesthetic Cosmetol. Med.*, vol. 9, pp. 489–493, **2020**.
- [48] L. Baumann, *Cosmetic Dermatology*. McGraw-Hill Education / Medical, **2009**.
- [49] M. Zasada, A. Adamczyk, "Vitamina A." *Kosmetologia Estet.*, vol. 7, no. 5, pp. 517–521, **2018**.
- [50] R. Tung and M. Rubin, *Chemical Peels*. **2011**.
- [51] A. Kaźmierska, I. Bolesławska, J. Przysławski, "Wpływ retinoidów na skórę i zapobieganie ich skutkom ubocznym." *Hygeia Public Heal*, vol. 54, no. 3, pp. 165–172, **2019**.
- [52] L. Kotarska-Markowicz, L. Góra, "Retinoidy." *Polish J. Cosmetol.*, vol. 5, no. 4, pp. 240–259, **2002**.
- [53] S. Mukherjee, A. Date, V. Patravale, H. C. Korting, A. Roeder, G. Weindl, "Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety." *Clin. Interv. Aging*, vol. 1, no. 4, pp. 327–348, **2006**, doi: 10.2147/cia.2006.1.4.327.
- [54] SCCS/1576/16, "Scientific Committee on Consumer Safety SCCS." **2016**, doi: 10.2875/642264.
- [55] Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, Rozporządzenie Komisji (UE) 2024/996, pp. 1–8, **2024**.
- [56] Y. Ding, S. M. Pyo, R. H. Müller, "SmartLipids® as third solid lipid nanoparticle generation – Stabilization of retinol for dermal application." *Pharmazie*, vol. 72, no. 12, pp. 728–735, **2017**, doi: 10.1691/ph.2017.7016.
- [57] V. Jennings, M. Schafer-Korting, S. Gohla, "Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties." *J. Control. Release*, vol. 66, pp. 115–126, **2000**, Accessed: Feb. 06, **2022**.

- [58] P. G. Kakadia and B. R. Conway, "Lipid nano particles for dermal drug delivery." *Am. J. Pharmacol. Sci.*, vol. 2, pp. 1–21, **2014**.
- [59] P. Charoenputtakhun, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat, "All-trans retinoic acid-loaded lipid nanoparticles as a transdermal drug delivery carrier." *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 19, no. 2, pp. 164–172, **2014**, doi: 10.3109/10837450.2013.763261.
- [60] J. P. Jee, S. J. Lim, J. S. Park, C. K. Kim, "Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles." *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 63, no. 2, pp. 134–139, **2006**, doi: 10.1016/j.ejpb.2005.12.007.
- [61] G. Carneiro, E.L. Silva, L.A. Pacheco, E.M. de Souza-Fagundes, N.C. Corrêa, A.M. de Goes, M.C. de Oliveira, L.A. Ferreira, "Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and anticancer activity of all-trans retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles." *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 6011–6020, **2012**, doi: 10.2147/IJN.S38953.
- [62] F. Goudon, Y. Clément, L. Ripoll, "Controlled release of retinol in cationic co-polymeric nanoparticles for topical application." *Cosmetics*, vol. 7, no. 2, pp. 1–9, **2020**, doi: 10.3390/COSMETICS7020029.
- [63] T. L. Pan, P. W. Wang, C. F. Hung, I. A. Aljuffali, Y. S. Dai, J. Y. Fang, "The impact of retinol loading and surface charge on the hepatic delivery of lipid nanoparticles." *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 141, pp. 584–594, **2016**, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.02.029.
- [64] F. Pinto, D. P. C. de Barros, C. Reis, L. P. Fonseca, "Optimization of nanostructured lipid carriers loaded with retinoids by central composite design." *J. Mol. Liq.*, vol. 293, **2019**, doi: 10.1016/j.molliq.2019.111468.
- [65] F. Cerreto, M. Scalzo, S. Cesa, P. Paolicelli, M. A. Casadei, "Solid lipid nanosuspensions based on low melting lipids as protective system of retinyl palmitate." *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 21, no. 6, pp. 479–483, **2011**, doi: 10.1016/S1773-2247(11)50077-2.
- [66] P. P. Starch, D. P. Fibers, A. M. I. Al-rawi, *The American University in Cairo School of Science and Engineering Under the supervision of Prof. Mahmoud Farag*. **2011**.
- [67] S. K. Schagen, "cosmetics Topical Peptide Treatments with Effective Anti-Aging Results." **2017**, doi: 10.3390/cosmetics4020016.
- [68] J. McMurry, *Chemia organiczna*. PWN, **2017**.
- [69] A. Olejnik, I. Nowak, G. Schroeder, "Peptydy jako nowe syntetyczne składniki preparatów kosmetycznych." in *Receptory molekularne – właściwości i zastosowanie*, **2009**, pp. 105–122.
- [70] F. Errante, P. Ledwoń, R. Latajka, P. Rovero, A. M. Papini, "Cosmeceutical Peptides in the Framework of Sustainable Wellness Economy." *Front. Chem.*, vol. 8, no. October, pp. 1–8, **2020**, doi: 10.3389/fchem.2020.572923.

- [71] T. N. Lima, C. Aparecida, P. Moraes, "Bioactive Peptides: Applications and Relevance for Cosmeceuticals." *Cosmetics*, vol. 5, no. 21, pp. 1–9, **2018**, doi: 10.3390/cosmetics5010021.
- [72] M. Sobocińska, E. Kamysz,, "Potencjalne Zastosowanie Enkefalin W Diagnostyce I Terapii Różnych Chorób Potential Application Enkephalins in Diagnostics and Treatment of Various Diseases." vol. 71, pp. 1–2, **2017**.
- [73] Lipotec, "Leuphasyl®". pp. 1–15, **2020**.
- [74] M. S. Ferreira, M. C. Magalhães, J. M. Sousa-Lobo, I. F. Almeida, "Trending Anti-Aging Peptides." *Cosmetics*, vol. 7, no. 21, p. 15, **2020**, doi: 10.3390/cosmetics7040091.
- [75] F. Gorouhi, H. I. Maibach, "Role of topical peptides in preventing or treating aged skin." *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 31, pp. 327–345, **2008**, doi: 10.1111/j.1468-2494.2009.00490.x.
- [76] P. Ledwoń, W. Goldeman, K. Hałdys, M. Jewgiński, G. Calamai, J. Rossowska, A. M. Papini, P. Rovero, R. Latajka, "Tripeptides conjugated with thiosemicarbazones: new inhibitors of tyrosinase for cosmeceutical use." *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 31, no. 1, pp. 1–12, **2023**, doi: 10.1080/14756366.2023.2193676.
- [77] G. Limbert, M. A. Masen, D. Pond, H. K. Graham, M. J. Sherratt, R. Jobanputra, A. McBride, "Biotribology of the ageing skin—Why we should care." *Biotribology*, vol. 17, no. December 2018, pp. 75–90, **2019**, doi: 10.1016/j.biotri.2019.03.001.
- [78] J. E. Aguilar-Toalá, A. Hernández-Mendoza, A. F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba, A. M. Liceaga, "Potential role of natural bioactive peptides for development of cosmeceutical skin products." *Peptides*, vol. 122, no. September, p. 13, **2019**, doi: 10.1016/j.peptides.2019.170170.
- [79] Decyzja komisji (UE) 2019/701 z dnia 5 kwietnia 2019 r. o ustanowieniu słownika wspólnych nazw składników do stosowania na etykietach produktów kosmetycznych." **2019**.
- [80] Cosmetic Ingredient Review, "Safety Assessment of Palmitoyl Oligopeptides as Used in Cosmetics." **2012**. <https://www.cir-safety.org/sites/default/files/palmit072012slr.pdf> dostęp: 28.09.2024
- [81] D. I. S. P. Resende, M. S. Ferreira, J. M. Sousa-Lobo, E. Sousa, I. F. Almeida, "Usage of synthetic peptides in cosmetics for sensitive skin." *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 8, pp. 1–22, **2021**, doi: 10.3390/ph14080702.
- [82] K. Fields, T. J. Falla, K. Rodan, L. Bush, "Bioactive peptides: Signaling the future." *J. Cosmet. Dermatol.*, vol. 8, no. 1, pp. 8–13, **2009**, doi: 10.1111/j.1473-2165.2009.00416.x.
- [83] E. Ugazio, R. Cavalli, M. R. Gasco, "Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN)." *Int. J. Pharm.*, vol. 241, no. 2, pp. 341–344, **2002**, doi: 10.1016/S0378-5173(02)00268-5.

- [84] N. Zhang, Q. Ping, G. Huang, W. Xu, Y. Cheng, X. Han, "Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin." *Int. J. Pharm.*, vol. 327, no. 1–2, pp. 153–159, **2006**, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.07.026.
- [85] A. J. Almeida, E. Souto, "Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins." *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 6, pp. 478–490, **2007**, doi: 10.1016/j.addr.2007.04.007.
- [86] V. R. L. Penkler, R. H. Muller, S. A. Runge, "Pharmaceutical cyclosporin formulation with improved biopharmaceutical properties, improved." **2011**.
- [87] L. Molet-Rodriguez, A. Martin-Belloso, O. Salvia-Trujillo, "Formation and Stabilization of W1/O/W2 Emulsions with Gelled Lipid Phases." *Molecules*, vol. 26, no. 312, p. 15, **2021**, doi: 10.3390/molecules26020313.
- [88] M. Pawłowska, M. Marzec, W. Jankowiak, I. Nowak, "Solid Lipid Nanoparticles Incorporated with Retinol and Cosmetic Application." *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 25, no. 10078, **2024**, doi: 10.3390/ijms251810078.
- [89] J. Banerjee, S. Pillai, "Solid lipid matrix mediated nanoarchitectonics for improved oral bioavailability of drugs." *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, vol. 15, pp. 499–515, **2019**, doi: 10.1080/17425255.2019.1621289.
- [90] Z. Vanic, "Phospholipid vesicles for enhanced drug delivery in dermatology." *J. Drug Discov. Dev. Deliv.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–9, **2015**.
- [91] L. Salvioni, L. Morelli, E. Ochoa, M. Labra, L. Fiandra, L. Palugan, D. Prospero, M. Colombo, "The emerging role of nanotechnology in skincare." *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 293, no. 102437, pp. 1–23, **2021**, doi: 10.1016/j.cis.2021.102437.
- [92] I. Pepić, J. Filipović-Grčić, I. Jalšenjak, "Interactions in a nonionic surfactant and chitosan mixtures." *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 327, no. 1–3, pp. 95–102, **2008**, doi: 10.1016/j.colsurfa.2008.06.009.
- [93] E. Cserhati, T. Forgacs, "Biological activity and environmental impact of anionic surfactants Tibor." *Environ. Int.*, vol. 28, pp. 337–348, **2002**, doi:10.1002/anie.201607101.
- [94] A. M. Gonzalez-Rodriguez, M.L. Rabasco, "Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin.." *Drug Deliv.*, vol. 8, pp. 857–871, **2011**.
- [95] M. Dąbrowska, I. Nowak, "Lipid nanoparticles loaded with selected iridoid glycosides as effective components of hydrogel formulations." *Materials (Basel)*, vol. 14, no. 15, pp. 1–23, **2021**, doi: 10.3390/ma14154090.
- [96] S. C. Lee, H. G. Yuk, D. H. Lee, K. E. Lee, Y. Il Hwang, R. D. Ludescher, "Stabilization of retinol through incorporation into liposomes." *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 35, no. 4. pp. 358–363, **2002**, doi: 10.5483/bmbrep.2002.35.4.358.

- [97] K. L. Guimarães; M.I.Ré, *Lipid Nanoparticles as Carriers for Cosmetic Ingredients: The First (SLN) and the Second Generation (NLC)*. Springer, **2011**. doi: 10.1007/978-3-642-19792-5_5.
- [98] A. Gagliardi, D. Paolino, N. Costa, M. Fresta, D. Cosco, "Zein- vs PLGA-based nanoparticles containing rutin: A comparative investigation." *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 118, no. May 2020, p. 111538, **2021**, doi: 10.1016/j.msec.2020.111538.
- [99] Lab Expert, "Instrukcja obsługi urządzenia Turbiscan Lab[®]", **2013**.
- [100] M. Luo, X. Qi, T. Ren, Y. Huang, A. A. Keller, H. Wang, B. Wu, H. Jin, F. Li, "Heteroaggregation of CeO₂ and TiO₂ engineered nanoparticles in the aqueous phase: Application of turbiscan stability index and fluorescence excitation-emission matrix (EEM) spectra." *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 533, no. June, pp. 9–19, **2017**, doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.08.014.
- [101] S. S. Hallan, M. Sguizzato, E. Esposito, R. Cortesi, "Challenges in the physical characterization of lipid nanoparticles." *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 4, pp. 1–31, **2021**, doi: 10.3390/pharmaceutics13040549.
- [102] C. Celia, E. Trapasso, D. Cosco, D. Paolino, M. Fresta, "Turbiscan Lab[®] Expert analysis of the stability of ethosomes[®] and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent." *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 72, no. 1, pp. 155–160, **2009**, doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.03.007.
- [103] M. Pawłowska, M. Marzec, I. Nowak, W. Jankowiak, "Retinoidy. Chemiczna różnorodność dla zdrowia i urody." *Przem. Chem.*, vol. 1, no. 2, pp. 78–88, **2023**, doi: 10.15199/62.2023.2.8.
- [104] Courage+Khazaka, Instrukcja obsługi "Cutometer[®] MPA 580", **2019**.
- [105] M. Pawłowska, M. Marzec, I. Nowak, "Peptydy w nośnikach lipidowych i ich zastosowanie w produktach kosmetycznych." *Chemik*, vol. 72, no. 2, pp. 114–118, **2024**, doi: 10.15199/4.2024.2.3.
- [106] M. Noszczyk, *Kosmetologia pielęgnacyjna i lekarska*. PZWL Wydawnictwo Lekarskie, **2012**.
- [107] Courage+Khazaka, Instrukcja obsługi "Sebumeter[®] SM 815", **2016**.



OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI

OŚWIDCZENIA WSPÓŁAUTORÓW „PRZEMYSŁ CHEMICZNY” [D1]

Mgr inż. Małgorzata Pawłowska

Poznań, 20.09.2024

¹ Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

² Dottore Polska sp. z o.o.
Ul. Margonińska 22
60-425 Poznań

OŚWIDCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

Retinoidy. Chemiczna różnorodność dla zdrowia i urody
Retinoids. Chemical diversity for health and beauty

PRZEMYSŁ CHEMICZNY, 2023, 102/2, 196-206 (11):

doi: 10.15199/62.2023.2.8 (IF = 0,3, MNiSW = 100)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak, Waldemar Jankowiak

Mój własny udział obejmował:

- współdział w opracowaniu koncepcji wizualnej i merytorycznej;
- współdział w przygotowaniu manuskryptu i jego edycji,
- współdział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje oraz korespondencja z edytorem i recenzentami.



Mgr inż. Małgorzata Pawłowska

Kierownik
Zakładu Chemii Stosowanej
prof. dr hab. Izabela Nowak



Prof. dr hab. Izabela Nowak
Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

Poznań, 30.09.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

Retinoidy. Chemiczna różnorodność dla zdrowia i urody
Retinoids. Chemical diversity for health and beauty

PRZEMYSŁ CHEMICZNY, 2023, 102/2;

doi: 10.15199/62.2023.2.8 (IF = 0.3, MNiSW = 100)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak, Waldemar Jankowiak

Byłam bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Pawłowskiej, a mój własny udział obejmował:

- nadzór naukowy;
- pozyskiwanie finansowania;
- współudział w opracowaniu koncepcji wizualnej i merytorycznej;
- współudział w przygotowaniu manuskryptu i jego edycji;
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje oraz korespondencja z edytorem i recenzentami.

Prof. dr hab. Izabela Nowak

dr Marta Marzec
Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

Poznań, 30.09.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

**Retinoidy. Chemiczna różnorodność dla zdrowia i urody /
Retinoids. Chemical diversity for health and beauty**

PRZEMYSŁ CHEMICZNY, 2023, 102/2;

doi: 10.15199/62.2023.2.8 (IF = 0.3, MNiSW = 100)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak, Waldemar Jankowiak

Byłam bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pomocniczym pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Pawłowskiej, a mój własny udział obejmował:

- współdział w opracowaniu koncepcji wizualnej i merytorycznej;
- współdział w przygotowaniu manuskryptu i jego edycji.

Marta Marzec

dr Marta Marzec

Lek. med. Waldemar Jankowiak
NZOZ Klinika Estetyki Ciała
Ul. Margonińska 22
60-425 Poznań

Poznań, 30.09.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

Retinoidy. Chemiczna różnorodność dla zdrowia i urody.
Retinoids. Chemical diversity for health and beauty

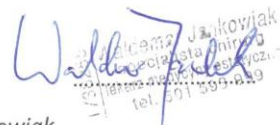
PRZEMYSŁ CHEMICZNY, 2023, 102/2;

doi: 10.15199/62.2023.2.8 (IF = 0.3, MNiSW = 100)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak, Waldemar Jankowiak

Byłem opiekunem naukowym i promotorem pomocniczym pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Pawłowskiej, z ramienia pracodawcy Dottore Polska sp. z o.o., a mój własny udział obejmował:

- nadzór naukowy.



Lek. med. Waldemar Jankowiak

OŚWIDCZENIA WSPÓŁAUTORÓW „CHEMIK” [D2]

Mgr inż. Małgorzata Pawłowska

Poznań, 30.09.2024

¹ Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

² Dottore Polska sp. z o.o.
Ul. Margonińska 22
60-425 Poznań

OŚWIDCZENIE AUTORA PRACY

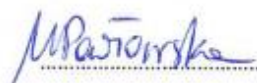
Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

**Peptydy w nośnikach lipidowych i ich zastosowanie w produktach kosmetycznych /
Peptides in lipid carriers and their application in cosmetic product**

CHEMIK 2/2024 tom 73, 114-118 (5);
doi: 10.15199/4.2024.2.3 (MNiSW = 20)
Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak

Mój własny udział obejmował:

- współdział w opracowaniu koncepcji wizualnej i merytorycznej;
- współdział w przygotowaniu manuskryptu i edycji;
- współdział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje oraz korespondencja z edytorem i recenzentami.



Mgr inż. Małgorzata Pawłowska

Małgorzata Pawłowska
Zakładu Chemii Stosowanej
prof. dr hab. Izabela Nowak



Prof. dr hab. Izabela Nowak
Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

Poznań, 30.09.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

**Peptydy w nośnikach lipidowych i ich zastosowanie w produktach kosmetycznych /
Peptides in lipid carriers and their application in cosmetic product**

CHEMIK 2/2024 tom 73, 114-118;

doi: 10.15199/4.2024.2.3 (MNiSW = 20)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak

Byłam bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Pawłowskiej, a mój własny udział obejmował:

- nadzór naukowy;
- pozyskiwanie finansowania;
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje oraz korespondencja z edytorem i recenzentami.



Prof. dr hab. Izabela Nowak

dr Marta Marzec
Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

Poznań, 30.09.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

**Peptydy w nośnikach lipidowych i ich zastosowanie w produktach kosmetycznych /
Peptides in lipid carriers and their application in cosmetic product**

CHEMIK 2/2024 tom 73, 114-118;

doi: 10.15199/4.2024.2.3 (MNiSW = 20)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Izabela Nowak

Byłam bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pomocniczym pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Pawłowskiej, a mój własny udział obejmował:

- współudział w opracowaniu koncepcji wizualnej i merytorycznej;
- współudział w przygotowaniu manuskryptu i jego edycji.

Marta Marzec

dr Marta Marzec

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORÓW „INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES” [D3]

Mgr inż. Małgorzata Pawłowska
¹ Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań
² Dottore Polska sp. z o.o.
Ul. Margonińska 22
60-425 Poznań

Poznań, 30.09.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

**Solid Lipid Nanoparticles Incorporated with Retinol and Pentapeptide-18—
Optimization, Characterization, and Cosmetic Application**

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2024, 25, 10078

doi: 10.3390/ijms251810078 (IF = 4.9, MNISW = 140)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Waldemar Jankowiak, Izabela Nowak

Mój własny udział obejmował:

- współudział w opracowaniu koncepcji badawczej;
- współudział w przygotowaniu metodologii badań;
- współudział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników;
- współudział w przygotowaniu manuskryptu i jego edycji;
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje oraz korespondencja z edytorem i recenzentami.



Mgr inż. Małgorzata Pawłowska

Kierownik
Zakładu Chemii Stosowanej
prof. dr hab. Izabela Nowak



Prof. dr hab. Izabela Nowak
Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

Poznań, 30.09.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

**Solid Lipid Nanoparticles Incorporated with Retinol and Pentapeptide-18—
Optimization, Characterization, and Cosmetic Application.**

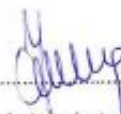
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2024, 25, 10078;

doi: 10.3390/ijms251810078 (IF = 4.9, MNiSW = 140)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Waldemar Jankowiak, Izabela Nowak

Byłam bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Pawłowskiej, a mój własny udział obejmował:

- nadzór naukowy;
- pozyskiwanie finansowania;
- współudział w opracowaniu koncepcji badawczej;
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje oraz korespondencja z edytorem i recenzentami.



Prof. dr hab. Izabela Nowak

dr Marta Marzec
Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

Poznań, 30.09.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

**Solid Lipid Nanoparticles Incorporated with Retinol and Pentapeptide-18—
Optimization, Characterization, and Cosmetic Application**

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2024, 25, 10078;

doi: 10.3390/ijms251810078 (IF = 4.9, MNiSW = 140)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Waldemar Jankowiak, Izabela Nowak

Byłam bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pomocniczym pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Pawłowskiej, a mój własny udział obejmował:

- współudział w opracowaniu koncepcji badawczej;
- współudział w przygotowaniu metodologii badań;
- współudział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników;
- współudział w przygotowaniu manuskryptu i jego edycji;
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje oraz korespondencja z edytorem i recenzentami.

Marta Marzec

dr Marta Marzec

Lek. med. Waldemar Jankowiak
NZOZ Klinika Estetyki Ciała
Ul. Margonińska 22
60-425 Poznań

Poznań, 30.09.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

Solid Lipid Nanoparticles Incorporated with Retinol and Pentapeptide-18—Optimization, Characterization, and Cosmetic Application

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2024, 25, 10078

doi: 10.3390/ijms251810078 (IF = 4.9, MNiSW = 140)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Waldemar Jankowiak, Izabela Nowak

Byłem opiekunem naukowym i promotorem pomocniczym pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Pawłowskiej, z ramienia pracodawcy Dottore Polska sp. z o.o., a mój własny udział obejmował:

- nadzór naukowy.

Lek. med. Waldemar Jankowiak


Waldemar Jankowiak
17302
specjalista
lek. med. 591 599 999

OŚWIDCZENIA WSPÓŁAUTORÓW "LIFE" [D4]

Mgr inż. Małgorzata Pawłowska
¹ Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań
² Dottore Polska sp. z o.o.
Ul. Margonińska 22
60-425 Poznań

Poznań, 30.09.2024

OŚWIDCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

Retinol and Oligopeptide-loaded Lipid Nanocarriers as Effective Raw Material in Anti-acne and Anti-aging Therapies

LIFE 2024, 14 (10), 1212;

doi: 10.3390/life14101212 (IF = 3.2, MNISW = 70)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Waldemar Jankowiak, Izabela Nowak

Mój własny udział obejmował:

- współdział w opracowaniu koncepcji badawczej;
- współdział w przygotowaniu metodologii badań;
- współdział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników;
- współdział w przygotowaniu manuskryptu i jego edycji;
- współdział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje oraz korespondencja z edytorem i recenzentami.



Mgr inż. Małgorzata Pawłowska

Kierownik
Zakładu Chemii Stosowanej
prof. dr hab. Izabela Nowak



Prof. dr hab. Izabela Nowak
Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

Poznań, 30.09.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

**Retinol and Oligopeptide-loaded Lipid Nanocarriers as Effective Raw Material in
Anti-acne and Anti-aging Therapies**

LIFE 2024, 14 (10), 1212

doi: 10.3390/life14101212 (IF = 3.2, MNiSW = 70)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Waldemar Jankowiak, Izabela Nowak

Byłam bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Pawłowskiej, a mój własny udział obejmował:

- nadzór naukowy;
- pozyskiwanie finansowania;
- współudział w opracowaniu koncepcji badawczej;
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje oraz korespondencja z edytorem i recenzentami.

Prof. dr hab. Izabela Nowak

dr Marta Marzec
Wydział Chemii, Zakład Chemii Stosowanej
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

Poznań, 30.09.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

**Retinol and Oligopeptide-loaded Lipid Nanocarriers as Effective Raw Material in
Anti-acne and Anti-aging Therapies**

LIFE 2024, 14 (10), 1212;

doi: 10.3390/life14101212 (IF = 3.2, MNiSW = 70)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Waldemar Jankowiak, Izabela Nowak

Byłam bezpośrednim opiekunem naukowym i promotorem pomocniczym pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Pawłowskiej, a mój własny udział obejmował:

- współudział w opracowaniu koncepcji badawczej;
- współudział w przygotowaniu metodologii badań;
- współudział w analizie i interpretacji uzyskanych wyników;
- współudział w przygotowaniu manuskryptu i jego edycji;
- współudział w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje oraz korespondencja z edytorem i recenzentami.

Marta Marzec

dr Marta Marzec

Lek. med. Waldemar Jankowiak
NZOZ Klinika Estetyki Ciała
Ul. Margonińska 22
60-425 Poznań

Poznań, 30.09.2024

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Niniejszym oświadczam, że w poniższym artykule:

**Retinol and Oligopeptide-loaded Lipid Nanocarriers as Effective Raw Material in
Anti-acne and Anti-aging Therapies**

LIFE 2024, 14 (10), 1212;

doi: 10.3390/life14101212 (IF = 3.2, MNiSW = 70)

Małgorzata Pawłowska, Marta Marzec, Waldemar Jankowiak, Izabela Nowak

Byłem opiekunem naukowym i promotorem pomocniczym pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Pawłowskiej, z ramienia pracodawcy Dottore Polska sp. z o.o., a mój własny udział obejmował:

- nadzór naukowy.

Lek. med. Waldemar Jankowiak


Waldemar Jankowiak
lekarz medycyny estetycznej
tel. 501 663 899



PRZEDRUK PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

- D1** Retinoids. Chemical diversity for health and beauty /
Retinoidy. Chemiczna różnorodność dla zdrowia i urody

- D2** Peptydy w nośnikach lipidowych i ich zastosowanie w produktach kosmetycznych /
Peptides in lipid carriers and their application in cosmetic product

- D3** Solid Lipid Nanoparticles Incorporated with Retinol and Pentapeptide-18 –
Optimization, Characterization, and Cosmetic Application

- D4** Retinol and Oligopeptide-loaded Lipid Nanocarriers as Effective Raw Material in
Anti-acne and Anti-aging Therapies

Małgorzata Pawłowska^{a,b*}, Marta Marzec^a, Izabela Nowak^a, Waldemar Jankowiak^b

^aAdam Mickiewicz University, Poznań; ^bDottore Polska Sp. z o.o., Poznań

Retinoids. Chemical diversity for health and beauty

Retinoidy. Chemiczna różnorodność dla zdrowia i urody

DOI: 10.15199/62.2023.2.XX

A review, with 43 refs., of vitamin A analogs. Structures, properties, metabolism as well as cosmetic and medical uses were taken into consideration.

Przedstawiono różnorodną rodzinę witaminy A docenianej od tysiącleci. Dzięki dostępności nowoczesnych technologii oraz wiedzy powiększa się ona w bardzo szybkim tempie. Mnogość struktur chemicznych zapewnia coraz to lepszą biodostępność i stabilność cząsteczek. Dzięki swojej różnorodności retinoidy stosowane są w produktach kosmetycznych i medycznych, zapewniając im szeroki wachlarz właściwości terapeutycznych.

Keywords: retinoids, vitamin A, literature review

Słowa kluczowe: retinoidy, witamina A, przegląd literatury

Nazwa „witamina A” jest nomenklaturą zwyczajową odnoszącą się do kilku związków chemicznych, które reprezentują grupę karotenoidów, w tym do retinolu i jego pochodnych (zwanymi ogólnie retinoidami) oraz do beta-karotenu¹⁻⁴). Dotyczy ona wielu substancji chemicznych o analogicznej budowie, połączonych ze sobą w jedną rodzinę²). Pod pojęciem retinoidów kryją się naturalne postacie retinolu oraz jego syntetyczne analogi. Witamina A nazywana jest witaminą wzrostową oraz normalizującą. Ma ona charakter hydrofobowy (lipidy)^{5, 6}, związki ją reprezentujące są nierozpuszczalne w wodzie, ale łatwo rozpuszczają się w tłuszczach i w hydrofobowych oraz średniopolarnych rozpuszczalnikach organicznych^{5, 6}.

The name “vitamin A” refers to a few chemical compounds representing the group of carotenoids, including retinol and its derivatives (generally known as retinoids) and beta-carotene¹⁻⁴). The most important chemical compound from this group is retinol, so often the names vitamin A and retinol are mistakenly confused. The term retinoids refers to retinol and its synthetic analogues²). Retinol has been also known as the “growth vitamin” or vitamin normalizing the growth of epithelium. The group of compounds known as vitamin A has the hydrophobic character (lipids)^{5, 6}. The compounds are water insoluble but they easily dissolve in fats and in most of organic solvents^{5, 6}.

Rys historyczny

Starożytność. Od objawów do lekarstwa

Zbawienne działanie witaminy A zostało odkryte i docenione już w starożytnym Egipcie ok. 1500 r. p.n.e., a później

Historical background

The Antiquity – from symptoms to discovery of a drug

Salutary effects of vitamin A were disclosed and appreciated already in Ancient Egypt, 1500 BC, later close to 400



Mgr inż. Małgorzata PAWŁOWSKA w roku 2005 ukończyła studia na Wydziale XXX Uniwersytetu Przyrodniczego im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu. Jest doktorantką w Zakładzie Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Pracuje na stanowisku kierowniczkę projektu w firmie Dottore cosmeceutici. Specjalność – substancje aktywne i ich zastosowanie w kosmetyce białej.



Dr Marta MARZEC (ORCID: 0000-0003-1482-8274) w roku 2015 uzyskała stopień magistra, a w 2019 r. stopień doktora na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Jest adiunktem badawczym w Zakładzie Chemii Stosowanej tej samej uczelni. Specjalność – preparatyka i badania fizykochemiczne produktów kosmetycznych z zakresu kosmetyki białej, nowoczesne substancje czynne w produktach kosmetycznych, badania aplikacyjno-aparaturowe kosmetyków, synteza nanocząstek lipidowych, z naciskiem na ich zastosowanie w chemii kosmetycznej.

* Adres do korespondencji:

Zakład Chemii Stosowanej, Wydział Chemii, Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, tel.: +48 515-237-337, e-mail: m.pawlowska@dottore.pl

ok. 400 r. p.n.e. w Grecji i Rzymie. Zaobserwowano, że w przypadku nieokreślonej choroby oczu, która objawiała się utratą wzroku po zmierzchu, jej symptomy cofają się w krótkim czasie po włączeniu do diety wątroby zwierzęcej. Starożytni Grecy nazwali chorobę nyktalopią (*nyx*, *nyktos* – noc, *alaos* – ślepy, *opteos* – oko). Dziś wiadomo, że wątroba jest najbogatszym źródłem witaminy A, a ślepotą jest objawem niedoboru tej witaminy^{4, 7, 8)}. Ślepotę nocną opisują także asyryjskie teksty medyczne z 700 r. p.n.e. oraz medycyna chińska. Wolf⁹⁾ w swojej publikacji wspomina także o hebrajskim traktacie z muzułmańskiej Hiszpanii (Abraham Ibn Ezra, XII w. n.e.) oraz o słowach holenderskiego lekarza Jacoba van Maerlandt (1235–1299). W każdym z powyższych przypadków leczenie obejmowało okłady z wątroby zwierzęcej, parówkę nad gotującą się wątrobą lub bezpośrednie spożycie surowego bądź ugotowanego narządu⁹⁾. Natomiast Jacobus Bonitus (1592–1631), lekarz pracujący w Holenderskich Indiach Wschodnich, opisuje zaburzenia widzenia prowadzące do ślepoty, które można było wyleczyć za pomocą wątroby rekina, co było praktykowane również przez rdzennych mieszkańców Jawy. O leczeniu problemów ze wzrokiem za pomocą wątroby rekina wspomina także Brazylijczyk Willem Piso (1611–1678), opierając się na terapii opisanej przez Hipokratesa⁹⁾.

Od obserwacji do opisów klinicznych w XVIII w.

Sommer¹⁰⁾ opisuje, że w 1816 r. (wg Wolfa i Lanskiego^{9, 11)} w 1817 r.) uczony Magendie prowadził obserwację stada psów karmionych wyłącznie wodą i cukrem. W wyniku takiej diety zaobserwował u badanych zwierząt spadek wagi, podatność na choroby oraz owrzodzenie rogówki. Początkowo błędnie przypisywał to brakowi azotu (białka) w pokarmie¹¹⁾. Najwcześniejsze powiązanie ślepoty nocnej z wadą rogówki miało miejsce w 1860 r. i zostało dokonane przez Hubbena, który zgłosił obserwację, że ślepotę nocnej towarzyszą „srebrne łuski w rogówce”. Podobne obserwacje odnotował Bitot w 1862 r., opisując tzw. plamy Bitota^{9, 10)} jako pienne białe plamki na rogówce u niewidomych dzieci. Objaw ten jest współcześnie uznawany za silny wskaźnik niedoboru witaminy A, dotyczącego głównie niedożywione dzieci.

Odkrycie witaminy A w XX w.

Przełom XIX i XX w. przyniósł więcej odpowiedzi. Rozpoczęte wówczas szersze badania z udziałem zwierząt

BC in Greece and Rome. It has been observed that the eyes' condition manifested as the loss of sight after twilight was cured in a short time after inclusion of animal liver into the diet. The ancient Greeks called this disease the nyctalopia (nyx, nyktos – night, alaos – blind, opteos – eye). Today, we know that the liver is the richest natural source of vitamin A and this kind of blindness is caused by its deficiency^{4, 7, 8)}. The night blindness was also described in the medical scripts from Assyria, 700 BC and China. In his paper, Wolf⁹⁾ mentions a Hebrew treatise coming from Muslim Spain (Abraham Ibn Ezra, 12th century AC) and words of a Dutch doctor Jacob van Maerlandt (1235–1299). In the cases described by him the treatment included compresses with animal liver, exposure to the steam coming from boiling liver or eating a raw or cooked liver⁹⁾. Jacobus Bonitus (1592–1631), a doctor working in the Dutch East Indies, described the vision disorder leading to blindness that could be cured using the shark's liver, as had been practiced by the native inhabitants of Java. Also, Willem Piso from Brazil (1611–1678) mentioned the eye condition treatment with the use of shark's liver, referring to the therapy described by Hippocrates⁹⁾.

From observations to clinical descriptions in the 17th century

According to Sommer in 1816¹⁰⁾ or according to Wolf and Lanska in 1817^{9, 11)}, Magendie made observations of a pack of dogs fed only with water and sugar. This diet led to the loss of mass, susceptibility to diseases and ulceration of corneas in the animals. At first, he assigned the symptoms to lack of nitrogen (that is proteins) in the diet¹¹⁾. The earliest association between the night blindness with the defect of cornea was made in 1860 by Hubben who reported the observation that the night blindness is accompanied by “silver scales in the cornea”. Similar observation was reported by Bitot in 1862, who described the so-called Bitot spots^{9, 10)} as foamy white spots on the corneas in blind children. This symptom is currently assumed as a strong indication of vitamin A deficiency, mainly in undernourished children.

Discovery of vitamin A in the 20th century

Much more information was collected at the turn of the 19th and 20th centuries. At that time, large-scale studies on



Prof. dr hab. Izabela NOWAK (ORCID: 0000-0002-1113-9011) w roku 1993 ukończyła studia magisterskie na Uniwersytecie w Reading. W 1997 r. uzyskała stopień doktora, a w 2008 r. stopień doktora habilitowanego na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W 2014 r. otrzymała nominację profesorską. Od 2009 r. jest kierownikiem Zakładu Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii UAM. Od 2019 r. pełni funkcję prezesa ZG PTChem. Specjalność – synteza i modyfikacja nowych uporządkowanych mezoporowatych materiałów, synteza wysokowartościowych i masowych chemikaliów z użyciem heterogenicznych katalizatorów, w tym z użyciem biomasy, nowatorskie metody analityczne w zakresie chemii kosmetycznej, farmaceutycznej i stosowanej, nowoczesne strategie preparatyki i badania kosmetyków oraz kosmetyków.



Dr. Waldemar JANKOWIAK jest lekarzem medycyny estetycznej Międzynarodowej Unii Medycyny Estetycznej (UIIME), specjalistą chirurgiem, prezesem Polskiego Towarzystwa Medycyny Estetycznej i Anti-Aging, wykładowcą Podyplomowej Szkoły Medycyny Estetycznej PTL, uczestnikiem i wykładowcą międzynarodowych kongresów.

laboratoryjnych ułatwiły identyfikację składników diety. Pod koniec XIX w. Guggenheim wspominał o ślepotie nocnej kończącej się keratomalacją u niemowląt podczas wielkiego 7-tygodniowego postu. Natomiast w 1913 r. Ishihara¹²⁾ pisze o „xerozie spojówek połączonej ze ślepotą nocną”^{9, 11)}, zwaną także „ślepotą zmierzchową”. Wszystkie badania i eksperymenty, które miały miejsce do przelomu XIX i XX w. potwierdzały tezę, że ślepotą nocną oraz uszkodzenia rogówki związane są z niedożywieniem. Wyniki te doprowadziły do sformułowania pojęcia „minimalnych czynników jakościowych w diecie niezbędnych do wzrostu i przeżycia”, wprowadzonego przez Hopkinsa⁹⁾. Obserwacje związane z włączeniem do diety wątroby zwierzęcej (wołowej, rękinięj, osłcej) doprowadziły do wniosku, że organ ten zawiera substancje lipidowe, które leczą objawy chorobowe.

Skutki niedoboru witaminy A zostały opisane po raz pierwszy przez Lunina^{9, 11)} w 1881 r. Odkrycie witaminy A miało miejsce w 1907 r. Dokonał go McCollum, który w doświadczeniach na szczurach udowodnił, że istnieje rozpuszczalny w tłuszczach (inny niż sam tłuszcz) czynnik sprzyjający prawidłowemu wzrostowi⁷⁾ i niezbędny do przeżycia. McCollum nazwał go „czynnikiem A rozpuszczalnym w tłuszczach”, w przeciwieństwie do innych czynników zwanych „czynnikiem B rozpuszczalnymi w wodzie”^{9, 10)}. Czynnikiem A okazał się w późniejszych latach witaminą A.

Wolf i Lanska^{9, 11)} wspominają o dalszych obserwacjach i badaniach związanych z wpływem niedoboru witaminy A na organizm, przeprowadzonych na zwierzętach przez Osborne’a i Mendla. Doświadczenia te potwierdziły, że niedobór witaminy A może spowodować zahamowanie wzrostu i większą podatność na infekcje, a także może wywołać keratomalację. Podobne wnioski wysnuł Bloch na podstawie badań nad stanem zdrowia dzieci w duńskim sierocińcu podczas I wojny światowej. Poza tym Osborne i Mendel jako pierwsi zauważyli różnicę w rozwoju organizmów, których dieta oparta była na „żółtych tłuszczach” wobec tej, w której spożywany był smalec.

Rodzina retinoidów dla zdrowia i urody

Obserwacje zapoczątkowane przez Osborne’a i Mendla potwierdził także Steenbock, który wysnuł hipotezę, że czynnik A jest związany z żółtym pigmentem (znanym obecnie jako β -karoten). Udowodnił, że pigment ten jest przekształcany na drodze przemian biochemicznych w aktywną bezbarwną postać, znaną obecnie jako retinol. W 1929 r. Hopkins otrzymał Nagrodę Nobla za wyizolowanie witaminy A z mleka¹³⁾ i ujawnienie jej znaczenia dla organizmu człowieka. Udało mu się wskazać trzy najważniejsze funkcje tej witaminy: udział w utrzymaniu prawidłowego widzenia, wpływ na prawidłowe różnicowanie się nabłonka (np. rogówki) oraz wspomaganie procesów wzrostu. Dopiero w latach 30. XX w. Moore i Karrer wyizolowali β -karoten jako prowitaminę lub prekursor bezbarwnej witaminy A (retinolu). W 1937 r. Karrer

laboratory animals were performed whose results helped to identify the diet components. At the end of the 19th century, Guggenheim mentioned the night blindness that ended with keratomalacia in infants, observed during the 7-week Lent. In 1913, Ishihara¹²⁾ wrote about the “xerosis of conjunctiva accompanied with night blindness”^{9, 11)}, also known as the twilight blindness. All observations and analyses performed till the turn of the 19th and 20th centuries supported the thesis that the night blindness and defect of cornea were related to malnutrition. The results have led to formulation of the notion of “minimal qualitative factors in the diet necessary for growth and survival” introduced by Hopkins⁹⁾. The observations related to the effect of inclusion of animal liver into the diet (bovine, shark, codfish) led to a conclusion that the liver contains lipid substances that cure the specific eye condition.

The consequences of vitamin A deficiency were for the first time described by Lunin in 1881^{9, 11)}. Vitamin A was actually discovered in 1907 by McCollum who, on the grounds of results of the tests on rats, proved that there is a special factor soluble in fats that is conducive to correct growth⁷⁾. This growth factor soluble in fats and differing from fats is necessary for correct growth and survival. McCollum called it “the factor A soluble in fats”, in contrast to the other factors known as factors B soluble in water B^{9, 10)}. The factor A was later disclosed to be vitamin A.

Wolf and Lanska^{9, 11)} have also mentioned further research on animals concerning the effects of vitamin A deficiency, performed by Osborne and Mendel. Their results confirmed that vitamin A deficiency may lead to growth inhibition, increased susceptibility to infections and may lead to keratomalacia. Similar conclusions were drawn by Bloch on the basis of the studies of the health condition of children in a Danish orphanage during the world war I. Besides, Osborne and Mendel were the first to note the difference in activity between the yellow fats and lard.

The retinoid family for health and beauty

The observations of Osborne and Mendel have also been confirmed by Steenbock who has propounded a hypothesis that the factor A is related to the yellow pigment (currently known as β -carotene). The same authors have proved that this pigment is converted by biochemical transformations into the active colorless substance, currently known as retinol. In 1929, Hopkins was awarded with the Nobel Prize for isolation of vitamin A from milk¹³⁾ and disclosure of its significance for human organism. He was able to identify the three most important functions of this vitamin: in maintenance of correct vision, help in correct differentiation of epithelium (e.g., cornea) and support of growth processes. Only as late as in the 1930s, Moore and Karrer isolated β -carotene as a provitamin or precursor of colorless vitamin A (retinol). In 1937, Karrer was awarded with the Nobel

otrzymał Nagrodę Nobla¹⁴⁾ za badania nad karotenoidami i witaminą A.

Od 1935 r. Wald prowadził intensywne prace badawcze, mające na celu określenie struktury rodopsyny i jej funkcji w oku. Udowodnił m.in., że izomer 11-*cis* retinalu bierze udział w procesie prawidłowego widzenia^{2, 7)}. W 1937 r. witamina A została ostatecznie skryształizowana, a w latach 1947–1948 Isler z grupą współpracowników ukończył jej pełną syntezę chemiczną⁷⁾.

Od lat 60. XX w. zainteresowanie witaminą A koncentruje się głównie na wyjaśnianiu jej szlaków metabolicznych i biochemicznych. W 1969 r. Fulton i Kligman zaproponowali zastosowanie kwasu retinowego w leczeniu chorób skóry, takich jak trądzik (w różnych postaciach) oraz łuszczyca⁵⁾. Miejscowe leczenie łuszczycy retinoidami zostało wprowadzone dopiero w 1997 r.¹⁵⁾ Natomiast w latach 70. Saffiotti odkrył działanie antynowotworowe witaminy A.

W 1974 r. organizacje WHO i UNICEF rozpoczęły dystrybuowanie 0,5 mld kapsulek witaminy A w krajach rozwijających się, zapobiegając śmierci ok. 350 tys. dzieci rocznie¹⁰⁾. Zainteresowanie retinoidami jako substancjami o działaniu przeciwstarzeniowym pojawiło się pod koniec lat 80. XX w., po opublikowaniu w 1986 i 1988 r. wyników badań nad zastosowaniem tretinoiny jako substancji aktywnej o działaniu przeciwzmarszczkowym^{16, 17)}. Później stosowanie izotretinoiny uznano za najskuteczniejszą metodę leczenia ciężkiego trądziku, o czym wspomina Baumann i Moscona-Nissan^{17, 18)}.

Budowa retinoidów i ich różnorodność

Pod nazwą „retinoidy” kryje się wiele związków chemicznych wykazujących analogiczne właściwości oraz budowę charakterystyczną dla witaminy A⁷⁾. Od momentu pierwszego zastosowania retinolu w leczeniu trądziku, które miało miejsce w 1969 r. i zostało przeprowadzone przez prof. Alberta Kligmana, zsyntetyzowano ok. 2500 nowych retinoidów^{17, 19, 20)}.

Retinoidy to zarówno naturalne, jak i syntetyczne pochodne retinolu. Stopniowe powiększanie tej grupy spowodowało konieczność jej usystematyzowania pod względem budowy chemicznej²¹⁾. Retinoidy I generacji to związki naturalne, do których zaliczamy retinol, aldehyd retinowy (retinal) oraz izomery kwasu retinowego (izotretinoinę, tretinoinę). Związki z tej grupy wykazują szeroki zakres aktywności w leczeniu różnych postaci trądziku²²⁾. Grupa ta jako jedyna posiada działanie przeciwstarzeniowe^{19, 21, 22)}. Retinoidy II generacji to retinoidy monoaromatyczne. Są to otrzymane syntetycznie analogi retinolu, takie jak acytretyna oraz motretynid. Substancje te są wykorzystywane m.in. w leczeniu łuszczycy¹⁵⁾, wrodzonej „rybiej łuski” czy choroby Dariera¹⁹⁾. Retinoidy III generacji (zwane arotinoidami) to poliaromatyczne związki syntetyczne: adapalene, tazarotene i beksarotene. Związki z tej grupy wykazują selektywną aktywność wobec odpowiednich receptorów¹⁾. Według Chaudhari i współpracowników¹⁵⁾

Prize for his contribution to the knowledge of carotenoids and vitamin A¹⁴⁾.

*From 1935, Wald started intensive research work aimed at determination of the structure of rhodopsin and its function in the eye. Among others, he proved that 11-*cis* isomer of retinal is engaged in the process of vision^{2, 7)}. Finally in 1937, vitamin A was crystallized. Later in 1947–1948, Isler and his research team successfully completed full chemical synthesis of vitamin A⁷⁾.*

Since the 1960s, the studies of vitamin A have been focused on explanation of its metabolic and biochemical pathways. In 1969, Fulton and Kligman proposed the use of retinoic acid for the treatment of skin diseases such as different types of acne and psoriasis⁵⁾. Topical treatment of psoriasis with retinoids was introduced in 1997¹⁵⁾. In the 1970s, Saffiotti disclosed the anticancer activity of vitamin A.

Starting from 1974, the WHO and UNICEF organizations have distributed large amounts of vitamin A throughout the developing countries preventing deaths of about 350 thousand children annually¹⁰⁾. The interest in retinoids as anti-ageing substances emerged in the end of the 1980s, after publication of results of the studies on the use of tretinoin as the active ingredient of anti-ageing activity. In 1986 and 1988^{16, 17)}, the use of isotretinoin was accepted as the most effective therapy of acute acne, as mentioned by Bauman and Moscona-Nissan^{17, 18)}.

Structure of retinoids and their diversity

Retinoids encompass a number of chemical compounds of similar properties and structure characteristic of vitamin A⁷⁾. From the first use of retinol for the treatment of acne, in 1969 by Prof. Albert Kligman, about 2500 new retinoids have been synthesized^{17, 19, 20)}.

Retinoids include both natural and synthetic derivatives of retinol and their growing number induced the need for their ordering according to the chemical structure²¹⁾. Retinoids of the first generation comprise natural compounds: retinol, retinoic aldehyde (retinal) and isomers of retinoic acid (isotretinoin, tretinoin). The compounds from this group show a wide range of activities in the treatment of different types of acne²²⁾. Moreover, only the compounds representing this group show anti-ageing activity^{19, 21, 22)}. Retinoids of the second generation comprise the monoaromatic synthetic analogues of retinol: acitretin and etretinate. The compounds are used e.g., for the treatment of psoriasis¹⁵⁾, ichthyosis and Darier's disease¹⁹⁾. Retinoids of the third generation (called arotinoids) comprise the poliaromatic synthetic compounds: adapalene, tazarotene and bexarotene. The compounds from this group show selective activity towards specific receptors¹⁾. The compounds from this group significantly differ from those from the other groups, but similarly to them show affinity to the relevant

tazaroten wiąże się selektywnie z receptorami β i γ kwasu retinowego (RAR) na błonie komórkowej keratynocytów, a następnie jest transportowany do jądra komórkowego. Ponieważ retinoidy z tej grupy mają wpływ na transkrypcję genów w keratynocytach, znalazły swoje zastosowanie m.in. w terapii chorób nowotworowych, wspomnianej wcześniej łuszczycy^{15, 23, 24} oraz różnych odmian trądzika¹⁹.

Zdaniem Baumann¹⁷ kolejne generacje retinoidów powstawały w wyniku modyfikacji szkieletu kwasu retinowego. Dzięki temu retinoidy III generacji są bardziej fotostabilne w porównaniu z cząsteczkami I i II generacji oraz wykazują znacznie mniejszy potencjał drażniący.

Metabolizm retinoidów

Podstawowa struktura cząsteczek retinoidów składa się z cyklicznej grupy terminalnej (pierścieni β -jononu) oraz polienowego łańcucha bocznego zakończonego grupą polarną^{1, 25, 26}. Oba te elementy mogą być modyfikowane.

Efekt terapeutyczny retinoidów osiągany jest poprzez ich wiązanie się z receptorami występującymi w jądrze komórkowym. Ze względu na swój lipofilowy charakter⁶ witamina A trudno rozpuszcza się w hydrofilowych płynach ustrojowych. Do ich transportu i działania niezbędne są właściwe białka występujące w osoczu RBP (retinoid binding proteins) oraz w cytoplazmie CRBP (cellular retinoid binding proteins²³) lub cytosolic retinoic binding protein²¹). RBP jest białkiem transportowym, które wiąże się z retinoidem. Po dotarciu do wnętrza keratynocytu łączy się z receptorem wykazującym powinowactwo do retinolu CRBP lub kwasu retinowego CRABP (cytosolic retinoic acid binding protein²⁷). Powstały kompleks jest substratem do dalszych procesów i przemian zachodzących w komórce (rys. 1).

Według Murray i współpr.^{2, 17} objawy toksyczności występują w chwili przekroczenia całkowitego wysycenia RBP i ekspozycji komórek na retinol wolny, niezwiązany z białkiem nośnikowym. Ponadto retinol

receptors. According to Chaudhari et al.¹⁵ tazarotene binds selectively to the receptors of β and γ of retinoic acid (RAR) on the cell membrane of keratinocytes, and then it is transported to the cell nucleus. As the retinoids from this group have impact on the gene transcription in keratinocytes, they have found use in the therapies of cancer, psoriasis^{15, 23, 24} and different types of acne¹⁹.

As claimed by Bauman¹⁷, subsequent generations of retinoids were obtained as a result of modifications of the retinoic acid skeleton, consequently, the 3rd generation retinoids are more photostable than those of the 1st and 2nd ones and show much lower irritating potential.

Metabolism of retinoids

The main structure of the retinoids molecules comprises a cyclic terminal group (β -ionone ring) and a polyene side chain terminated with a polar group^{1, 25, 26}, both of them can be modified.

The therapeutic effect of retinoids is realized through their bonding to the receptors in the cell nucleus. The lipophilic nature of retinoids⁶ makes them hardly soluble in the body fluids, so their transportation and activity needs the engagement of appropriate proteins present in the blood serum RBP (retinoid binding proteins) and in the cytoplasm CRBP (cellular retinoid binding proteins²³) or cytosolic retinoic binding protein²¹). RBP is a transport-

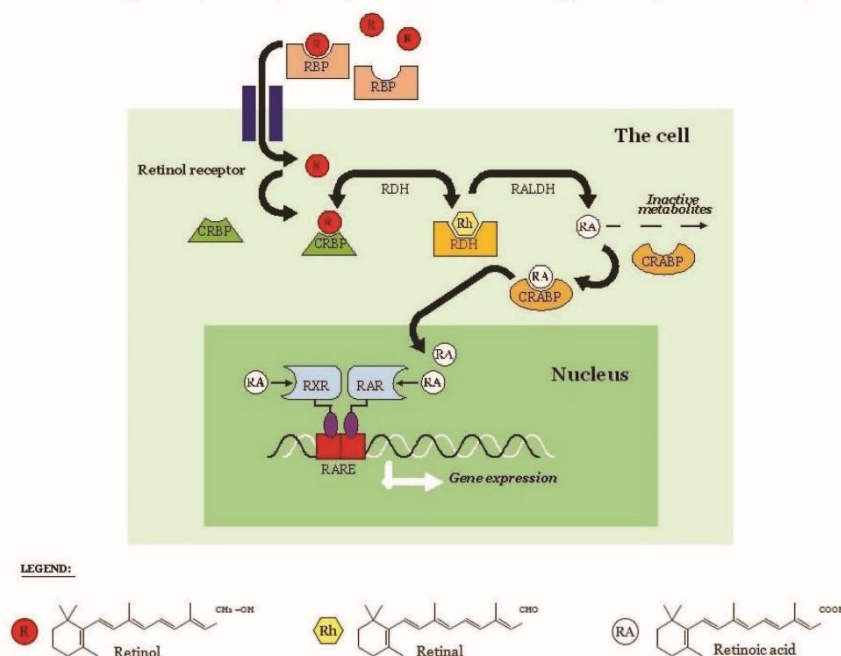


Fig. 1. The retinoids metabolic pathway in the cell
Rys. 1. Szlak metaboliczny retinoidów w komórce

uczestniczy w ekspresji pewnych genów, zachowując się pod tym względem jak hormony steroidowe. W przemianie retinolu w retinal bierze udział dehydrogenaza retinolu, natomiast dehydrogenaza retinaldehydu uczestniczy w utlenianiu retinalu do kwasu retinowego²⁸. Retinoidy wykazują swoje działanie poprzez grupy receptorów RAR (*retinoic acid receptors*) oraz RXR (*retinoid X receptors*)^{16,17}, które znajdują się w jądrze komórkowym. Te dwa rodzaje receptorów zawierają inne ligandy zdolne do wiązania się z określonym retinoidem. Mogą one występować w postaci trzech izotypów oznaczanych jako α , β , γ i kodowanych przez różne geny²³. Ekspresja receptorów jest tkankowo-specyficzna. Są one obecne tylko w niektórych tkankach i komórkach, takich jak np. naskórek (dominuje tu podtyp RAR γ ²¹), mieszkci włosowe czy gruczoły łojowe.

Retinol będący podstawową formą witaminy A musi zostać dostarczony do organizmu w pożywieniu, suplementacji lub miejscowo na skórę. Retinol związany z białkiem RBP jest transportowany do komórki. Podobnie postacie estrowe retinolu są magazynowane w komórce. Wewnątrz komórki retinol jest konwertowany do retinalu¹², a ten przechodzi w kwas retinowy. Procesy zachodzące między poszczególnymi etapami są odwracalne, jedynie konwersja do formy kwasowej jest trwała²³. Należy podkreślić, że 95% retinalu jest konwertowane do retinolu i dalej do postaci estrowej, a tylko 5% ulega przemianom do postaci kwasowej⁵ (rys. 2).

ing protein that binds to retinoids. Upon reaching the inside of the keratinocyte, retinoids bind to the receptor showing affinity to retinol CRBP or retinoic acid CRABP (cytosolic retinoic acid binding protein)²⁷. The complex formed is a substrate for further processes and transformations taking place in the cell (Fig. 1).

According to Murray et al.^{2,17}, the toxic symptoms appear with total saturation of RBP and the cells' exposure to free retinol, i.e., non-bonded to the protein carrier. Moreover, retinol is involved in the expression of certain genes, in a way similar to that of steroid hormones. The retinol metabolic pathway involves the use of retinol dehydrogenase, while retinaldehyde dehydrogenase is engaged in oxidation of retinal to retinoic acid²⁸. The activity of retinoids is realized through binding to RAR (retinoic acid receptors) and RXR (retinoid X receptors)^{16,17} present in the cell nucleus. The two types of receptors contain different ligands capable of binding to a specific retinoid. They may occur in the form of three isotopes labelled as α , β , γ , coded by different genes²³. The expression of receptors is tissue-specific. They occur only in certain tissues and cells, e.g., in epithelium in which RAR γ type dominates²¹, in hair follicles and sebaceous glands.

Retinol, the basic form of vitamin A, must be supplied from outside with food, supplementation of topically on the skin. Retinol bonded to RBP protein is transported into the cell. Similarly, the ester species of retinol are stored in the cell with the help of esterase. Inside the cell, retinol is oxidized to retinal¹² that is further converted to retinoic acid. The processes taking place between particular stages are reversible, only the conversion to retinoic acid is not²³. It should be emphasized that 95% of retinal is converted to retinol and then to the ester species, whereas only 5% of this compound undergoes conversion to retinoic acid⁵ (Fig. 2).

Retinol and retinal are inactive precursors of the only biologically active retinoid that is retinoic acid^{5,29}. Retinol may occur in 6 biologically active isoforms: all-trans, 11-cis, 13-cis, 9,13-di-cis, 9-cis and 11,13-di-cis, with the dominant all-trans isoform²⁸. The activities of retinoids can be evaluated on the basis of induction of the CRABP protein and according to activity they can be ordered as follows from the highest to the lowest: retinoic acid, retinal, 9-cis-retinoic acid, retinol, and beta-carotene²⁰. A similar ordering was

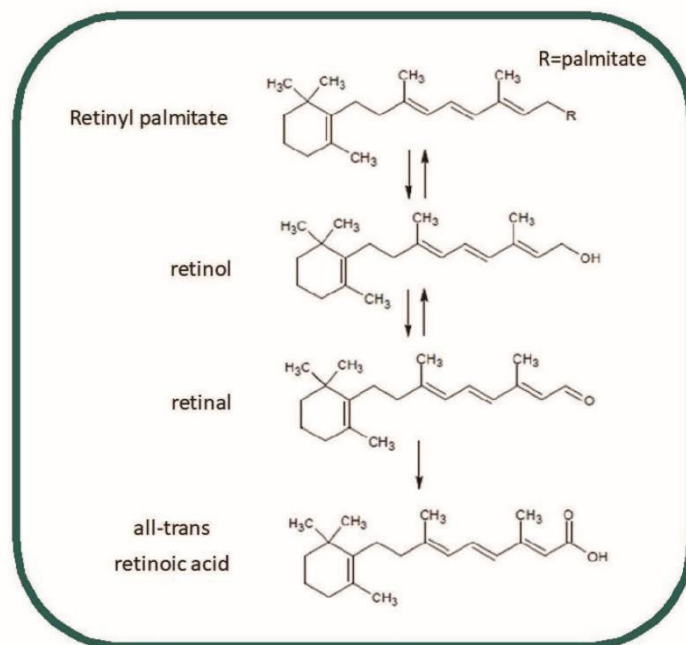


Fig. 2. Chemical transformation of retinoids
Rys. 2. Chemiczna przemiana retinoidów

Retinol i retinal grają rolę prekursora w biosyntezie aktywnych retinoidów^{3, 29)}, ponieważ tylko kwas retinowy jest postacią, która wykazuje aktywność biologiczną. Retinol ma 6 aktywnych biologicznie izoform: all-trans, 11-cis, 13-cis, 9,13-di-cis, 9-cis i 11,13-di-cis, przy czym dominującą jest all-trans²⁸⁾. Aktywność tych postaci witaminy A można ocenić na podstawie indukcji białka CRABP, która od największej przedstawia się następująco: kwas retinowy, retinal, kwas 9-cis-retinowy, retinol, beta-karoten²⁰⁾. Podobnego zdania jest Saha¹⁶⁾, szeregując retinoidy wg ich mocy od retinolu, przez retinal, do kwasu retinowego jako najsilniej działającego. Bojarowicz natomiast uważa, że kwas all-trans retinowy ma największą aktywność biologiczną²¹⁾ i jest najlepiej przebadany²⁴⁾. Murray i współpr. piszą, że to retinol wykazuje pełną aktywność witaminy A, zaś pozostałe związki (retinal oraz kwas retinowy) tylko niektóre jej właściwości biologiczne²⁾. Baumann z kolei uważa, że chociaż retinol jest 20-krotnie mniej aktywny niż kwas retinowy, wykazuje lepszą penetrację przez poszczególne warstwy skóry. Porównuje także 0,25-proc. stężenie retinolu bez podrażnień z efektami terapeutycznej i drażniącej 0,025-proc. postaci kwasowej retinoidu¹⁷⁾. Zgodnie z raportem wydanym przez SCCS spośród pochodnych witaminy A największą siłę działania na 1 mg retinoidu, biorąc pod uwagę International Units (IU), ma retinol (3330 IU), następnie octan retinyłu (2900 IU) i palmitynian retinyłu (1830 IU)³⁰⁾.

Właściwości

Witamina A nazywana jest czynnikiem normalizującym i witaminą wzrostową. W codziennej diecie jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. To składnik rodopsyny, białka uczestniczącego w procesie widzenia. Bierze także udział w procesach odpornościowych i embriogenezy. Korzystnie wpływa na wszystkie warstwy skóry. Działa antyoksydacyjnie i przeciwwołnorośnikowo. Retinoidy mają także szerokie zastosowanie w wielu terapiach leczniczych, takich jak terapia trądziku, łuszczyca, a nawet cukrzyca i chorób nowotworowych. Saha uważa ponadto, że możliwość miejscowego stosowania retinoidu korzystnie wpłynie na melanogenezę i redukcję plam pigmentacyjnych opartą na jego zdolności do rozpraszania melanosomów. Retinoidy mogą hamować inhibicję tyrozy-nazy²⁰⁾. Kelly i współpr.³²⁾ uważają, że tretynoina zmniejsza hiperpigmentację nawet u osób z fototypem V i VI.

Mimo licznych właściwości niepożądanych, pozytywny wpływ retinoidów wykorzystywany jest w terapiach, zwłaszcza tych ukierunkowanych na kondycję skóry.

Postacie witaminy A stosowane w kosmetyce^{7, 31, 33)} i produktach medycznych^{33, 34)}

Kwas retinowy (tretynoina), jego 13-cis izomer (izotretynoina) oraz różne syntetyczne retinoidy (adapalen i tazaroten)

proposed by Saha¹⁶⁾, from the strongest retinoic acid, through retinal to retinol. Bojarowicz claims that all-trans retinoic acid shows the highest biological activity²¹⁾ and has been the best studied²⁴⁾. According to Murray et al.²⁾, retinol shows the full activity of vitamin A, while the other compounds (retinal and retinoic acid) reveal only certain types of biological activity. It should be noted that Bauman claims that although retinol is by about 20 times less active than retinoic acid, it shows much more effective penetration through the skin layers. He has also compared the effects of retinol in 0.25% concentration which is not related to irritations with the therapeutic effects of retinoic acid used in the same concentration and producing irritation¹⁷⁾. According to the SCCS report, when expressed in International Units (IU) per 1 mg of substance, the strongest activity of 3330 IU shows retinol, then retinyl acetate (2900 IU) and retinyl palmitate (1830 IU)³⁰⁾.

The properties of vitamin A

Vitamin A is known as the normalizing factor or growth vitamin. It is indispensable for correct functioning of human organism and must be provided with everyday diet. It is a component of rhodopsin – the protein supporting the process of seeing. Besides, vitamin A is takes part in the processes of embryogenesis and immunological reactions, has a beneficial impact on all layer of the skin, shows antioxidative and anti-free-radical activity. Retinoids are widely applied in many therapies, e.g., in the treatment of acne, psoriasis, diabetes and even cancer. As reported by Saha²⁰⁾, retinoids in topical application show a beneficial effect on melanogenesis and, thanks to their ability to scatter melanosomes, they may reduce the pigment spots. Retinoids may hinder the inhibition of tyrosinase. According to Kelly et al.³²⁾, tretinoin is able to reduce hyperpigmentation even in the persons with phototypes V and VI.

Although retinoids show a number of undesirable effects, their positive influence is employed in many therapies, especially targeting the condition of the skin.

Vitamin A forms used in cosmetic^{7, 31, 33)} and medical products^{33, 34)}

Retinoic acid (tretinoin), its 13-cis isomer (isotretinoin) and some synthetic retinoids (adapalene and tazarotene) are used for therapeutic applications exclusively in medicines and medical products, while retinal, retinol and retinyl esters can be used as cosmeceuticals³⁴⁾ because of their controlled conversion to retinoic acid or direct biological effect irrespective of receptor. The most popular retinoids used in cosmetic and medical products are listed in Table.

Table. The most popular retinoids used in cosmetic* and medical products**

Tabela. Postacie witaminy A stosowane w kosmetyce* i produktach medycznych**

Retinoid/Retinoid	Structural formula/Wzór strukturalny	Chemical name and formula/ Nazwa i wzór chemiczny	Activity/effect/ Działanie/efekt
<i>Retinol*/Retinol*</i> (INCI: <i>retinol</i>) used in concentration up to 0.3%/używany w stężeniach do 0,3%		<i>unsaturated alcohol</i> alkohol nienasycony $C_{20}H_{30}O$	<i>anti-acne</i> /przeciwtrądzikowe <i>anti-ageing</i> /przeciwstarzeniowe <i>anti-discoloration</i> /depigmentacyjne
<i>Retinal*/Retinal*</i> (INCI: <i>retinal</i>)		<i>retinaldehyde</i> / aldehyd retinowy $C_{20}H_{28}O$	<i>anti-acne</i> /przeciwtrądzikowe <i>anti-ageing</i> /przeciwstarzeniowe <i>anti-rosacea</i> /przeciw trądzikowi różowatemu ⁽¹⁾
<i>Retinyl palmitate*/</i> Palmitynian retinylu (INCI: <i>retinyl palmitate</i>)		<i>an ester of retinol and palmitic acid</i> /ester retinolu i kwasu palmitynowego $C_{36}H_{60}O_2$	<i>antioxidant</i> /antyoksydacyjne <i>moisturizing</i> /nawilżające <i>anti-ageing</i> /przeciwstarzeniowe
<i>Retinyl acetate*/</i> Octan retinylu (INCI: <i>retinyl acetate</i>)		<i>an ester of retinol and acetic acid</i> /ester retinolu i kwasu octowego $C_{22}H_{32}O_2$	<i>antioxidant</i> /antyoksydacyjne <i>moisturizing</i> /nawilżające <i>anti-ageing</i> /przeciwstarzeniowe <i>anti-cancer</i> /przeciwrakowe
<i>Retinyl retinoate*/</i> Retinian retinylu (INCI: <i>retinyl retinoate</i>)		<i>retinol and retinoic acid</i> / retinol i kwas retinowy	<i>anti-acne</i> /przeciwtrądzikowe <i>antibacterial</i> /przeciwbakteryjne <i>anti-wrinkling</i> /przeciwzmarszczkowe
<i>Retinyl esters of sunflower seed acids*/</i> retinylowe estry kwasów tłuszczowych oleju słonecznikowego (INCI: <i>retinyl sunflowerseedate</i>)		<i>a mixture of retinol and sunflower fatty acids:</i> <i>retinyl linoleate (55–70%);</i> <i>retinyl oleate (18–32%);</i> <i>retinyl palmitate (5–8%);</i> <i>retinyl stearate (3–6%)</i> mieszanina retinolu i kwasów tłuszczowych słonecznika: linoleinian retinylu (55–70%); oleinian retinylu (18–32%); palmitynian retinylu (5–8%); stearynian retinylu (3–6%)	<i>anti-wrinkling</i> /przeciwzmarszczkowe <i>anti-discoloration</i> /depigmentacyjne ⁽²⁾
<i>Hydroxypinacolone retinoate*/</i> retinian hydroksypinakolonu (INCI: <i>hydroxypinacolone retinoate</i>)		<i>an ester of retinoic acid</i> / ester kwasu retinowego $C_{26}H_{38}O_3$	<i>anti-ageing</i> /przeciwstarzeniowe

Retinoid/Retinoid	Structural formula/Wzór strukturalny	Chemical name and formula/ Nazwa i wzór chemiczny	Activity/effect/ Działanie/efekt
<i>Tretinoin**used in concentration up to 0.1%/</i> Tretynoina używana w stężeniach do 0,1%		<i>retinoic acid/kwas retinowy</i> $C_{20}H_{28}O_2$	<i>anti-acne (different types, including drug-resistant acne)/</i> przeciwtrądzikowe (różne rodzaje, w tym trądzik lekooporny) <i>anti-psoriasis/</i> przeciwłuszczycowe <i>anti-ageing/</i> przeciwstarzeniowe <i>anti-photageing/</i> przeciwfotostarzeniowe <i>anti-discoloration/</i> depigmentacyjne ⁴³⁾
<i>Isotretinoin**/</i> Izotretynoina		<i>retinoic acid/kwas retinowy</i> $C_{20}H_{28}O_2$	<i>anti-seborrhea/</i> przeciwłojotokowe <i>anti-ageing/</i> przeciwstarzeniowe <i>anti-acne/</i> przeciwtrądzikowe
<i>Tazarotene**used in concentration up to 0.1%/</i> Tazaroten używany w stężeniach do 0,1%		<i>acetylenic form of retinoid/</i> acetylenowa postać retinoidu	<i>anti-psoriasis/</i> przeciwłuszczycowe <i>anti-inflammation/</i> przeciwzapalne <i>regulating differentiation of keratinocytes/</i> regulacja różnicowania keratynocytów <i>anti-acne/</i> przeciwtrądzikowe <i>anti-rosacea/</i> przeciw trądzikowi różowatemu
<i>Adapalene**used in concentration up to 0.1%/</i> Adapalen używany w stężeniach do 0,1%		<i>multiring aromatic carboxylic acid/wielopierścieniowy aromatyczny kwas karboksylowy</i> $C_{28}H_{28}O_3$	<i>anti-acne/</i> przeciwtrądzikowe <i>anti-comedogenic/</i> przeciwzaskórnikowe <i>anti-inflammatory/</i> przeciwzapalne

są stosowane w celach terapeutycznych wyłącznie w lekach i produktach medycznych, natomiast retinal, retinol i estry retinylu, ze względu na kontrolowaną konwersję do kwasu retinowego lub bezpośrednie działanie biologiczne niezależne od receptora, mogą być stosowane jako kosmetyki³⁴⁾. Najpopularniejsze retinoidy stosowane w produktach kosmetycznych i medycznych wymieniono w tabeli.

Funkcja retinoidów w skórze

Suplementacja witaminy A oraz uzupełnianie jej niedoborów za pomocą diety nie zawsze są wystarczające dla skóry. Dzieje się tak, gdyż skóra jako pierwsza oddaje swój ekwiwalent witaminy A, natomiast otrzymuje ją w ostatniej kolejności³⁵⁾. Do spadku zawartości witaminy A przyczynia się także promieniowanie słoneczne, w szczególności UVA³⁶⁾. W związku z tym jej regularne miejscowe dostar-

The functions of retinoids in the skin

Supplementation of vitamin A with a diet is often insufficient for good condition of the skin as the skin is the first to supply its equivalent of vitamin A to meet the needs of the organism and it is the last to get its own supply³⁵⁾. Reduced level of vitamin A in the skin is also a consequence of the effects of solar radiation, in particular from the UVA range³⁶⁾. In view of the above, its regular topical supply in the form of a cosmetic or medical products may be vital.

Vitamin A affects many processes taking place in the skin: it stimulates the activity of fibroblasts and their proliferation, stimulates the syntheses of elastin and collagen²⁹⁾, in particular collagen I and III, and the anchoring collagen VII). It contributes to general improvement in the epithelium architecture¹⁷⁾ through

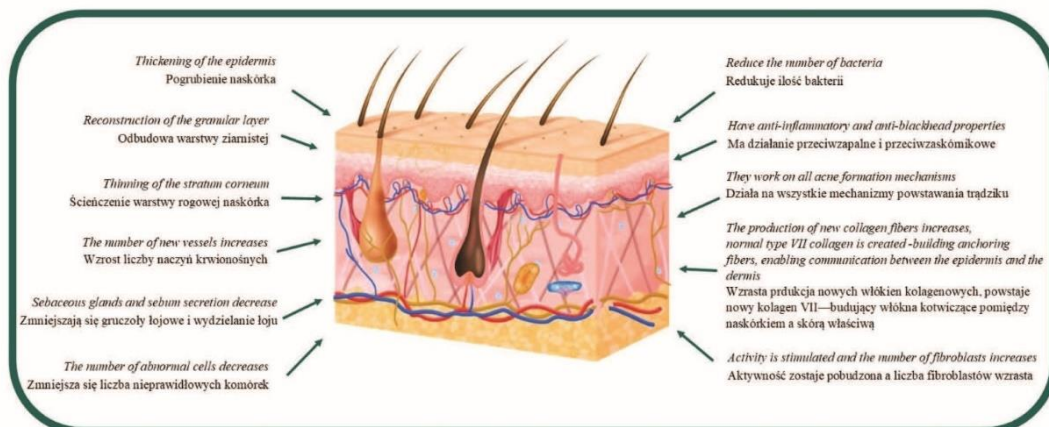


Fig. 3. Role of retinoids in the skin
Rys. 3. Rola retinoidów w skórze

czanie w postaci produktu kosmetycznego lub medycznego może okazać się kluczowe.

Witamina A wpływa na wiele procesów zachodzących w skórze: pobudza aktywność fibroblastów i ich proliferację, stymuluje syntezę elastyny i kolagenu²⁹⁾ (w szczególności I i III oraz kotwiczącego kolagenu VII). Zauważalna jest także ogólna poprawa architektury naskórka¹⁷⁾ przez zagęszczenie i przywrócenie właściwych proporcji w poszczególnych jego warstwach. Retinoidy działają regulująco na proces łuszczenia się naskórka poprzez zmniejszenie proliferacji keratynocytów i wzmocnienie procesu ich różnicowania^{37, 38)}. Retinoidy zmniejszają wielkość melanocytów¹⁷⁾ i tym samym zmniejszają powstawanie przebarwień na skórze. Opisano także ich pozytywny wpływ na przyspieszenie gojenia się ran oraz na zdolności naprawcze naskórka³⁶⁾. Ważną ich cechą jest działanie przeciwzapalne^{19, 38)}. Retinoidy wpływają także na wszystkie mechanizmy związane z powstawaniem trądziku, m.in. na regulację pracy gruczołów łojowych³⁷⁾ (rys. 3).

Działania niepożądane, ograniczenia i przeciwwskazania

Mimo szerokiego spektrum działań niepożądanych^{18, 22)}, retinoidy od wielu lat są odpowiedzią na wiele problemów skórnych. Wyzwania i postępy w miejscowym aplikowaniu preparatów z retinoidami¹⁴⁾ są motorem ciągłego poszerzania już i tak licznej rodziny witaminy A. Nowe postacie retinoidów dążą do zmniejszenia działań niepożądanych, takich jak złuszczenie naskórka, rumień czy podrażnienie skóry^{29, 39)}. Znane są także przypadki zwane retinoidowym zapaleniem skóry lub reakcją retinoidową. Działania niepożądane występują w szczególności we wczesnej fazie aplikacji preparatu na skórę^{26, 38)}. Dla uzyskania

promoting increased density and restoration of correct proportions of collagen in its layers Retinoids have regulating effect on the peeling of the epidermis by reduction of keratinocytes proliferation and enhancement of the process of their differentiation^{37, 38)}, they also reduce the size of melanocytes¹⁷⁾ so have a beneficial effect in counteracting the appearance of skin discolorations. Their positive effect on the self-healing capacity of the epidermis and thus on the healing of wounds has also been described³⁶⁾. An important area of their activity are the anti-inflammatory abilities^{19, 38)}. In general, retinoids are known to be involved in all mechanisms related to the appearance of acne, in particular in regulation of sebaceous glands activity³⁷⁾ (Fig. 3).

Undesirable effects, limitations and counterindications

Although retinoids have been established to show a wide range of undesirable effects^{18, 22)}, they have been the treatment of choice for many problems of the skin. The progress in the knowledge of the effects of topical use of preparations with retinoids and mechanisms of their interaction with the skin¹⁴⁾ stimulates the search for new members of the vitamin A family showing target properties.

New formulations with retinoids have been proposed aiming at alleviation of the undesirable effects such as peeling of the epithelium, erythema or skin irritation^{29, 39)} or even retinoid skin inflammation or retinoid response, appearing at the first stage of retinoid preparation application on the skin^{26, 38)}. In order to enhance their bioavailability and reduce their toxicity, increasingly often retinoids are applied in the formulations

większej biodostępności i zmniejszenia toksyczności coraz częściej stosowane są retinoidy w postaci liposomalnej, nanocząsteczek i etosomów⁴⁰. Enkapsulowana witamina A jest bardziej stabilna i odporna na czynniki atmosferyczne, takie jak promieniowanie UV i temperatura^{14, 29}, a proces estyfikacji minimalizuje występowanie działań niepożądanych³⁷.

Podsumowanie

Szeroka gama retinoidów dostępnych na rynku, zarówno kosmetycznym, jak i farmaceutycznym, umożliwia dostosowanie odpowiedniej formacji i stężenia do indywidualnych potrzeb użytkownika. Dzięki nowoczesnym metodom biochemicznym nowe postaci retinoidów pozwalają na zachowanie szerokiego spektrum działania przy wyeliminowaniu efektów niepożądanych, ponieważ to właśnie działania niepożądane są jedynym ograniczeniem w stosowaniu tych substancji aktywnych. Tworzenie nowoczesnych retinoidów w formie estrów, lipo- i etosomów czy koniugatów zapowiada dynamiczny rozwój związków należących do rodziny witaminy A.

with liposomes, nanoparticles and ethosomes⁴⁰. The encapsulated vitamin A is more stable and resistant to the environmental agents (UV, temperature)^{14, 29} also the process of esterification is known to minimize the undesirable effects³⁷.

Conclusion

A wide range of retinoids available on the cosmetic and medical market permits adjustment of their formulations and concentrations to the specific needs of individuals. New formulations with retinoids as the active ingredient maintain the wide spectrum of their activity while eliminating the undesirable effects that have been the main limitation in their use. The successful use of retinoids in the form of esters, liposomes or ethosomes or conjugates has opened the area of dynamic development of the treatment with the compounds representing the vitamin A family.

Received/Otrzymano: 28-11-2022

REFERENCES/LITERATURA

- [1] M. Boryczka, B. Pasker, M. Sosada, *Farm. Przegl. Nauk.* 2010, **8**, No. 67, 8.
- [2] R.K. Murray, D.K. Grammer, P.A. Mayes, V.W. Rodwell, *Biochemia Harpera*, PZWL, Warszawa 1995.
- [3] J. Igielska-Kalwat, *Badania wpływu form kosmetycznych na biodostępność wybranych karotenoidów*, Praca doktorska, UAM, Poznań 2016, 243.
- [4] R. Tung, M. Rubin, *Chemical peels*, Elsevier Health Sciences, 2011.
- [5] M. Jaworska, E. Sikora, J. Ogonowski, *Wiad. Chem.* 2011, **65**, No. 3/4, 301.
- [6] P. Mosczyński, R. Pyć, *Biochemia witamin. Cz. 2. Witaminy lipofilne i kwas askorbinowy*. PWN, Warszawa 1999.
- [7] K. Jurowski, W. Piekoszewski, *Toksykologia i ocena bezpieczeństwa kosmetyków*, PZWL, Warszawa 2019.
- [8] L. Tratnjek, J. Jeruc, R. Romih, D. Zupančič, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, **22**, No. 7, 3510.
- [9] G. Wolf, *FASEB J.* 1996, **10**, No. 9, 1102.
- [10] A. Sommer, *J. Nutrition* 2008, **138**, No. 10, 1835.
- [11] D.J. Lanska [in:] *Handbook of clinical neurology*, Elsevier 2009, **95**, No. C, 435.
- [12] G.G.J. Berg, L. Stryer, J. Tymoczko, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2018.
- [13] B. Tarnowska, *Nagrody Nobla*, PWN, Warszawa 2001.
- [14] R. Ferreira, J. Napoli, T. Enver, L. Bernardino, L. Ferreira, *Nat. Commun.* 2020, **11**, No. 4265, 1.
- [15] P.P. Chaudhari, D.K. Stern, M.G. Lebwohl [in:] *Treatment of Psoriasis* (red. J.M. Weinberg), Birkhauser 2008, 41, 57.
- [16] R. Saha, *Intern. J. Pharm. Sci. Res.* 2012, **3**, No. 1, 59.
- [17] L. Baumann, *Cosmetic dermatology*, McGraw-Hill Education 2009.
- [18] A. Moscona-Nissan, *Acad. Lett.* 2021, No. June, 1.
- [19] E. Nicolaidou, A.D. Katsambas, *Clin. Dermatol.* 2000, **18**, No. 1, 87.
- [20] A. Czarnota, *Kosmetol. Estet.* 2018, **7**, No. 4, 371.
- [21] H. Bojarowicz, A. Płowiec, *Probl. Hig. i Epidemiol.* 2010, **91**, No. 3, 352.
- [22] A. Turel, S. Ozturkcan, M. Sahin, P. Turkodogan, *Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* 2003, **17**, 601.
- [23] H. Marona, A. Guńia, E. Pękala, *Farm. Pol.* 2010, **66**, No. 3, 187.
- [24] P. Zawadzka [in:] *Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce. Choroby*, 2017, 60.
- [25] S. Mukherjee, A. Date, V. Patravale, H.C. Korting, A. Roeder, G. Weindl, *Clin. Interv. Aging* 2006, **1**, No. 4, 327.
- [26] A. Kaźmierska, I. Bolesławska, J. Przysławski, *Hygeia Public Health* 2019, **54**, No. 3, 165.
- [27] S. Khalil et al., *J. Dermatol. Treat.* 2017, **28**, No. 8, 684.
- [28] A. Aformali et al., *Ann. Bras. Dermatol.* 2013, **88**, No. 6, 930.
- [29] E.J. Rhee, J. Plutzky, *Diabetes Metab. J.* 2012, **36**, No. 3, 167.
- [30] A. Barel, M. Paye, H. Maibach, *Handbook of cosmetic science and technology*, Marcel Dekker, New York 2009.
- [31] Scientific Committee on Consumer Safety SCCS, Revision of the scientific opinion (SCCS/1576/16) on vitamin A (retinol, retinyl acetate, retinyl palmitate), 2016.
- [32] P. Kelly, S. Taylor, *Dermatology for skin of colour*, McGraw-Hill Education, 2009.
- [33] Z. Adamski, A. Kaszuba, *Dermatologia dla kosmetologów*, UM Poznań, 2008.
- [34] J. Bourke, R. Graham-Brown, *Dermatologia*, Urban & Partner, Wrocław 2010.
- [35] O. Sorg, C. Antille, G. Kaya, J.-H. Saurat, *Dermatol. Ther.* 2006, **19**, No. 5, 289.
- [36] T.C. Tsai, B.M. Hantash, *Clin. Med. Insights Dermatol.* 2008, **1**, 1.
- [37] A. Sionkowska, *Chemia kosmetyczna*, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Adama Kopernika, Toruń 2019.
- [38] B. Kim, H. Kim, J.E. Kim, S.H. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.* 2013, **10**, No. 5, 260.
- [39] A.K. Mohiuddin, *Dermatol. Clin. Res.* 2019, **5**, No. 1, 272.
- [40] O. Katara, K. Raza, B. Singh, S. Dogra, *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2010, **76**, No. 6, 612.
- [41] https://www.adeka.eu/documents/Adeka_Flyer_Retinaturel_RetinalO5.pdf, 2019.
- [42] Eastman GEM[®] retinyl sunflowerate, <https://cosmetics.specialchem.com>, 2019.
- [43] T. Ruth, N. Mammone, *J. Am. Acad. Dermatol.* 2018, **79**, No. 3, AB44.

NAUKA



Małgorzata Pawłowska

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61 614 Poznań
Dollare Polska sp. z o.o., ul. Margonińska 22, 60 425 Poznań, m.pawłowska@dollare.pl



Marta Marzec

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61 614 Poznań



Izabela Nowak

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61 614 Poznań
inowakiza@amu.edu.pl

Peptydy w nośnikach lipidowych i ich zastosowanie w produktach kosmetycznych

Peptides in lipid carriers and their application in cosmetic products

DOI: 10.15199/4.2024.2.3

Peptydy stanowią grupę związków aktywnych, docenioną przez przemysł kosmetyczny już pod koniec minionego stulecia za wszechstronny wpływ na procesy fizjologiczne zachodzące w skórze, m.in. działanie antyoksydacyjne, przeciwbakteryjne i przeciwzapalne, a przede wszystkim przeciwstarzeniowe. Encapsulacja peptydów w formie nanocząstek lipidowych może wpłynąć na poprawę skuteczności ich działania. Wyróżnia się wiele metod inkorporacji związków peptydowych do nośników lipidowych, takich jak homogenizacja wysokociśnieniowa lub z wykorzystaniem homogenizatora wysokobrotowego.

Słowa kluczowe: peptydy, stałe nanocząstki lipidowe, homogenizacja wysokociśnieniowa, homogenizacja z wykorzystaniem homogenizatora wysokobrotowego, produkty kosmetyczne

A review, with 38 refs., concerning peptides as active compds. showing a versatile effect on physiol. processes occurring in the skin, such as antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory, and above all anti-aging effects. The process of peptide encapsulation in lipid nanoparticles, improving their effectiveness, was presented. Many methods of incorporating peptide compds. into lipid carriers were described, such as high-pressure homogenization or using a high-speed homogenizer.

Keywords: peptides, solid lipid nanoparticles, high-pressure homogenization, homogenization using a high-speed homogenizer, cosmetic products

Wprowadzenie

W ostatnich dziesięcioleciach można zaobserwować znaczący wzrost zapotrzebowania rynku kosmetycznego na substancje aktywne poprawiające wygląd oraz kondycję skóry. Rośnie zainteresowanie, m.in. peptydami [1,2], których historia sięga początku XX wieku. Fischer i Hofmeister [1] opisali i zsyntetyzowali pierwsze peptydy, określając je terminami: di-, tri- oraz polipeptydy. Następnie w latach siedemdziesiątych XX wieku po raz pierwszy zsyntetyzowano peptyd miedziowy, który pod koniec lat osiemdziesiątych XX wieku zastosowano w produktach kosmetycznych [3]. Według Schegena [1], poczynając od 2000 r., odnotowano wzmożone zainteresowanie peptydami zarówno w przemyśle, jak i w jednostkach badawczo-naukowych. Od tamtej pory powstało wiele krótkołańcuchowych, syntetycznych i stabilnych peptydów. Ta grupa związków zyskała na znaczeniu ze względu na swoją aktywność i udział w licznych procesach zachodzących w skórze [3].

Peptydy w kosmetykach

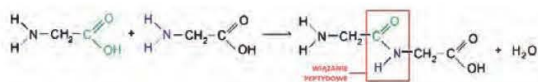
Zastosowanie bioaktywnych peptydów jako substancji czynnych jest coraz bardziej popularne ze względu na wysoki profil bezpieczeństwa, hipoaergiczną oraz ekonomiczny proces produkcyjny [4]. Bezpieczeństwo potwierdza amerykańska Agencja Żywności i Leków FDA (Food and Drug Administration), która orzekła, że pep-

tydy pochodzące z hydrolizatów białkowych mogą być stosowane w żywności [5]. Ponadto przegląd składników kosmetycznych CIR (cosmetic ingredient review) i Komitet Naukowy ds. Bezpieczeństwa Konsumentów SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) [6] wydały raporty uznające peptydy jako substancje bezpieczne do stosowania w produktach kosmetycznych w stężeniu do 0,005%. Glosariusz wspólnych nazw składników do stosowania w produktach kosmetycznych wydany przez Komisję Europejską w 2019 r. zawiera ponad 1840 wpisów ze słowem „peptyd”. Świadczyć to może o ogromnym powodzeniu tej grupy związków aktywnych w kontekście składników kosmetycznych [7]. Obecnie na rynku surowców kosmetycznych dostępne są liczne modyfikacje chemiczne peptydów. Tworzy się struktury inspirowane peptydami występującymi w sposób naturalny w skórze, jak np. matrykiny, które natywnie są elementami macierzy międzykomórkowej, a także mogą być otrzymywane poprzez syntezę chemiczną lub metodą biochemiczną [5]. Peptydy stosowane w recepturach produktów kosmetycznych mają masę cząsteczkową ok. 500 Da [3]. Początkowo uważano, że właśnie taka wielkość gwarantuje skuteczne i aktywne działanie na skórę [1]. Najnowsze badania wykazały jednak, że dzięki synergicznemu działaniu z substancjami zwiększającymi penetrację, także większe cząsteczki peptydów mogą penetrować przez warstwę rogową naskórka z zachowaniem swoich właściwości [1,8–9]. Związki peptydowe, jako substancje nie mające charakteru lipofilowego, wykazują zerowe wchłanianie pasywne, w związku z czym mogą być przyswajane wyłącznie drogą międzykomórkową [10].

Z perspektywy biodostępności istotne są dwa czynniki: hydrofilowy charakter substancji peptydowych [3,5] oraz estyfikacja łańcuchami alkilowymi, które - zdaniem Ferreiry - mogą mieć znaczący wpływ na zwiększenie penetracji przez warstwę naskórka [5].

Budowa chemiczna peptydów

Peptydy jako związki chemiczne są polimerami złożonymi z pojedynczych aminokwasów. Każdy aminokwas to związek dwufunkcyjny, który zawiera zasadową grupę aminową oraz kwasową grupę karboksylową [11-12]. Charakter bipolarnego jonu obojnego to cecha determinująca ich rozpuszczalność w wodzie [12]. Biologiczne znaczenie aminokwasów wynika z ich możliwości łączenia się w długie łańcuchy za pomocą wiązań peptydowych (amidowych) między grupą -NH₂ jednego aminokwasu a grupą -COOH kolejnego [12-13] (rys. 1).



Rys. 1. Łańcuch aminokwasów połączonych za pomocą wiązania peptydowego (źródło: Dottore Polska Sp. z o.o.)

Ze względu na różnicowaną budowę i długość łańcucha peptydy można podzielić na: (i) oligopeptydy, zawierające 2–10 reszt aminokwasowych w cząsteczce, (ii) polipeptydy, zawierające 11–100 reszt aminokwasowych i (iii) białka, zbudowane z ponad 100 reszt aminokwasowych, przy czym ten termin jest też stosowany w aminokwasach dłuższych niż 50 [12]. Co istotne, tylko 20 aminokwasów

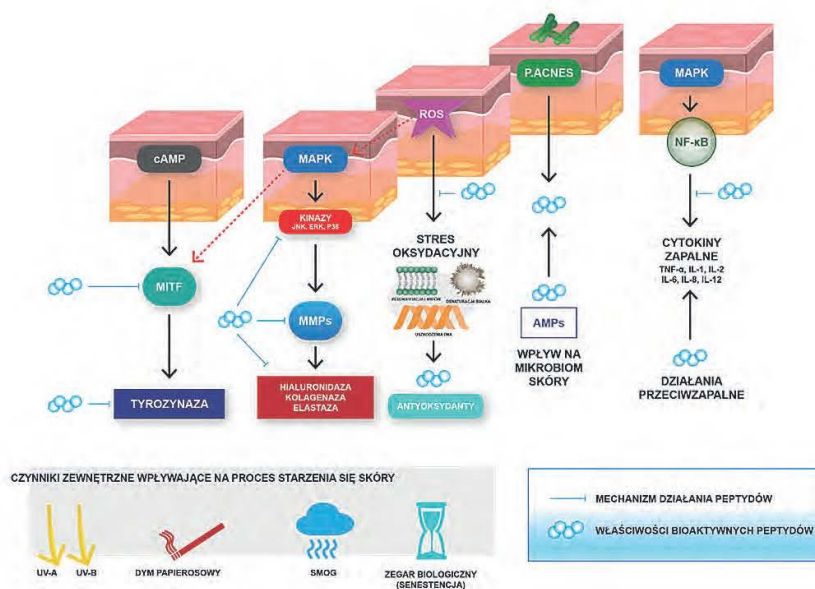
buduje wszystkie struktury białkowe w ludzkim organizmie. Z tej grupy, ludzki organizm może syntetyzować 11 aminokwasów, są to tzw. aminokwasy endogenne. Pozostałe 9 aminokwasów, nazwane egzogennymi, jest syntezowanych przez rośliny i mikroorganizmy, w związku z czym musi być dostarczane zażywaniem [12].

Działanie peptydów na skórę

Szerokie zastosowanie oraz właściwości peptydów opisał w swojej pracy Aguilar-Toalá i współpr. [4]. Badacz zwrócił uwagę na wielokierunkową bioaktywność tych związków. W swojej pracy wspominał o ogólnej poprawie kondycji skóry oraz o wspieraniu przez peptydy mechanizmów ochronnych skóry przed czynnikami zewnętrznymi (rys. 2).

Peptydy wykazują aktywność enzymatyczną, taką jak hamowanie enzymu hialuronidazy, kolagenazy, elastazy, które są odpowiedzialne za degradację macierzy pozakomórkowej oraz tyrozynazy, odpowiedzialnej za powstawanie przebarwień w skórze. W tym przypadku degradacyjne procesy biochemiczne zachodzące w skórze nasilane są dodatkowo przez czynniki zewnętrzne takie jak promieniowanie UV i zanieczyszczone powietrze [14]. Enzymatyczne działanie peptydów redukuje tym samym efekty związane ze starzeniem się skóry (spadek jędrności i elastyczności, zmarszczki, hiperpigmentacje). Peptydy wpływają też na liczne procesy fizjologiczne, takie jak redukcja skutków stresu oksydacyjnego, działanie przeciwdrobnoustrojowe i przeciwzapalne, a także ograniczenie poziomu transepidermalnej utraty wody [4].

Liczną rodziną peptydów stosowanych w kosmetyce Olejnik i Errante i współpr. [2,8] podzielił pod względem działania i funkcji w skórze. Wyróżnili: (i) **peptydy sygnałowe**, które inicjują procesy



Rys. 2 Sposoby oddziaływania peptydów na skórę w produktach kosmetycznych; cAMP - cykliczny adenozymonofosforan, MITF - czynnik transkrypcyjny związany z mikroftalmią, MAPK - kinazy białkowe aktywowane miogenami, JNK - c-jun N-końcowa kinaza, ERK - kinazy regulowane sygnałem pozakomórkowym, MMPs - metaloproteinazy macierzy, ROS - reaktywne formy tlenu, AMPs - peptydy przeciwdrobnoustrojowe, TNF-α - czynnik martwicy nowotworów-α; IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 - interleukiny zapalne; czarne strzałki wskazują mechanizm bezpośredni; przerywane czerwone strzałki wskazują mechanizm pośredni. (źródło: Dottore Polska Sp. z o.o.)

wewnątrzkomórkowe, zwiększają produkcję kolagenu, elastyny i glikozaminoglikanów. Wpływają na redukcję zmarszczek i drobnych linii oraz uszkodzeń skóry spowodowanych fotostarzeniem [2,15]. Do grupy tej należą *palmitoyl hexapeptide-12* (*Pal-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly-OH*) i *palmitoyl pentapeptide-4* (*Pal-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser-OH*); (ii) **tzw. neuropeptydy**, które pełnią funkcję inhibitorów neurotransmiterów. Ich działaniem jest związanie ze zdolnością blokowania receptorów, co zmniejsza przepływ impulsów z komórek nerwowych. Ograniczeniu ulega tym samym kurczenie się mięśni twarzy oraz tworzenie się zmarszczek mimicznych [1,15]. Syntetyczne peptydy będące analogami łańcuchów aminokwasowych białka synaptycznego SNAP-25 mogą przejmować funkcję inhibitorów i wpływać na pożądane zakłócenia w kompleksie SNARE oraz na hamowanie jego aktywności. Kompleks ten jest odpowiedzialny za kurczenie się mięśni mimicznych i tym samym za utrwalanie zmarszczek na skórze [2]. Do neuropeptydów należą np. *acetyl hexapeptide-8* (*Ac-Glu-Glu-Met-Gln-Arg-Arg-NH₂*), *pentapeptide-18* (*H-Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu-OH*) oraz (iii) **peptydy transportujące** substancje aktywne w skórze, które mają zdolność stabilizacji i transportu kationów miedzi [2,5,8], manganu [2] oraz magnezu [5], niezbędnych w procesach gojenia się ran i procesach antyoksydacyjnych [2], np. *copper tripeptide-1* (*Cu(II) H-Gly-His-Lys-OH*), *manganase tripeptide-1* (*Mn(II) H-Gly-His-Lys-OH*).

Schagen [1,16], oprócz powyższych wyszczególnił dwie kolejne grupy peptydów, zwracając jednak uwagę na brak szczegółowych informacji na temat sposobu ich działania: (i) **peptydy hamujące enzymy** – oligopeptydy sojowe, fibryna jedwabiu i peptydy ryżowe stymulują lub hamują aktywność wybranych enzymów oraz (ii) **peptydy na bazie białek strukturalnych** (keratyny) – mają właściwości hemostatyczne, nawilżające i naprawcze [1,16].

Zastosowanie peptydów w produktach kosmetycznych

Peptydy mogą przenikać przez warstwy naskórka drogą dyfuzji, drogą penetracji międzykomórkowej i za pośrednictwem nośników [10]. Zdaniem Fieldsa spełnienie wymagań skutecznej i bezpiecznej terapii jest zależne od następujących warunków: (i) peptyd powinien wykazywać skuteczną i udowodnioną bioaktywność o widocznych efektach; (ii) udowodniona bioaktywność nie powinna przynosić negatywnych skutków terapeutycznych; (iii) cząsteczka peptydu nie powinna wykazywać cytotoksyczności, działania drażniącego, immunogenności ani mutagenności; (iv) cząsteczka peptydu powinna dotrzeć do założonego celu w formie nienaruszonej i aktywnej; (v) budowa fizykochemiczna peptydu powinna być stabilna, kompatybilna z innymi składnikami produktu kosmetycznego [9].

Stabilność i zgodność bioaktywnego peptydu z formulacją kosmetyczną to aspekty istotne podczas uwalniania tego składnika w aktywnej postaci w czasie kontaktu z powierzchnią skóry [9]. Przemysł kosmetyczny przyczynił się do postępów związanych z przez naskórkowym transportem substancji aktywnych. Funkcja barierowa skóry jest bardzo ograniczająca, w związku z czym opracowano wiele rozwiązań ułatwiających penetrację i absorpcję kosmetycznych składników czynnych [17].

Nanocząstki lipidowe a transport peptydów przez warstwę rogową naskórka

Stałe nanocząstki lipidowe SLN (*solid lipid nanoparticles*) to systemy transportujące substancje aktywne, cieszące się nadal nie-
stabilnym zainteresowaniem [18]. SLN zostały zsyntetyzowane po

raz pierwszy przez Profesora Müllera. Do ich utworzenia niezbędne są: macierz lipidowa złożona z mono-, di- i triglicerydów (5–30% mas.) [19], emulgatory (np. fosfolipidy), sole żółciowe (typu cholan sodu) oraz woda [19,20]. Obecność hydrofilowej substancji aktywnej wpływa na zwiększenie stabilności układu [19,20]. Technika otrzymywania SLN nie wymaga użycia rozpuszczalników organicznych, które mogłyby negatywnie wpłynąć na strukturę białkowe peptydów [21,22]. Hu [23] uważa, że SLN, w porównaniu z innymi nośnikami lipidowymi, wykazują lepszą tolerancję oraz wyższą biodostępność. Fanguero [19] zwraca także uwagę na fakt, że inkorporacja SLN zmniejsza stres chemiczny i termiczny związków peptydowych. W tym miejscu należy wspomnieć o chemicznych i fizycznych ograniczeniach stabilności peptydów, ich wrażliwości na pH, na temperaturę oraz na parametry metodyki procesu technologicznego takie jak zbyt wysokie ciśnienie podczas homogenizacji i zbyt duża szybkość mieszania [4]. Konieczne jest uwzględnienie tych ograniczeń w procesie produkcyjnym finalnej receptury kosmetycznej [20]. Czynniki takie jak sterylizacja i liofilizacja mogą uszkadzać strukturę peptydów i tym samym wpływać na ich bioaktywność. Inkorporacja peptydów w macierzy nanocząstek SLN zapewnia im lepszą ochronę przed procesami hydrolizy i utleniania. Ponadto właściwości fizykochemiczne peptydów takie jak hydrofilowy charakter związku oraz wielkość cząsteczki, mogą ograniczać penetrację transdermalną i zmniejszać biodostępność tych związków [17]. Z tego powodu coraz częściej opracowywane są metody z wykorzystaniem nanocząstek lipidowych, które zmniejszają degradację enzymatyczną oraz zwiększają przyswajalność związków aktywnych, a także zmniejszają możliwość wystąpienia na skórze skutków ubocznych specyficznych dla zastosowanej substancji czynnej [21]. Formuła SLN zapewnia lepszą stabilność inkorporowanych substancji oraz zapobiega degradacji proteolitycznej i przedłużonemu uwalnianiu związków aktywnych w czasie [20].

Metody inkorporacji peptydów w nanocząstkach lipidowych

A. Metoda mikroemulsji

Wykorzystanie metody mikroemulsji do otrzymania SLN pierwszy raz zostało opisane przez Gasco [24]. Pierwszą zastosowaną techniką inkorporacji związków peptydowych do SLN była metoda mikroemulsji na ciepło (oparta na emulsji wielokrotnej w/o/w) wykonana przez Morela [20]. Mikroemulsję uzyskuje się poprzez dodanie fazy wodnej do fazy lipidowej podczas powolnego i ciągłego mieszania [25]. Według Anil [10], podczas opracowywania procedury otrzymywania SLN z wybranymi peptydami metodą mikroemulsji, kluczowymi czynnikami są: pH dyspersji, siła jonowa fazy wodnej, a także odpowiednio dobrany związek powierzchniowo czynny [10]. Powstanie dyspersji nanocząstek lipidowych jest w przypadku tej metody wynikiem łagodnego strącania a nie mieszania mechanicznego jak w przypadku homogenizacji wysokociśnieniowej [24]. W wyniku zastosowania techniki mikroemulsji Ugazio i współpr. uzyskali zaledwie 13-proc. skuteczność wprowadzania cyklosporyny (peptydu cyklicznego) do wnętrza SLN [26]. Z kolei grupa badaczy z Uniwersytetu Shandong [27] odnotowała efektywność enkapsulacji przedziale 38–90% w przypadku mikroemulsji typu w/o/w, w zależności od inkorporowanego związku peptydowego (m.in. insuliny).

B. Homogenizacja wysokociśnieniowa

Homogenizacja wysokociśnieniowa HPH (*high pressure homogenization*) należy do najczęściej stosowanych metod otrzymywania

nanocząstek lipidowych [23,28]. Kluczowe są warunki przeprowadzenia homogenizacji, takie jak temperatura, ciśnienie oraz liczba cykli homogenizacji [20]. HPH może być wykonywana metodą „na ciepło”, która zachodzi w temperaturze powyżej temperatury topnienia lipidu, lub metodą „na zimno”, eliminującą ryzyko niekorzystnego wpływu temperatury na inkorporowane związki aktywne [18]. Ciśnienie podczas procesu może oscylować w granicach 100–2000 bar [24,25,29]. Metodą HPH posłużył się w swoich badaniach Almeida [20], który w przypadku inkorporacji lizozymu (zawartość 0,03%) zastosował 3-etapową homogenizację z wykorzystaniem ciśnienia 1000 bar. Wymienione parametry nie spowodowały uszkodzenia łańcucha aminokwasowego, a efektywność enkapsulacji wyniosła 59% [20]. Metoda ta okazała się również skuteczna w badaniu przeprowadzonym z wykorzystaniem cyklosporyny przez zespół Panklera i Müllera [30,31]. Uzyskali oni efektywność inkorporacji związku w granicach 95–98%, stosując metodę HPH na gorąco. Zdaniem Müllera i współpracowników [31], homogenizacja wysokociśnieniowa jest metodą zapewniającą efektywność inkorporacji różnego typu białek na poziomie min. 78% bez względu na to, czy wykonuje się ją metodą na ciepło, czy metodą na zimno. Pomimo, że omawiana metoda jest procesem energochłonnym, niewątpliwą jej zaletą jest bardzo krótki czas produkcji oraz łatwość przeniesienia techniki z warunków laboratoryjnych do produkcji wielkoseryjnej [18].

C. Homogenizacja z wykorzystaniem homogenizatora wysokoobrotowego

Metoda homogenizacji z wykorzystaniem homogenizatora wysokoobrotowego HSH (*high shear homogenization*) jest dość rozpowszechniona i łatwa w wykonaniu [24]. Newralgicznym aspektem techniki jest możliwość degradacji związku bioaktywnego pod wpływem wysokiej temperatury [18]. Fanguero [19] w swoich badaniach zastosowała homogenizację przez 15 min z prędkością 10 000 rpm, w celu wytworzenia dyspersji nanocząstek lipidowych opartych na emulsji typu w/o/w. Zmienna niezależna w tym przypadku była związana ze składem jakościowym i ilościowym matrycy lipidowej. Podobne badania przeprowadził zespół Molet-Rodríguez, który uzyskał nośniki lipidowe bazujące na emulsji wielokrotnej typu w/o/w z zastosowaniem prędkości 11 000 rpm. przez 5 min (pierwszy etap – $w_{1/o}$), a następnie 4 000 rpm przez 2 min (drugi etap – $w_{1/o/w2}$). Skuteczność zastosowanych metod potwierdzono na podstawie wartości parametrów fizykochemicznych dyspersji: średniej wielkości cząstek (Z-Ave), wskaźnika polydispersyjności (Pdl) oraz potencjału zeta (ZP) [19,32]. W doświadczeniu własnym, enkapsulację oligopeptydu (stężeniu 0,05%) do nanocząstek lipidowych opartych na emulsji wielokrotnej $w_{1/o/w2}$ przeprowadzono z wykorzystaniem metody HSH z prędkością 8500 rpm w czasie 15 min. Podobnie jak w doświadczeniach Fanguero i Molet-Rodríguez, wartości parametrów fizykochemicznych dyspersji (Z-Ave, Pdl oraz ZP) potwierdziły zasadność optymalizacji metody oraz stabilność dyspersji w różnych temperaturach przechowywania (4, 25, 45°C).

D. Metoda emulgowania i odparowania rozpuszczalnika

Metoda emulgowania i odparowania rozpuszczalnika jest szeroko stosowaną metodą enkapsulacji białek terapeutycznych do nośników lipidowych, jakimi są stałe nanocząstki lipidowe. Metoda została zastosowana po raz pierwszy przez Sjöströma i Bergenståhla [20,24], poprzez strącanie w emulsji o/w. Obejmuje tworzenie emulsji o/w poprzez łączenie lipofilowego związku z częściowo mieszanym rozpuszczalnikiem (o niskiej toksyczności np. cykloheksanem), który

jest w kolejnym etapie emulgowany w fazie wodnej [24,25]. Zdaniem Saupe i współpracowników [25] zaletą metody jest brak podwyższonej temperatury podczas przebiegu procesu, co może być istotne dla czynnych związków termowrażliwych [25,33]. Ponad Almeida [20] uważa, że technika oparta na emulsji wielokrotnej (w/o/w), wpływa na skuteczność enkapsulacji substancji hydrofilowych oraz pozwala uniknąć stresu termicznego lub ciśnieniowego inkorporowanego białka [20,23]. Garcia-Fuentes i współpracownicy [34,35] dowiedli ponad 90-proc. efektywność inkorporacji kalcytoliny do nanocząstek lipidowych z wykorzystaniem metody odparowania rozpuszczalnika. Mniejszą skuteczność metody przy próbie enkapsulacji insuliny uzyskał Zhang [27] osiągając stopień załadowania na poziomie 68% oraz Reithmeier z zespołem [36] uzyskując < 75% w przypadku somatostatyny. Niemniej jednak Lasoń [24] zwraca uwagę, że dostępne badania wskazują, że metoda ta znacząco ustępuje HPH w zakresie efektywności uzyskiwanych wyników. Niezaprzeczalną wadą metody jest zmniejszone stężenie lipidów spowodowane stosowaniem substancji rozpuszczającej oraz obecność pozostałości rozpuszczalnika w końcowej dyspersji [25].

Podsumowanie

Dostępna literatura wskazuje na skuteczność i wszechstronność nanocząstek lipidowych jako systemów transportujących związki peptydowe. Szczególne zainteresowanie widoczne jest w gałęzi medycyny oraz farmacji. Przedłużone w czasie uwalnianie oraz właściwości okluzyjne to niezaprzeczalne zalety metody z wykorzystaniem stałych nanocząstek lipidowych [15,21,37]. Inkorporacja związku aktywnego do matrycy lipidowej zawartej w SLN wpływa na stabilność związku aktywnego i eliminuje degradację enzymatyczną [20]. Ze względu na duże zainteresowanie związkami peptydowymi w przemyśle kosmetycznym warto docenić działanie tej grupy substancji aktywnych inkorporowanych w SLN. Tworzone układy i tym samym receptury formułacji kosmetycznych, są stabilniejsze. Ponadto wykorzystane surowce wpisują się w koncepcję zielonej chemii (*green chemistry*), która zakłada projektowanie procesów chemicznych w sposób ograniczający zużycie i powstawanie substancji zagrażających środowisku naturalnemu [38]. Metoda jest także zgodna z filozofią minimalizmu kosmetycznego (*skin minimalism*), czyli z koncepcją pielęgnacji, która zakłada mniejszą liczbę stosowanych produktów kosmetycznych, a zarazem korzystanie z kosmetyków wysokiej jakości, zawierających zrównoważone składniki o zminimalizowanym negatywnym wpływie na środowisko naturalne.

Mgr inż. Małgorzata PAWŁOWSKA (ORCID: 0000-0002-9465-5475) w 2005 roku ukończyła studia wyższe na Uniwersytecie Przyrodniczym im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu. Doktorantka czwartego roku w Zakładzie Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Pracuje w firmie *Dottore cosmeceutici*, gdzie jest odpowiedzialna za wprowadzanie nowych produktów na rynek. Specjalność – substancje aktywne i ich zastosowanie w kosmetyce białej. Od 15 lat pracuje w branży kosmetyki profesjonalnej.

Dr Marta MARZEC (ORCID: 0000-0003-1482-8274) w roku 2015 uzyskała stopień magistra, a w 2019 r. stopień doktora na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Jest adiunktem badawczym w Zakładzie Chemii Stosowanej tej samej uczelni. Specjalność – preparatyka i badania fizykochemiczne produktów kosmetycznych z zakresu kosmetyki białej, nowoczesne substancje czynne w produktach kosmetycznych, badania aplikacyjno-aparaturowe kosmetyków, synteza nanocząstek lipidowych, z naciskiem na ich zastosowanie w chemii kosmetycznej.

Prof. dr hab. Izabela NOWAK (ORCID: 0000-0002-1113-9011) w roku 1997 uzyskała stopień doktora, a w 2008 r. stopień doktora habilitowanego na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Była stypendystką Fundacji Fulbrighta oraz Kościuszkowskiej. W 2014 r. otrzymała nominację profesorską. Od 2009 r. jest kierownikiem Zakładu Chemii Stosowanej na Wydziale Chemii UAM, a od 2019 r. pełni funkcję prezesa ZG PTChem. Specjalność – synteza i modyfikacja nowych uporządkowanych mezoporowatych materiałów, synteza wysokowartościowych i masowych chemikaliów zużyciem heterogenicznych katalizatorów, w tym z użyciem biomasy, nowatorskie metody analityczne w zakresie chemii kosmetycznej, farmaceutycznej i stosowanej, nowoczesne strategie preparatyki i badania kosmetyków oraz kosmetyków.

LITERATURA

- [1] Schagen K. S.: Topical Peptide Treatments with Effective Anti-Aging Results Enhanced Reader, *Cosmetics*, 2017, 4(16), 1–14.
- [2] Errante F., Ledwoń P., Latajka R., Rovero P., Papini A. M.: Cosmeceutical Peptides in the Framework of Sustainable Wellness Economy. *Front. Chem.*, 2020, 8(9), 1–8, doi:10.3389/fchem.2020.572923.
- [3] Resende D. I., Ferreira M. S., Sousa-Lobo J. M., Sousa E., Almeida I. F.: Usage of synthetic peptides in cosmetics for sensitive skin. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(8), 1–22, doi:10.3390/ph14080702.
- [4] Aguilar-Toalá J. E., Hernández-Mendoza A., González-Córdova A. F., Vallejo-Córdoba B., Liceaga A. M.: Potential role of natural bioactive peptides for development of cosmeceutical skin products. *Peptides*, 2019, 122(9), 1–13, doi:10.1016/j.peptides.2019.170170.
- [5] Ferreira M. S., Magalhães M. C., Sousa-Lobo J. M., Almeida I. F.: Trending Anti-Aging Peptides. *Cosmetics*, 2020, 7(21), 1–15, doi:10.3390/cosmetics7040091.
- [6] Cosmetic Ingredient Review: Safety Assessment of Palmitoyl Oligopeptides as Used in Cosmetics. 2012.
- [7] Komisja Europejska: Słownik wspólnych nazw składników do stosowania na etykietach produktów kosmetycznych. 2019.
- [8] Olejnik A., Nowak I., Schroeder G.: Peptydy jako nowe syntetyczne składniki preparatów kosmetycznych. *Receptory molekularne - właściwości i zastosowanie*, 2009, 105–122.
- [9] Fields K., Falla T. J., Rodan K., Bush L.: Bioactive peptides: Signaling the future. *J. Cosmet. Dermatol.*, 2009, 8(1), 8–13, doi:10.1111/j.1473-2165.2009.00416.x.
- [10] Anil L., Kannan K.: Microemulsion as drug delivery system for peptides and proteins. *J. Pharm. Sci. Res.*, 2018, 10(1), 16–25.
- [11] Murray R. K., Grammer D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: *Biochemia Harpera*. 1995.
- [12] McMurry J.: *Chemia organiczna*. PWN, 2017.
- [13] Janiszewska J.: Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe w zastosowaniach biomedycznych. *Polimery*, 2014, 59, 10.
- [14] Limbert G. i in.: Biotribology of the ageing skin—Why we should care. *Biotribology*, 2019, 17(12/2018), 75–90, doi:10.1016/j.biotri.2019.03.001.
- [15] Lima T. N., Aparecida C., Moraes P.: Bioactive Peptides: Applications and Relevance for Cosmeceuticals. *Cosmetics*, 2018, 5(21), 1–9, doi:10.3390/cosmetics5010021.
- [16] Gorouhi F., Maibach H. I.: Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2008, 31, 327–345, doi:10.1111/j.1468-2494.2009.00490.x.
- [17] Kim B. i in.: Transdermal delivery systems in cosmetics. *Biomed. Dermatology*, 2020, 4(1), 1–12, doi:10.1186/s41702-020-0058-7.
- [18] Musielak E., Feliczak-Guzik A., Nowak I.: Synthesis and Potential Applications of Lipid Nanoparticles in Medicine. *Materials (Basel)*, 2022, 15(682), doi:10.3390/ma15020682.
- [19] Fangueiro J. F., Andreani T., Egea M. A., Garcia M. L., Souto S. B., Souto E. B.: Experimental factorial design applied to mucoadhesive lipid nanoparticles via multiple emulsion process. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2012, 100, 84–89, doi:10.1016/j.colsurfb.2012.04.014.
- [20] Almeida A. J., Souto E.: Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2007, 59(6), 478–490, doi:10.1016/j.addr.2007.04.007.
- [21] Almeida A. J., Runge S., Müller R. H.: Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of production parameters. *Int. J. Pharm.*, 1997, 149(2), 255–265, doi:10.1016/S0378-5173(97)04885-0.
- [22] Müller R. H., Runge S. A., Ravelli V., Thünemann A. F., Mehnert W., Souto E. B.: Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®): Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2008, 68(3), 535–544, doi:10.1016/j.ejpb.2007.07.006.
- [23] Hu F. Q., Hong Y., Yuan H.: Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *Int. J. Pharm.*, 2004, 273(1–2), 29–35, doi:10.1016/j.ijpharm.2003.12.016.
- [24] Lasoń E., Ogonowski J.: Stałe Nanocząsteczki Lipidowe – charakterystyka, zastosowanie i otrzymywanie. *Chemia*, 2011, 65(10), 960–967.
- [25] Saupé T., Rades A.: *Nanocarrier Technologies*. Springer, 2006.
- [26] Ugazio E., Cavalli R., Gasco M. R.: Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.*, 2002, 241(2), 341–344, doi:10.1016/S0378-5173(02)00268-5.
- [27] Zhang N., Ping Q., Huang G., Xu W., Cheng Y., Han X.: Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. *Int. J. Pharm.*, 2006, 327(1–2), 153–159, doi:10.1016/j.ijpharm.2006.07.026.
- [28] Olbrich C., Bakowsky U., Lehr C. M., Müller R. H., Kneuer C.: Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *J. Control. Release*, 2001, 77(3), 345–355, doi:10.1016/S0168-3659(01)00506-5.
- [29] Kakadia P. G., Conway B. R.: Lipid nanoparticles for dermal drug delivery. *Am. J. Pharmacol. Sci.*, 2014, 2, 1–21.
- [30] Penkler V. R. L., Müller R. H., Runge S. A.: Pharmaceutical cyclosporin formulation with improved biopharmaceutical properties, improved, 2011.
- [31] Müller R. H., Ravelli V.: Pharmaceutical cyclosporin formulation with improved biopharmaceutical properties, improved physical quality and greater stability, and method for producing said formulation. *Dtsch. Patentanmeldung*, 1998, 19, 273.
- [32] Molet-Rodriguez L., Martín-Belloso A., Salvia-Trujillo O.: Formation and Stabilization of W1/O/W2 Emulsions with Gelled Lipid Phases. *Molecules*, 2021, 26(312), 15, doi.org/10.3390/molecules26020313.
- [33] Trotta M., Cavalli R., Carlotti M. E., Battaglia L., Debernardi F.: Solid lipid micro-particles carrying insulin formed by solvent-in-water emulsion-diffusion technique. *Int. J. Pharm.*, 2005, 288(2), 281–288, doi:10.1016/j.ijpharm.2004.10.014.
- [34] García-Fuentes M., Torres D., Alonso M. J.: New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin. *Int. J. Pharm.*, 2005, 296(1–2), 122–132, doi:10.1016/j.ijpharm.2004.12.030.
- [35] García-Fuentes M., Prego C., Torres D., Alonso M. J.: A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2005, 25(1), 133–143, doi:10.1016/j.ejps.2005.02.008.
- [36] Reithmeier H., Herrmann J., Göpferich A.: Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostatin. *Int. J. Pharm.*, 2001, 218(1–2), 133–143, doi:10.1016/S0378-5173(01)00620-2.
- [37] Ghasemiyeh P., Mohammadi-Samani S.: Potential of nanoparticles as permeation enhancers and targeted delivery options for skin: Advantages and disadvantages. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2020, 14, 3271–3289, doi:10.2147/DDDT.S264648.
- [38] Burczyk B., *Zielona chemia. Zarys*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, 2014.



Article

Solid Lipid Nanoparticles Incorporated with Retinol and Pentapeptide-18—Optimization, Characterization, and Cosmetic Application

Małgorzata Pawłowska^{1,2}, Marta Marzec^{1,*}, Waldemar Jankowiak² and Izabela Nowak^{1,*}¹ Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Poznań, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland; malgorzata.pawlowska@amu.edu.pl² Dottore Polska Sp. z o.o., Margonińska 22, 60-425 Poznań, Poland; klinika@kec.pl

* Correspondence: marta.marzec@amu.edu.pl (M.M.); nowakiza@amu.edu.pl (I.N.); Tel.: +48-618-291580 (I.N.)

Abstract: Solid lipid nanoparticles (SLNs) incorporated with retinol and oligopeptide can have a full spectrum of effects on the skin as a compatible combination of ingredients with broad anti-aging properties. The research's main objective was to ensure the stability of lipid nanocarriers containing retinol and peptide due to the planned use of this dispersion as a cosmetic raw material. To confirm the effectiveness of method optimization (high shear homogenization, HSH) and proper selection of substrates, SLN dispersions were obtained in three combinations: 1—non-incorporated SLNs; 2—SLNs containing only retinol; 3—SLNs containing retinol and pentapeptide-18; these were then stored at different temperatures (4, 25, 45 °C) for 4 weeks. The desired values of the physicochemical parameters of the optimized dispersion of lipid nanoparticles incorporated with retinol and oligopeptide over the required storage period were confirmed: mean particle size ($Z\text{-}Ave$) = 134.7 ± 0.3 nm; polydispersity index (PDI) = 0.269 ± 0.017 [–]; zeta potential (ZP) = 42.7 ± 1.2 mV (after 4 weeks at 25 °C). The results confirmed the proper selection of the SLN production method and the effectiveness of the optimization performed. The possibility of using the obtained raw material as an ingredient in cosmetic products with anti-aging properties was indicated.



Citation: Pawłowska, M.; Marzec, M.; Jankowiak, W.; Nowak, I. Solid Lipid Nanoparticles Incorporated with Retinol and Pentapeptide-18—Optimization, Characterization, and Cosmetic Application. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 10078. <https://doi.org/10.3390/ijms251810078>

Academic Editor: Agnieszka Ewa Wiącek

Received: 27 August 2024

Revised: 16 September 2024

Accepted: 17 September 2024

Published: 19 September 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: solid lipid nanoparticles; retinol; oligopeptide; high shear homogenization; optimization; stability

1. Introduction

Systems for the delivery of active substances to the skin are a subject under constant development and improvement processes. Numerous studies carried out in the pharmaceutical and cosmetic industries have contributed to significant advances in the formulation of pharmaceutical and cosmetic products containing encapsulated bioactive substances. However, the physiology and characteristic structure of the skin, which acts as a natural barrier against the external environment, still limit the effectiveness of therapeutics and skin care, causing difficulties in the penetration and absorption of active substances [1]. In the process of overcoming the epidermal barrier and facilitating the penetration of active substances, different types of mechanisms are involved, such as intercellular diffusion, active transport, and carrier-mediated transport [2–4]. The transport of bioactive substances can take place through three routes: through the structures of the epidermis, through the outlets of sweat glands, and through hair follicles and sebaceous glands [5]. The effectiveness of the last three ways is less significant due to the small total area that these structures occupy on the skin's surface (0.1%) [3]. However, in the case of large polar molecules and ionic compounds, which have difficulty penetrating the epidermal layers, these routes play an important role [3]. The route through the appendages of the skin can be used to transport active substances with the participation of appropriately selected lipid carriers, such as solid lipid nanoparticles (SLNs).

In the case of retinol, transport using skin appendages is the primary route of penetration into the deeper layers of the skin [6]. Vitamin A is the first vitamin approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) as an anti-aging agent that affects the appearance and condition of the skin and exhibits anti-aging activity [7]. Retinoids are an attractive group of compounds with a broad spectrum of effects on the skin. They regulate numerous physiological processes, such as epidermal cell growth, the differentiation of the keratinocytes, and sebaceous gland function. In addition, they exhibit brightening properties, contributing to the proper distribution of melanocytes within the epidermis, and most importantly, they affect the synthesis of collagen and elastin, so they have anti-aging and anti-wrinkle effects on the skin [8,9]. Retinol, as a fat-soluble substance, can penetrate through the epidermis and, to a small extent, into the dermis. For effective operation, it is important to increase its penetration rate [7]. The incorporation of retinoids into the SLN significantly influences the controlled and prolonged release of the substance in the skin and achieves a high penetration rate [8]. Ferreira et al. [6] also point to this process minimizing the side effects of retinoids (in an encapsulated form) including erythema reaction due to irritation or the degree of epidermal desquamation.

On the other hand, peptides—compounds of hydrophilic nature—do not exhibit the possibility of passive absorption through the skin [2]; hence, the availability of delivery methods for peptide compounds is quite limited and constantly a topic of scientific interest. The history of the use of peptides in skin care dates back to the 1980s [10], but there was a particular surge of interest in these compounds at the beginning of the 21st century when the activity of peptides and their involvement in numerous skin processes were recognized [11]. The safety of the substances has been confirmed by the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) [12] and the FDA in its Cosmetic Ingredient Review (CIR). Peptides, as bioactive compounds, have a multidirectional effect on skin conditions. They exhibit anti-wrinkle and anti-aging effects by inhibiting the enzymatic activities of hyaluronidase, collagenase, and elastase. In addition, they regulate the activity of tyrosinase responsible for the formation of hyperpigmentation [13,14]. Currently, special attention is paid to peptide compounds of higher molecular mass [2]. The use of solid lipid nanoparticles as transdermal carriers for peptide compounds provides them with protection from enzymatic degradation, increases the bioavailability of this active substance, and reduces the likelihood of side effects [15].

Pentapeptide-18 (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu) belongs to the group of neurotransmitter peptides. This neuropeptide is associated with the SNAP-25 receptor protein (Synaptosome-Associated Protein, 25 kDa), which is involved in the release of acetylcholine and the formation of the SNARE (SNAP receptors—Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor) complex. Acetylcholine, responsible for causing muscle contractions and the formation of facial wrinkles, may negatively affect the condition of the skin. Pentapeptide-18 affects receptors at neuromuscular synapses acting like enkephalins. By binding to the receptors of enkephalins, it closes calcium channels and reduces the release of acetylcholine. Clinical studies have unequivocally confirmed the anti-aging and anti-wrinkle effects of the said oligopeptide on skin [16,17].

The use of SLN is a promising way to deliver active ingredients in a cosmetic product due to several advantages that they show over traditional methods [18]: (i) the protection of the incorporated active ingredients (e.g., retinol) from chemical degradation [19]; (ii) the possibility of the controlled and prolonged release of the active ingredient [5,20]; (iii) increasing the stability of the introduced bioactive substances [20]; (iv) the increased absorption of substances across the epidermal barrier and improved depth of penetration through the skin [5]; (v) the occlusive properties of the lipid carriers themselves, which result in reduced transepidermal water loss (TEWL) and have a beneficial effect on skin hydration levels [5,19]. The lack of toxicity and biodegradability of solid lipid nanoparticles are perfectly in line with the trend of sustainable cosmetics and green chemistry. In addition, due to its efficiency, the carrier-based method allows for the use of fewer active ingredients while maintaining effective therapeutic effects.

The purpose of the presented research was to develop a method for obtaining solid lipid nanoparticles containing retinol and an oligopeptide (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu). A detailed optimization of the qualitative composition of lipid nanoparticle dispersions was performed, taking into account, among other things, the type of solid lipid, the surfactant, and the presence of liquid lipid in the lipid matrix. The stability of the obtained SLNs was a basic assumption for the optimization of the method since the designed dispersion was ultimately one of the key components of the cosmetic formulation. Moreover, the additive effect of the oligopeptide and retinol (contained in the cosmetic product formulation) created the possibility of providing effective anti-aging therapy in line with the trend of skin minimalism.

2. Results and Discussion

2.1. Optimization of the Qualitative Composition of Lipid Nanoparticle Dispersions

2.1.1. Lipid Screening—Selection of the Solid Lipid

Lipids, as non-polar compounds, are components of lipid nanoparticle dispersions at levels of 0.1–30.0 wt.% [21]. Moreover, lipids such as mono-, di- or triglycerides of medium- or long-chain fatty acids are, in fact, components of most available emulsion-like cosmetic formulations [22]. The selection of a solid lipid began with a choice of four lipid compounds most commonly used in the formulation of cosmetic products, namely mono- (glyceryl monostearate—Imwitor[®] 900 K) and diglycerides (glyceryl dibehenate—Compritol[®] 888 ATO, glyceryl distearate—Precirol[®] ATO 5) of long-chain fatty acids and mixtures thereof (Witepsol[®] H15). The selected solid lipid had to be compatible with the incorporated lipophilic active compounds—in this case, retinol—since it is the properly formed lipid matrix that is crucial for the stability of solid lipid nanoparticles [23]. What is more, the solid lipids selected for optimization were safe and commonly used lipid compounds, which, at the same time, ensured production continuity for further commercial implementation. In the course of the experiment conducted on the selection of the solid lipid, Witepsol[®] H15 and Precirol[®] ATO 5 were excluded from further testing after the first hour of observation following the solidification of the system (Table 1). These two lipids showed incompatibility with retinol after a preliminary organoleptic evaluation—the resulting mixtures were heterogeneous with irregularities on the surface of the system, which was interpreted as the immiscibility of retinol with the above-mentioned two solid lipids. After an assumed time of 72 h, the quality and compatibility of the remaining systems were evaluated. Two solid lipids, Imwitor[®] 900 K and Compritol[®] 888 ATO, were qualified for further optimization of the composition of solid lipid nanoparticles.

Table 1. Results of lipid screening—observation of homogeneity of mixtures (solid lipids combined with retinol) over time.

Solid Lipid	Solubility					
	0 min	15 min	30 min	1 h	24 h	72 h
Compritol [®] 888 ATO	+	+	+	+	+	+
Imwitor [®] 900 K	+	+	+	+	+	+
Precirol [®] ATO 5	–	–	–	–	–	–
Witepsol [®] H15	+	+/-	+/-	+/-	–	–

"+" soluble; "–" insoluble.

The selected lipids Imwitor[®] 900 K (1.0 wt.%) and Compritol[®] 888 ATO (1.0 wt.%) were used to produce lipid nanoparticle dispersions. Physicochemical parameters were determined for the SLN samples, differing in the type of solid lipid used. The test was carried out on the day that the dispersion was obtained (D0). Due to the unsatisfactory parameters of the sample containing Compritol[®] ($Z\text{-Ave} = 560.2 \pm 7.4$ nm; $PDI = 0.563 \pm 0.040$; $ZP = 45.7$ mV ± 0.4), testing after 14 days (D14) was repeated for the formulation containing Imwitor[®] only. The purpose of the retest was to confirm the validity of the choice of

solid lipid. The dispersion in which Imwitor[®] was used in the formulation was characterized by the following values for the determined parameters: Z-Ave = 207.4 ± 1.1 nm; PDI = 0.446 ± 0.015; ZP = 39.7 ± 0.2 mV (on day 0). The test repeated on day 14 indicated a decrease in the values of individual parameters as follows: by 16% for Z-Ave = 174.4 ± 0.8 nm; by 17% for PDI = 0.369 ± 0.026; and by 3% if ZP = 38.7 ± 0.3 mV was considered.

For the SLN samples whose matrixes were based on Imwitor[®], the most favorable results were observed, given the assumption made regarding the expected size of the lipid structures tested (Z-Ave < 300 nm). This lipid was selected as a solid lipid suitable for the formation of the lipid matrixes of SLNs. The stability of the optimized nanoparticles was confirmed by test results after 14 days of storage at 25 °C. According to Almeida [15], the selection of a suitable solid lipid in the lipid matrix can affect the release efficiency of the active substance, especially protein substances, which are in the research area of this paper. The presented comparison of the results obtained for samples based on Compritol[®] and Imwitor[®] indicated that more favorable effects of delivering the active compound deep into the skin using lipid nanoparticles would be obtained by just using glyceryl monostearate. Thus, monoglycerides have been identified as more useful in terms of epidermal use. These observations corresponded with the results obtained by Abdelbar's team, who also based their study on LNs containing Imwitor[®], Compritol[®] and Witepsol[®]—analogous sizes of the resulting carrier structures were noted [24]. Satisfactory results for SLN production using glyceryl monostearate were also generated by Prof. Müller's research group, which confirmed the effectiveness of the synthesis of SLNs occurring within the limits of 60 °C [25]. Moreover, the reason for this can be attributed to the fact that Imwitor[®] 900 K has a lower melting point [15], which will translate into the compatibility of the obtained dispersion in terms of cosmetic/skin surface application. It should also be said that despite Compritol[®]'s compatibility with retinol, this solid lipid was rejected due to its too high melting point, which may affect retinol's stability [26]. Nevertheless, it should be taken into account that the nature of the lipid matrix also depends on the amounts and types of lipids and supporting emulsifiers selected [27].

2.1.2. Addition of Phosphatidylcholine as a Stabilizing Agent

The parameters obtained for the dispersion containing no phosphatidylcholine were compared with those of the sample containing this substance (0.25 wt.%) and the solid lipid Imwitor[®] 900 K. The comparison was carried out due to the analogous composition and the identical production method. The only element differentiating the compared formulations was the presence or absence of the aforementioned raw material (Figure 1). Testing of the physicochemical parameters was carried out on the day that the sample was made (D0) and after 14 days of storage (D14).

For the sample containing no phosphatidylcholine, the following values of physicochemical parameters (D0) were obtained: Z-Ave = 232.9 ± 2.8 nm; PDI = 0.309 ± 0.016 [–]; ZP = 43.3 ± 0.2 mV. After 14 days, there was a noticeable increase in the values of the studied parameters to the following: Z-Ave = 326.9 ± 7.4 nm (+40%); PDI = 0.634 ± 0.087 [–] (+105%); ZP = 35.7 ± 0.1 mV (+6%). It was noted that for the dispersion containing phosphatidylcholine, much more satisfactory parameter values were obtained compared to the results observed for formulations without this raw material. Moreover, a stabilization of the values of the determined parameters of the dispersion over time could be observed for the sample in which phosphatidylcholine was included. Similar observations were reported in the Molet-Rodriguez study—the increased stability of W/O/W emulsions was noted when lecithin was used in their formulation [28]. In contrast, in the case of a sample without phosphatidylcholine, a significant increase in the values of individual parameters and a decrease in the quality of the dispersion over time were noticeable. Despite comparable initial parameters, the measurement made after 14 days verified the necessity of using phosphatidylcholine in an amount of 0.25 wt.% in the final formulation. Phosphatidylcholine, acting as a stabilizing agent, does not exhibit irritant properties, which is important for the use of optimized dispersion in cosmetic formulation [29]. It excels

in processes where lower temperatures are required to protect the thermal degradation of the incorporated biologically active compound [30]. Therefore, Vanić [31] believes that the presence of phospholipids (in this case, phosphatidylcholine) in the matrix of a lipid nanoparticle enhances its ability to penetrate, and thus it can help to improve the activity of the incorporated active ingredient.

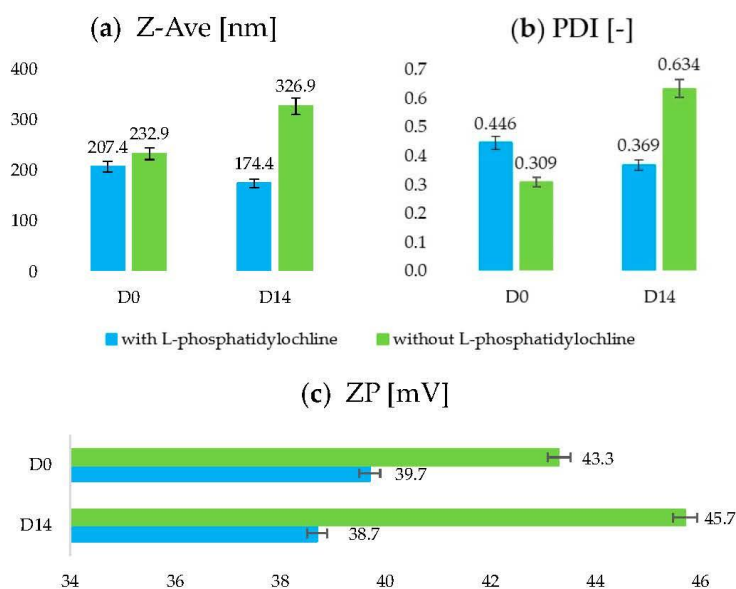


Figure 1. Comparison of physicochemical parameters: Z-Ave (a), PDI (b), and ZP (c) of dispersions of lipid nanoparticles containing and not containing phosphatidylcholine; the pHs of the solutions were within the range 5.33–5.47.

2.1.3. Selection of the Surfactant System

To select the appropriate surfactant system, five samples of lipid nanoparticle dispersions were made, and their physicochemical parameters were determined on the day of production of the dispersion (D0) and after 14 days of storage at room temperature (D14). The obtained results are presented in Table 2.

When analyzing the results obtained in D0, it was noted that in samples 1–4 (containing CTAB), the Z-Ave parameter, reflecting the particle size of the dispersion, obtained satisfactory values < 300 nm. In contrast, the value of the mean particle size determined for sample No. 5 significantly exceeded the desired size range. On this basis, the variant of the dispersion not containing CTAB was not repeated anymore, but the substance was left in the final dispersion formulation at 0.5 wt.%. When considering PDI, it was noted that for samples No. 2 (containing Tween[®] 80 and CTAB) and No. 3 (with Lutrol[®] F68, sodium cholate, and CTAB), PDI was significantly higher than in the other samples. Elevated PDI values were noted in both D0 and D14. The most promising, considering the analysis of physicochemical parameters, were sample No. 1, containing Tween[®] 80, sodium cholate, and CTAB, and sample No. 4, with Lutrol[®] F68 and CTAB present in the formulation. The results obtained at D0 were analyzed and then compared with those determined at D14. For both samples, the Z-Ave value remained similar (comparing measurements from D0 and D14), and any difference was within the statistical error. A more significant change was observed in the PDI values—sample 1 showed a 25% decrease in the PDI value from the baseline, while for sample 4, the polydispersity index value remained at a similar

level. The zeta potential results for all samples, both at D0 and at D14, remained at the desired level of $>|\pm 30\text{ mV}|$. At values higher than $|\pm 30\text{ mV}|$, the system was considered physically stable [32]. According to Dabrowska et al. [33], high and positive zeta potential values were influenced by the presence of the surfactant CTAB and its cationic nature. The negatively charged skin surface and positively charged lipid nanoparticles can interact electrostatically with each other and affect the increased permeation of active ingredients through the different layers of the epidermis [34].

Table 2. The optimization of the surfactant system—the changes in the physicochemical parameters (Z-Ave, PDI, ZP) of the tested dispersions of lipid nanoparticles over time (data are expressed as mean \pm standard deviation).

	Surfactant System	Results	D0	D14
1.	Tween [®] 80	Z-Ave [nm]	165.1 \pm 0.5	173.9 \pm 0.9
	sodium cholate	PDI [–]	0.379 \pm 0.001	0.286 \pm 0.002
	CTAB	ZP ¹ [mV]	42.3 \pm 1.3	42.7 \pm 0.4
2.	Tween [®] 80	Z-Ave [nm]	200.0 \pm 0.7	185.7 \pm 1.5
	–	PDI [–]	0.403 \pm 0.004	0.417 \pm 0.013
	CTAB	ZP ¹ [mV]	45.6 \pm 0.2	43.9 \pm 2.3
3.	Lutrol [®] F68	Z-Ave [nm]	203.5 \pm 2.4	475.8 \pm 19.8
	sodium cholate	PDI [–]	0.456 \pm 0.012	0.489 \pm 0.042
	CTAB	ZP ¹ [mV]	43.6 \pm 1.1	39.6 \pm 5.2
4.	Lutrol [®] F68	Z-Ave [nm]	192.1 \pm 0.4	180.9 \pm 0.5
	–	PDI [–]	0.396 \pm 0.005	0.374 \pm 0.019
	CTAB	ZP ¹ [mV]	39.7 \pm 0.4	38.1 \pm 0.7
5.	Lutrol [®] F68	Z-Ave [nm]	5618.0 \pm 33.0	–
	sodium cholate	PDI [–]	0.380 \pm 0.022	–
	–	ZP ¹ [mV]	–	–

¹ The pHs of the solutions are within the range 5.01–5.47.

Based on the analysis of the results additionally correlated with the available literature, the optimal surfactant system was selected: Tween[®] 80 (1.5 wt.%) and sodium cholate (0.1 wt.%). The necessity of using CTAB (0.5 wt.%) as a component of the lipid phase of the optimized dispersion was also confirmed.

Regarding the optimization discussed, the final composition and methodology for obtaining solid lipid nanoparticles incorporated with retinol and pentapeptide were established. As a result of the numerous trials and verification of physicochemical parameters, Imwitor[®] 900 K was included as a solid lipid in the composition of the SLN dispersion (based on the lipid screening performed). Subsequently, it was decided that L-phosphatidylcholine should be added due to the need to ensure the sufficient stability of the designed dispersion. As a last step, the surfactant system was verified—the one composed of CTAB, Tween[®] 80 and sodium cholate was selected. The final step was the addition of active substances to the dispersion—pentapeptide and retinol—in amounts that complied with current regulations for the cosmetics industry. The qualitative–quantitative composition of the SLN dispersion thus established the starting point for its use as a component of selected cosmetic products.

2.2. Assessment of Encapsulation Efficiency and Loading Capacity of Retinol and Oligopeptide

Encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (LC) are key parameters for the physicochemical characterization of lipid nanoparticles, usually determined by spectrophotometric or chromatographic methods. EE is defined as the amount of active compound that has been incorporated into lipid nanoparticles, relative to the real amount of active substance used during the production of lipid nanocarriers. LC, on the other hand, expresses the ratio of the amount of the loaded active ingredient to the total weight of the

nanoparticle's lipid components, through which it may indirectly characterize the matching of the lipid system used with the active substance [35]. The value of EE and LC is directly proportional to the lipophilicity of the incorporated raw material—for lipophilic substances, EE is usually in the 90–98% range, while hydrophilic compounds tend to reach relatively lower values due to their weak affinity for the lipid matrix [36]. Since LC determines the percentage of the active substance that can be bound to the lipid phase, this parameter for water-soluble substances will also assume lower values compared to LC values determined for lipid-soluble ingredients.

The encapsulation efficiency of retinol ($91.9 \pm 0.3\%$), as well as the loading capacity ($52.5 \pm 0.1\%$) determined for that compound, were definitely within the expected ranges of values typical for compounds of lipophilic nature. The high affinity of retinol to the lipid structures of the obtained carriers greatly facilitated the incorporation of this compound into their matrix. It is also worth noting that the high LC value of more than 50% directly confirmed the correct selection of the quantitative ratio of retinol relative to the components of the lipid matrix of the nanoparticles. These results can be considered satisfactory, especially when comparing them with the works of other authors on the production of retinol-containing lipid nanocarriers. For example, Boskabadi and co-workers [37] reported much lower EE values—at a maximum of 66%—by encapsulating retinol into SLNs using the ultrasound technique. For the second active ingredient—pentapeptide-18—the following results were indicated: EE ($75.7 \pm 0.4\%$) and LC ($21.6 \pm 0.1\%$) significantly exceeded the values usually obtained for water-soluble compounds, which could be related to the method used to produce solid lipid nanoparticles based on W/O/W multiple emulsion. It should be mentioned that in this method, the active substances are incorporated into the internal aqueous phase, which highly reduces their undesirable penetration into the outer aqueous phase of the surfactant, which in turn could adversely affect the level of encapsulation efficiency. The EE and LC values (determined for the tested active substances) confirmed the usefulness of the high shear homogenization based on multiple emulsions for the efficient incorporation of cosmetic raw materials of both a hydrophilic and hydrophobic nature in the case of the described study of retinol and pentapeptide-18.

2.3. Evaluation of Stability

The evaluation of the stability of lipid nanoparticle dispersions was necessary because the dispersion would eventually become one of the components of the cosmetic formulation. The choice of elevated temperature conditions ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$) was related to the aging tests of the cosmetic product, which were carried out in the following stages of this study [33]. The results obtained for the analyzed dispersions are shown in Table 3.

Table 3. The changes in the values of the mean particle size (Z-Ave), the polydispersity index (PDI), and the zeta potential (ZP) of the lipid nanoparticle dispersions (B—blank; R—retinol; P+R—oligopeptide and retinol) stored under different temperature conditions ($4, 25, 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) for 28 days (data are expressed as mean \pm standard deviation).

		Temperature	D0	D7	D14	D21	D28
1. (B) blank	Z-Ave [nm]	$4\text{ }^{\circ}\text{C}$		173.5 ± 0.9	183.5 ± 0.4	206.3 ± 0.5	172.3 ± 1.1
		$25\text{ }^{\circ}\text{C}$	165.1 ± 1.1	165.9 ± 0.4	204.5 ± 1.2	177.8 ± 0.5	253.1 ± 9.8
		$45\text{ }^{\circ}\text{C}$		147.8 ± 0.8	600.8 ± 12.3	667.4 ± 9.8	731.6 ± 7.4
	PDI [–]	$4\text{ }^{\circ}\text{C}$		0.276 ± 0.008	0.319 ± 0.023	0.419 ± 0.02	0.344 ± 0.007
		$25\text{ }^{\circ}\text{C}$	0.379 ± 0.007	0.255 ± 0.006	0.386 ± 0.032	0.334 ± 0.008	0.439 ± 0.013
		$45\text{ }^{\circ}\text{C}$		0.498 ± 0.039	0.422 ± 0.027	0.384 ± 0.023	0.427 ± 0.022
	ZP ¹ [mV]	$4\text{ }^{\circ}\text{C}$		43.0 ± 1.1	40.3 ± 0.4	39.5 ± 0.9	38.6 ± 0.4
		$25\text{ }^{\circ}\text{C}$	42.7 ± 0.9	41.1 ± 0.9	42.3 ± 0.8	42.7 ± 0.8	33.1 ± 0.3
		$45\text{ }^{\circ}\text{C}$		41.0 ± 0.6	45.0 ± 0.3	43.5 ± 0.5	44.6 ± 1.3

Table 3. Cont.

		Temperature	D0	D7	D14	D21	D28
2. (R) retinol	Z-Ave [nm]	4 °C		163.9 ± 0.4	268.4 ± 0.5	224.8 ± 5.4	429.4 ± 12.3
		25 °C	164.0 ± 0.5	164.5 ± 1.1	202.1 ± 1.2	168.6 ± 0.3	157.9 ± 1.6
		45 °C		111.3 ± 1.4	213.4 ± 4.4	128.0 ± 0.23	216.7 ± 6.4
	PDI [–]	4 °C		0.311 ± 0.018	0.566 ± 0.022	0.341 ± 0.011	0.485 ± 0.036
		25 °C	0.287 ± 0.008	0.292 ± 0.008	0.358 ± 0.011	0.364 ± 0.015	0.327 ± 0.020
		45 °C		0.365 ± 0.005	0.515 ± 0.014	0.436 ± 0.012	0.626 ± 0.017
	ZP ¹ [mV]	4 °C		37.6 ± 0.7	44.5 ± 0.1	38.1 ± 0.8	39.9 ± 0.4
		25 °C	43.6 ± 1.4	42.1 ± 1.2	42.6 ± 0.3	39.6 ± 1.3	53.5 ± 5.2
		45 °C		41.1 ± 0.3	43.1 ± 0.4	35.6 ± 1.1	45.5 ± 0.4
3. (P+R) oligopeptide retinol	Z-Ave [nm]	4 °C		242.3 ± 7.2	228.3 ± 1.4	259.3 ± 8.7	248.3 ± 7.4
		25 °C	156.5 ± 0.8	148.2 ± 0.8	151.8 ± 0.7	157.4 ± 1.8	134.7 ± 0.3
		45 °C		117.7 ± 0.9	107.2 ± 0.4	158.5 ± 2.9	231.1 ± 1.4
	PDI [–]	4 °C		0.438 ± 0.009	0.489 ± 0.019	0.491 ± 0.022	0.445 ± 0.022
		25 °C	0.284 ± 0.002	0.269 ± 0.006	0.261 ± 0.002	0.320 ± 0.034	0.269 ± 0.017
		45 °C		0.366 ± 0.003	0.272 ± 0.004	0.463 ± 0.007	0.464 ± 0.006
	ZP ¹ [mV]	4 °C		40.9 ± 0.4	43.3 ± 0.5	44.5 ± 0.6	43.8 ± 0.3
		25 °C	45.6 ± 0.2	44.7 ± 0.7	45.8 ± 0.3	44.0 ± 1.9	42.7 ± 1.2
		45 °C		38.1 ± 2.1	45.1 ± 0.2	37.2 ± 0.9	44.5 ± 1.6

¹ The pHs of the solutions within the range 4.37–5.47.

It was concluded that the most favorable results of physicochemical parameters (in terms of Z-Ave and PDI) were obtained for sample 3, in which oligopeptide and retinol were present. In addition, it was noted that regardless of the presence of active substances, the samples retained the best parameters at 25 °C. Analysis of the data for individual samples stored for 28 days at different temperatures yielded the following observations:

- I The changes in the value of the mean particle size of the dispersion depended on the presence of the active substances. For non-incorporated lipid nanoparticles (B), over the assumed 28 days, the Z-Ave value increased depending on the storage temperature by 4% at 4 °C, by 35% at 25 °C and by 77% at 45 °C ($p < 0.05$) (Figure 2a). The retinol-loaded SLNs (R) recorded Z-Ave values 62% (4 °C) and 24% (45 °C) higher ($p < 0.05$) compared to the results obtained at D0 and D28. On the other hand, at 25 °C, there was a 4% decrease in the value from 164.0 ± 0.5 to 157.9 ± 1.6 nm (Figure 2b). For sample 3 (P+R) enriched with two active substances, the following values of Z-Ave at day 28 were obtained: 248.3 ± 7.4 nm (+37%), 134.7 ± 0.3 nm (–16%) and 231.1 ± 1.4 nm (+32%) for storage temperatures of 4, 25 and 45 °C, respectively ($p < 0.05$) (Figure 2c). Significantly, despite the noticeable changes in Z-Ave values for dispersion 3, regardless of storage conditions, the value of 300 nm indicative of stable dispersion in this case was not exceeded [38].
- II In the case of the polydispersity index (PDI), an increase in the value of this parameter was noted over time and under different storage conditions of the samples. The most noticeable changes in PDI values were noted for samples 1 (B) and 2 (R) stored at 45 °C for 28 days, changing by +35% and +54%, respectively ($p < 0.05$) (Figure 2a,b). Sample 3 (P+R) showed 36% and 39% increases in PDI at 4 °C and 45 °C, respectively ($p < 0.05$). The exception was sample 3, stored at 25 °C, for which the polydispersity index value decreased slightly (by 6%) from 0.284 ± 0.002 [–] (D0) to 0.269 ± 0.017 [–] (D28, $p < 0.05$) (Figure 2c). The PDI value for this sample did not exceed the value of 0.3 [–], considered in this study to be a value representing a stable dispersion [38].
- III There were no statistically significant changes in the zeta potential values of the samples tested. There was also no correlation between the presence or absence of bioactive substances and variable storage conditions and the ZP results. In all

three cases (B, R, P+R), the values were above the desired value of +30 mV, both at D0 and D28. After 28 days of stability testing, the parameters of sample 1 (B) stored at the three assumed temperatures were in the range 38.6 ± 0.4 – 44.6 ± 1.3 mV. The zeta potential values for sample 2 (R) were 39.9 ± 0.4 mV, 53.5 ± 5.2 mV, and 45.5 ± 0.4 mV (D28) for temperatures of 4, 25, and 45 °C, respectively. In contrast, the ZP results for sample 3 (P+R) oscillated between 42.7 ± 1.2 and 44.5 ± 1.6 mV (D28). It was shown that the incorporation of active substances (oligopeptide and retinol) did not affect the ZP values determined for the samples of lipid nanoparticle dispersions. The cationic surfactant (CTAB), present in the composition of the dispersion, was primarily responsible for the positive zeta potential value [39].

- IV A comparison of the tested samples (B, R, P+R) containing different systems of encapsulated active substances indicated that the presence of these compounds influenced smaller variations in the values of parameters related to dispersion stability. This was, for example, evident by comparing the Z-Ave results obtained for samples stored at 25 °C, where sample 1(B) showed a 35% increase in mean particle size, while sample 2 (R) achieved an increase of 4%, and sample 3 (P+R) showed a 16% decrease in Z-Ave.

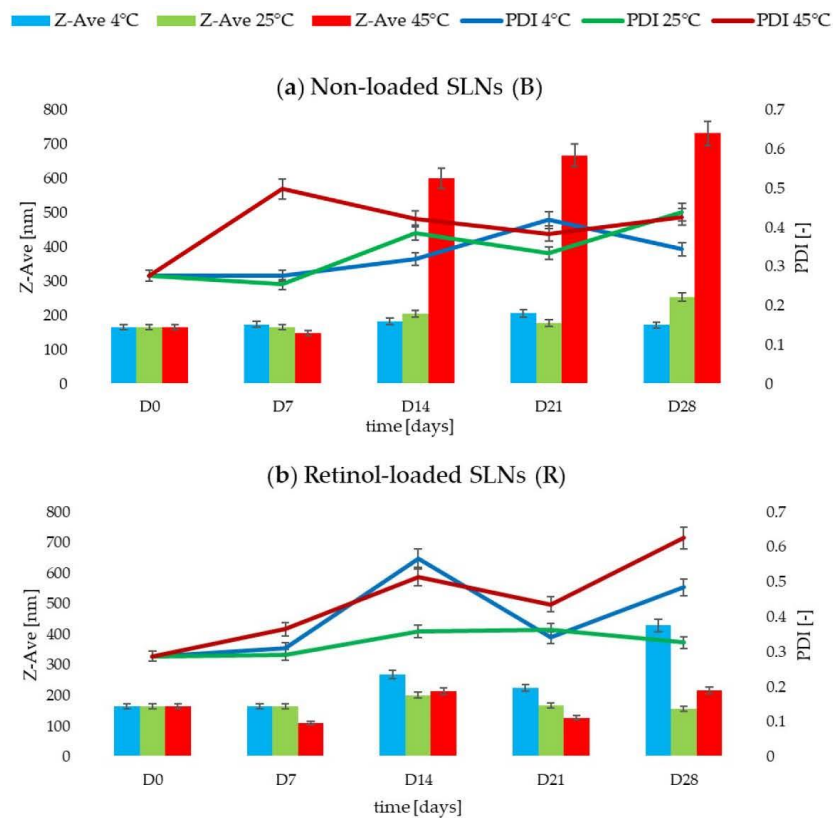


Figure 2. Cont.

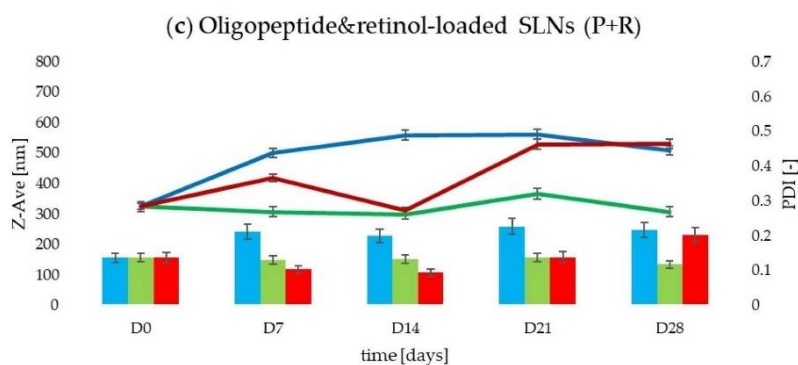


Figure 2. A comparison of the physicochemical parameters—Z-Ave, PDI, and ZP—of the lipid nanoparticle dispersions—B—blank (a); R—retinol (b); P+R—oligopeptide and retinol (c)—stored under different temperature conditions (4, 25, 45 °C) for 28 days.

In the course of stability testing, the following ranges of values of physicochemical parameters were obtained for the lipid nanoparticle dispersion containing oligopeptide and retinol: Z-Ave: 134.7 ± 0.3 – 248.3 ± 7.4 nm; PDI: 0.269 ± 0.017 – 0.464 ± 0.006 [–]; ZP: 42.7 ± 1.2 – 44.5 ± 1.6 mV. The results were obtained after 28 days of storage under three different temperature conditions (4, 25, 45 °C). The storage conditions recommended for the designed dispersion were found to be room temperature, and the slight variations in temperature conditions that occur should not affect the stability of the dispersion. The results were determined to be favorable for the use of SLN as a raw material in cosmetic formulations, where highly stable lipid carriers are necessary [18,40].

2.4. Characterization of Lipid Matrices

The solid state of the lipid nanoparticles and the procedure for the preparation of SLN-type lipid nanoparticles were confirmed by DSC and XRD techniques. For developed SLNs, melting peak values decreased compared to bulk Imwitor® 900 K (65.4 °C), but still, all three dispersions (B; R; P+R) showed onset and melting points higher than 40 °C, which is a prerequisite when it comes to designing lipid nanoparticles for dermal application [41]. Table 4 shows the DSC parameters, including melting point, onset and enthalpy, for all the tested samples.

Table 4. DSC parameters of bulk lipid (Imwitor® 900 K), non-incorporated (B), retinol-loaded (R), and oligopeptide and retinol-loaded SLNs (P+R).

Sample	Melting Peak [°C]	Onset [°C]	Enthalpy [J/g]
Imwitor® 900 K	65.4	54.7	164.5
(B) blank	62.3	51.7	26.8
(R) retinol	61.6	50.7	32.1
(P+R) oligopeptide + retinol	61.7	50.9	33.6

Lipid nanoparticles are classified as crystalline materials; hence, their melting behavior and polymorphic form can be characterized using the DSC method. Imwitor® 900 K, used for the production of lipid nanoparticles, is always represented on the thermogram in the form of a single peak with a maximum at about 65 °C. Hence, in bulk form, it mainly occurs in the stable β form. The process of formation of the lipid nanoparticles is associated with the transition of the bulk lipid to the colloidal state through the β' form but back to the α form, which is usually reflected as a shift in the peak maximum toward lower values. By

analyzing the DSC parameters, this manifested, as mentioned above, as a decrease in the melting point and onset temperature of dispersion of lipid nanoparticles by about 3–4 °C for SLNs, both non-loaded and loaded with bioactive components. The similar melting behavior for the dispersions tested (B; R; P+R) confirmed the effective incorporation of retinol and oligopeptide into the lipid nanoparticles not affecting the polymorphic form and stability of the dispersion system. Since the decrease in the values of the DSC parameters shown in Table 4, relative to bulk Imwitor[®], was not significant, the presumed desirable type of SLN-type lipid nanoparticles was confirmed. In contrast, a much more pronounced decrease in the values of these parameters is usually observed with NLCs (nanostructured lipid carriers). For example, in the work of Averina et al. where liquid lipid (*Pinus sibirica* seed oil) was added to the lipid matrix, the decrease in melting point and onset temperature relative to solid lipid were significantly sizable, which may have resulted in the formation of lipid nanostructures with lower stabilities [42].

The DSC data were confirmed by XRD analysis. Figure 3 shows the diffractograms for bulk Imwitor[®] 900 K and unloaded and loaded SLN dispersions. The crystallization profile of the solid lipid revealed two scattered peaks at the angles $2\theta = 19.5^\circ$ and 23.2° , which indicated the presence of the metastable polymorphic form β' . The effect of the SLN production process itself on the polymorphic state of the lipid was analyzed for both non-incorporated and incorporated formulations. From the patterns, it was noticed that for all three SLN dispersions, the β form was no longer determined. Instead, the observed characteristic single peak on the diffractograms of the dispersions of the lipid nanoparticle was studied. It was attributed to the α form in which the lipid-forming lipid nanoparticle was found due to the transition to a higher energy level after the production of LNs. Analogous results were obtained by Silva et al. when working on SLNs also based on Imwitor[®] 900 K as a solid lipid [43]. Despite the use of different methods for lipid nanoparticle production, the DSC parameters and crystallization profiles did not differ significantly from those determined for the nanocarriers developed within the framework of this paper. Thus, it can be concluded that the melting behavior of lipid nanoparticles depends mainly on the solid lipid used in their production and the polymorphic form, which affects the values of the determined DSC parameters and XRD results.

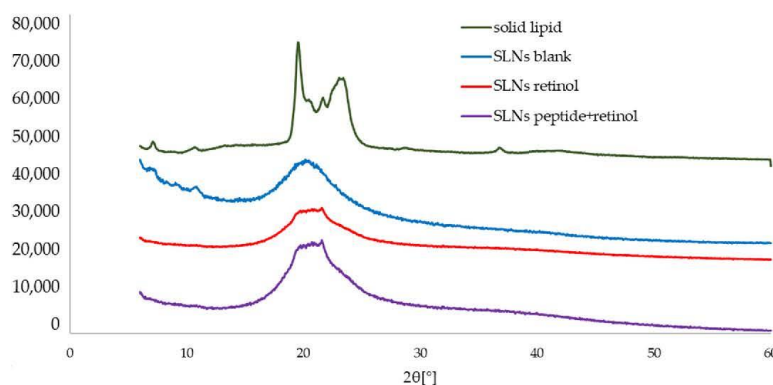


Figure 3. A comparison of the X-ray diffraction patterns of the solid lipid and the studied dispersions of SLNs (the diffractograms are shifted by a constant value of 14,000 arbitrary units in relation to the previous diffractogram).

2.5. Assessment of the Effect of Cosmetic Products on Selected Skin Parameters

Skin's hydration is one of the main parameters determining its proper functioning and healthy appearance. Numerous biochemical processes depend on the condition of the

epidermis and on its barrier properties [44], and symptoms such as roughness and scaliness are the result of insufficient hydration [45]. The ability of the epidermis to retain water is determined by the condition of the protective barrier. The degree of hydration is closely related to the water content within the dermis. As a result of the difference in osmotic pressure, water passes through successive layers of the epidermis and evaporates into the environment [46]. This process is called transepidermal water loss (TEWL) and is a natural process that occurs within the structures of the skin [47]. The EYEN cream, containing SLNs incorporated with retinol and oligopeptide, showed stronger moisturizing properties compared to the EYEB cream, which is only a base without lipid nanoparticles. The results are shown in Figure 4. After 8 weeks of using EYEN, the degree of skin hydration in the eye area increased by 5% ($p < 0.05$) compared to baseline (W0), while measurements made for the cosmetic base (EYEB) showed changes in hydration at a statistically insignificant level. These results corresponded with the values of the TEWL parameter—there was a 7% decrease for the EYEN product and a 3% decrease for EYEB ($p < 0.05$). The noticeable difference in the obtained values of the degree of skin hydration may have been related to the presence of solid lipid nanoparticles, which, exhibiting occlusive properties, may have influenced the reduction in water evaporation from the epidermis [5].

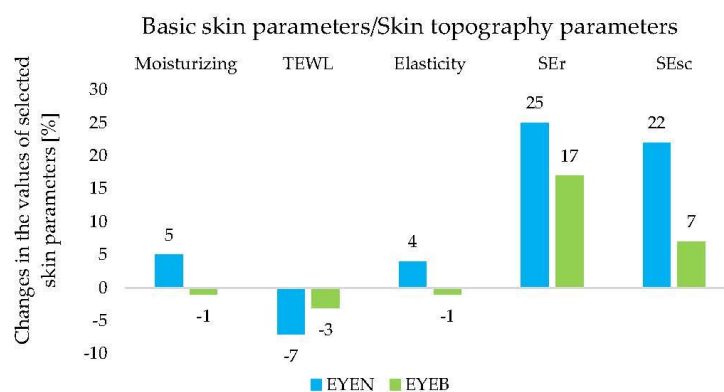


Figure 4. Changes in the values of basic skin parameters and selected skin topography parameters determined during an in vivo study for night eye creams after 8 weeks of application.

The analysis of SEr, a parameter characterizing skin roughness, and SEsc, a parameter of scaliness, is also important for the diagnosis of epidermal conditions and the degree of keratolytic processes (Figure 4). The SEr value recorded after 8 weeks of EYEN application indicated an increase in the degree of roughness by 25%, while for EYEB, the increase was 17% ($p < 0.05$) compared to the results obtained at W0. According to the manufacturer's instructions, the lower the SEr value, the rougher the skin [48]. In addition, the SEsc parameter for the EYEN product increased its value by 22% (T0→T8), while for EYEB, it increased by only 7% ($p < 0.05$). The lower the SEsc value, the less desquamation of the stratum corneum occurred, indicating a higher level of skin hydration [48]. The analyzed results testified to an accelerated process of the desquamation of the stratum corneum and its increased degree (for EYEN), while these phenomena could also affect the roughness of the epidermal surface. Certainly, the desquamation was related to retinol contained in SLNs, which actively affects the skin by accelerating cell renewal and increasing proliferation while, at the same time, enhancing the differentiation of keratinocytes and synthesis of collagens I, III, and VII [49,50]. Importantly, however, it had little effect on hydration parameters and TEWL, the results of which are described above.

Another important parameter was also analyzed, namely skin elasticity, reflecting the anti-aging effectiveness of the cosmetic product. Measurements of the flabbiness and deformability of the skin in the eye area showed that after an 8-week application of the EYEN cream, the value of the parameter increased by 4% ($p < 0.05$), while in the case of the EYEB product, it decreased by 1% with respect to the results from the day of the study, which was considered a statistically insignificant change (Figure 4). The anti-aging properties of the EYEN product containing SLN with active substances (retinol and peptide) were unequivocally confirmed. Satisfactory elasticity values may also have been influenced by proper epidermal hydration. Dry and dehydrated skin tends to be less elastic and more rigid compared to skin characterized by an adequate degree of hydration [46].

Analysis of skin macrorelief images using the profilometric method made it possible to assess the number, depth, and length of wrinkles present on the characterized skin surface in the eye area. The results of this study are summarized in Figure 5. After 8 weeks of using EYEN and EYEB creams, the total wrinkle area was reduced by 20% and 11%, respectively ($p < 0.05$). Moreover, there was also a reduction in the mean length and maximum depth of wrinkles when the EYEN preparation was applied. Mean length was shown to be reduced by 17% and maximum wrinkle depth by 4% ($p < 0.05$). On the other hand, in the case of the cosmetic base (EYEB), there was a 9% decrease in the value corresponding to the length of wrinkles ($p < 0.05$) and a 1% increase in their maximum depth, with the magnitude being within the statistical error; hence, our conclusion was that there was no improvement in this parameter for EYEB.

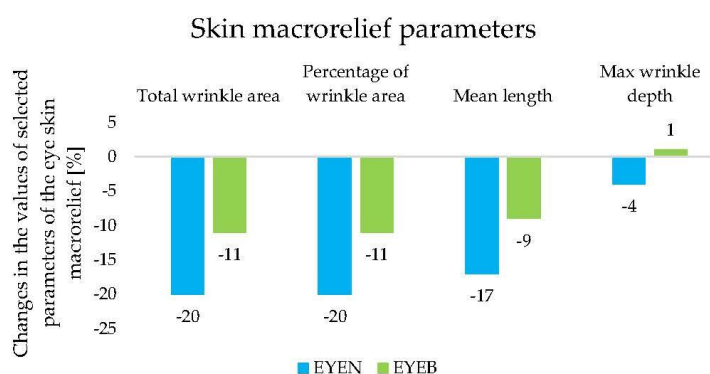


Figure 5. Changes in the values of skin macrorelief parameters determined during an in vivo study for night eye creams after 8 weeks of application.

The results obtained after an 8-week application of the tested cosmetic formulations undoubtedly indicated an improvement in the appearance of the skin and a reduction in the appearance of lines and wrinkles on its surface. Hence, the anti-wrinkle properties of the EYEN cosmetic product containing solid lipid nanoparticles encapsulated with retinol and oligopeptide were confirmed. The effectiveness of retinol-loaded lipid nanoparticles was also confirmed by Ferreira et al. They noted lower irritation potential and a lower degree of skin peeling of SLNs enriched with retinol compared to the use of retinoid in its classic form [6]. Salvioni et al., on the other hand, mentioned the occlusive properties of SLNs, which had an influence on the moisture level of the skin [29].

It should be mentioned here that the skin around the eyes is very thin (about 0.35 mm on the eyelids) [45], which makes it susceptible to loss of elasticity and hydration, and thus the formation of wrinkles relatively common [51]. Based on the in vivo study, it was concluded that the properties of the EYEN cream can fully meet the needs of the delicate skin around the eyes.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

Four different solid lipids were selected for lipid screening—Compritol[®] 888 ATO (glyceryl dibehenate), Precirol[®] ATO 5 (glyceryl distearate) from Gattefossé (Lyon, France), Imwitor[®] 900 K (glyceryl monostearate) and Witepsol[®] H15 (a blend of tri-, di- and monoglycerides of fatty acids) from IOI Oleo GmbH (Hamburg, Germany). The dispersions of the lipid nanoparticles were produced by using glycerol (99.5%; Chempur, Piekary Śląskie, Poland), CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide, ≥98%; Chemat, Gdańsk, Poland), L-phosphatidylcholine (from soybean, Type II-S, 14–29% choline basis) and Lutrol[®] F68 (>90%) from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), as well as sodium cholate (99%; Acros Organics, Antwerp, Belgium) and Tween[®] 80 (polysorbate 80; Pol-Aura, Zawroty, Poland). The incorporated active compounds—Retinol GS50 (retinol, 50%) and Leupheryl[®] peptide (pentapeptide-18/Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu, 99.5%)—were purchased from DSM (Kaiseraugst, Switzerland) and Lipotec (Barcelona, Spain), respectively.

3.2. Optimization of the Composition of Lipid Nanoparticles—Selected Factors

The optimization of the composition of the lipid nanoparticles started with the selection of a retinol-compatible solid lipid, as the composition of the lipid matrix is crucial for the stability of the SLN [23]. First, appropriate amounts of pre-selected solid lipids and retinol were weighed into glass vials. The components were then heated to a temperature above the melting point of the solid lipid. In the final step, the resulting mixtures were observed at 15 min, 30 min, 1 h, 24 h, and 72 h after the system was solidified. The experiment aimed to obtain a compatible and homogeneous mixture from the combination of retinol and solid lipid. Four solid lipids were used in this study: Compritol[®] 888 ATO (glyceryl dibehenate), Precirol[®] ATO 5 (glyceryl distearate), Imwitor[®] 900 K (glyceryl monostearate) and Witepsol[®] H15 (a blend of tri-, di- and monoglycerides of fatty acids). Solid lipids found to be compatible with the tested active ingredient after 72h were subjected to further testing as components (1.0 wt.%) of lipid nanoparticle dispersions.

The next optimization step was to verify the necessity of including phosphatidylcholine in the dispersion. This compound belongs to the group of glycerophospholipids (the most common polar lipid compounds found in nature), mainly in the outer parts of the cell membrane [52]. Phosphatidylcholine is also credited with the ability to ensure the stability of the lipid nanoparticle dispersions containing it [53]. In the course of this study, lipid nanoparticles differing regarding the presence (0.25 wt.%) or absence of the raw material were compared.

A combination of four different surfactants was also used during optimization. Included in this study were surfactants belonging to the non-ionic group—Tween[®] 80 (polysorbate 80) and Lutrol[®] F68 (polyoxyethylene–polyoxypropylene block copolymer), anionic–sodium cholate, and cationic–hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB). Optimization at the surfactant system selection stage consisted solely of varying the composition of the external aqueous phase for producing the target lipid nanoparticles. Various surfactant systems were tested based on a combination of 1.5 wt.% non-ionic surfactant with or without 0.1 wt.% sodium cholate while assuming a constant CTAB content of 0.5 wt.%. One trial was also performed, during which the use of CTAB in the lipid phase was abandoned.

3.3. Lipid Nanoparticles—Method of Production

Solid lipid nanoparticles were produced by applying a high shear homogenization (HSH) method based on multiple emulsion (W/O/W). The first step was to introduce the components of the external aqueous phase (I) into a glass beaker (0.1 wt.% sodium cholate and 1.5 wt.% Tween[®] 80 (polysorbate 80) were dispersed in distilled water) and heat them to 35 °C while stirring at 250–300 rpm for 15 min. Then, the system was cooled to room temperature. At the same time, the components of the lipid phase (II)—1.0 wt.% Imwitor[®] 900 K (glyceryl monostearate), 0.5 wt.% CTAB (hexadecyltrimethylammonium

bromide) and 0.25 wt.% L-phosphatidylcholine—were introduced into a glass beaker and heated to the melting point of the solid lipid. Next, 2.0 wt.% of retinol was added to the properly heated lipid phase (II) and cooled to 60 °C. The next step was to gradually pour the heated glycerol into a beaker with the lipid phase (II) and subject the resulting mixture to continuous stirring for 10 min. At the same time, an aqueous solution of 0.1 wt.% Leuphasyl® peptide (pentapeptide-18/Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu), which was the internal aqueous phase (III), was prepared in a glass vial. The solution was heated to 60 °C and then added to the lipid phase (II). The key step was to subject the system to high shear homogenization (Ultra-Turrax® DI 25 Basic, IKA-Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Germany) at 8000 rpm for 15 min. The resulting W/O emulsion was combined in the final step with the external aqueous phase (I) under continuous stirring at 500 rpm for 15 min.

3.4. Lipid Nanoparticles—Physicochemical Parameters

The three basic physicochemical parameters of lipid nanoparticle dispersions were determined using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). The mean particle size (Z-Ave), polydispersity index (PDI), and zeta potential (ZP) were taken into account. Measurements were performed on aqueous solutions of SLN dispersion with appropriate concentrations and pH values. The measurement procedure was repeated three times for each sample, and the arithmetic mean and standard deviation were calculated from the obtained results.

3.5. Encapsulation Efficiency and Loading Capacity

The encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (LC) of retinol and oligopeptide in solid lipid nanoparticles were determined indirectly by the centrifugation technique, assessing the free retinol and pentapeptide-18 (non-incorporated) contents by UV-Vis spectroscopy (Varian Cary 50 Bio UV-Vis Spectrophotometer, Varian Inc./Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The spectroscopic method was previously validated and involved the quantification of non-encapsulated active substances present in the external aqueous phase of the surfactant of LNs dispersion. The samples were prepared by measuring 1 mL of the dispersion into an Eppendorf Tubes® test tube, placing it in the angular rotor of an MPW-350R laboratory centrifuge (MPW MED. INSTRUMENTS, Warsaw, Poland), and centrifuging at 4000 rpm for 30 min. In the next step, 20 µL of the supernatant (the aqueous solution of the external phase separated by centrifugation) was taken into the flask, which was subsequently increased up to 10 mL with a 50:50 mixture of phosphate buffer (pH = 5.8) and ethanol. The sample was then shaken vigorously for 5 min. The final step was to convert the concentration results into encapsulation efficiency and loading capacity (expressed as a percentage), in accordance with the following equations [54]:

$$EE[\%] = \frac{\text{total amount of active substance} - \text{amount of non-incorporated active substance}}{\text{total amount of active substance}} \quad (1)$$

$$LC [\%] = \frac{\text{total amount of active substance} - \text{amount of non-incorporated active substance}}{\text{total amount of lipid}} \quad (2)$$

3.6. Stability Test

The confirmation of the stability of the lipid nanoparticle dispersions was carried out by verifying changes in the values of three parameters (Z-Ave, PDI, and ZP; Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments, Malvern, UK) over time and under varying temperature conditions. The stability test was performed for the target optimized dispersions of SLNs: sample 1 (B, blank)—non-incorporated lipid nanoparticles; sample 2 (R)—SLNs containing 2.0 wt.% of retinol; sample 3 (P+R)—SLNs loaded with 0.1 wt.% of pentapeptide-18 and 2.0 wt.% of retinol. The experiment was conducted on the day that the lipid nanoparticles were received (D0) and after 7, 14, 21, and 28 days of storage at 4, 25, and 45 °C. The statistical analysis was carried out using Statistica 10.0 software. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

3.7. X-ray Diffraction (XRD) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) Analysis

The characterization of the lipid matrices of SLNs was performed by using X-ray diffraction (XRD; D8 Advance powder diffractometer combined with a Johansson monochromator/Bruker, Billerica, MA, USA) and differential scanning calorimetry (DSC; DSC 8500 differential scanning calorimeter/PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Both samples of solid lipid and dispersions of lipid nanoparticles were analyzed. The procedure of sample preparation and the detailed conditions of DSC and XRD analysis for lipid nanoparticle dispersions were described in earlier papers [55]. In brief, the principle of DSC measurement was to gradually heat a sample of solid lipid or SLN dispersions from 25 °C to 90 °C in a flow of nitrogen (20 mL/min) at a scanning rate of 5 °C per minute, maintaining the sample at 90 °C for 1 min, and then cooling it to 25 °C with similar parameters. On the other hand, during XRD analysis, samples were dried at room temperature before measurement. For each sample, the procedure was carried out within the high-angle range ($2\theta = 6.0\text{--}60.0^\circ$).

3.8. Cosmetic Products/Eye Creams—Preparation

This study was performed on two cosmetic preparations—two night eye creams produced by *Dottore Polska Sp. z o.o.*, Poznan, Poland. The formulation of the cosmetic products was in accordance with Regulation (EC) No 1223/2009/EC of the European Parliament and the Council of 30 November 2009 on cosmetic products with subsequent updates. One of the cosmetic formulations contained a tested SLN dispersion, which was added in the last technological stage with continuous mixing to ensure the uniform consistency of the cosmetic mass. The exact quantitative composition and manufacturing technology of the eye creams remain the sole knowledge of *Dottore Polska Sp. z o.o.* Two cosmetic products of analogous composition (O/W emulsions with 24.5 wt.% of lipid phase), differing only in the presence of lipid nanoparticle dispersion, were used in a comparative study, which is discussed within the scope of this paper. The INCI compositions of night eye creams investigated are shown below.

3.8.1. EYEN (Anti-Aging Night Eye Cream Containing 1.0 wt.% of Lipid Nanoparticles Loaded with Retinol and Pentapeptide-18)

Ingredients (INCI): Aqua, Butylene Glycol, Coco-Caprylate/Caprates, Pentylene Glycol, Propanediol, Cetyl Alcohol, Glyceryl Stearate, *Simmondsia Chinensis* Seed Oil, *Trisostearin*, Glyceryl Stearate Citrate, *Butyrospermum Parkii* Butter, *Theobroma Cacao* Seed Butter, Glycerin, Cetyl Ricinoleate, *Persea Gratissima* Oil, retinol, Sodium Hyaluronate, Acetyl Tetrapeptide-5, Palmitoyl Tripeptide-5, Palmitoyl Dipeptide-5 Diaminobutyryl Hydroxythreonine, Tetradecyl Aminobutyrylvalylaminobutyric Urea Trifluoroacetate, Pentapeptide-18, Phosphatidylcholine, Cetrimonium Bromide, sodium cholate, Potassium Cocoyl Hydrolyzed Rice Protein, Sodium Cocoyl Amino Acids, Caprylic/Capric Triglyceride, Tocopheryl Acetate, Tocopherol, *Helianthus Annuus* Seed Oil, Raspberry Ketone, Stearyl Alcohol, Polysorbate 80, Xanthan Gum, Magnesium Chloride, Tetrasodium Glutamate Diacetate, Sodium Hydroxide, Trisodium NTA, and Parfum.

3.8.2. EYEB (Anti-Aging Night Eye Cream without Lipid Nanoparticles)

Ingredients (INCI): Aqua, Butylene Glycol, Coco-Caprylate/Caprates, Pentylene Glycol, Propanediol, Cetyl Alcohol, Glyceryl Stearate, *Simmondsia Chinensis* Seed Oil, *Trisostearin*, Glyceryl Stearate Citrate, *Butyrospermum Parkii* Butter, *Theobroma Cacao* Seed Butter, Glycerin, Cetyl Ricinoleate, *Persea Gratissima* Oil, Sodium Hyaluronate, Acetyl Tetrapeptide-5, Palmitoyl Tripeptide-5, Palmitoyl Dipeptide-5 Diaminobutyryl Hydroxythreonine, Tetradecyl Aminobutyrylvalylaminobutyric Urea Trifluoroacetate, Potassium Cocoyl Hydrolyzed Rice Protein, Sodium Cocoyl Amino Acids, Caprylic/Capric Triglyceride, Tocopheryl Acetate, Tocopherol, *Helianthus Annuus* Seed Oil, Raspberry Ketone, Stearyl Alcohol, Xanthan Gum, Magnesium Chloride, Tetrasodium Glutamate Diacetate, Sodium Hydroxide, Trisodium NTA, and Parfum.

3.9. Evaluation of the Effectiveness of Cosmetic Products—In Vivo Study

Application tests were carried out on a group of 20 female volunteers aged 30–65 years old with signs of aging in the eye area, such as wrinkles and skin sagging. Before this study, the volunteers were informed about the implications of this study (in the form of information material) and signed an informed consent form to participate in the tests. Each participant received two cosmetic products: EYEN (an eye cream containing lipid nanoparticles) and EYEB (a formulation devoid of active substances encapsulated in lipid carriers). The cosmetic formulations tested were to be applied once a day at night. During this time, the application of cosmetics of similar or analogous compositions and actions was prohibited. Sun exposure, including tanning beds, was also to be avoided (due to the presence of retinol in the cream formulation). Any adverse effects were to be reported to the principal investigator.

The duration of the in vivo study was 8 weeks and approved by the Bioethical Commission of Poznan University of Medical Sciences, Poland, on 12 October 2023 (768/23). Skin parameters were measured before the application of the products on the day that this study started (W0) and after 8 weeks (W8) of use. To assess skin condition, the following equipment from Courage + Khazaka electronic GmbH (Cologne, Germany) was used: Tewameter[®] TM 300 (transepidermal water loss level, TEWL); Corneometer[®] CM 825 (epidermal hydration level); Cutometer[®] MPA 580 (skin elasticity); Visioscan[®] VC 98 (skin topography parameters); Visioline[®] VL 650 (skin macrorelief parameters). The Wilcoxon test for pairs of observation results was used for statistical analysis. The level of significance was $p < 0.05$.

4. Conclusions

The use of solid lipid nanoparticles encapsulated with retinol and pentapeptide (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu) in the cosmetic industry is perfectly in line with the trend of skin minimalism. The main advantage of using lipid nanocarriers is the provision of assisted transepidermal transport, which enables the delivery of active substances with prolonged action directly to the deeper layers of the epidermis. The additive nature of the active compounds incorporated into SLNs provides a broader spectrum of action and offers more functions than retinol and peptide used in therapy alone. Through numerous trials to optimize the SLN formulation, it was proven that Imwitor[®] 900 K was most compatible as a solid lipid. The presence of L-phosphatidylcholine as a polar lipid compound also proved crucial for dispersion. In contrast, the surfactant group represented by the combination of Tween[®] 80, sodium cholate, and CTAB proved to be the most effective. The physicochemical parameters of the designed lipid nanoparticles enriched with retinol and oligopeptide, such as a particle size (Z-Ave) of less than 200 nm, a polydispersity index (PDI) of up to 0.3, and a zeta potential (ZP) of >30 mV, met the requirements of their functionality for cosmetic application. The efficiency of transepidermal transport (using SLNs) was confirmed by in vivo studies, indicating the potential of these lipid nanoparticles as a cosmetic raw material in terms of reducing wrinkles and supporting the regeneration of the delicate skin around the eyes. It should be mentioned that there are few cosmetic products on the cosmetic market that use lipid nanoparticle technology. Available solid lipid nanoparticles usually contain only one active ingredient, such as retinol itself. Peptides incorporated in the lipid matrix are virtually absent in cosmetics. The presented research proved the effectiveness of SLNs containing simultaneously lipophilic retinol and hydrophilic oligopeptide, which is an innovative solution not previously used in the cosmetics industry.

Author Contributions: Conceptualization, M.P., M.M. and I.N.; methodology, M.P. and M.M.; validation, M.M.; formal analysis, M.P. and M.M.; investigation, M.P. and M.M.; resources, I.N.; writing—original draft preparation, M.P. and M.M.; writing—review and editing, M.P., M.M. and I.N.; supervision, W.J. and I.N.; funding acquisition, I.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partially funded by the Ministry of Science and Higher Education via the fourth edition of the Minister’s program entitled ‘Implementation PhD’, grant no. DWD/4/33/2020.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethical Commission of Poznan University of Medical Sciences (768/23, 12 October 2023).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors upon request. The general procedure for the emulsions’ formation is only available to non-professionals.

Acknowledgments: The authors would like to thank IOI Oleo GmbH (Hamburg, Germany) for providing free samples of the solid lipids used in the course of this study.

Conflicts of Interest: Authors M.P. and W.J. were employed by Dottore Polska Sp. z o.o. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as potential conflicts of interest.

References

- Kim, B.; Cho, H.-E.; Moon, S.H.; Ahn, H.-J.; Bae, S.; Cho, H.-D.; An, S. Transdermal delivery systems in cosmetics. *Biomed. Dermatol.* **2020**, *4*, 10. [CrossRef]
- Anil, L.; Kannan, K. Microemulsion as drug delivery system for peptides and proteins. *J. Pharm. Sci. Res.* **2020**, *10*, 16–25.
- Czerwonka, W.; Puchalska, D.; Lipińska, M.; Habrat, A. Mechanizmy i metody przenikania substancji czynnych przez barierę lipidową skóry. *Kosmetol. Estet.* **2018**, *7*, 667–670.
- Jaworska, M.; Sikora, E.; Ogonowski, J. Czynniki Wpływające Na Penetrację Składników Aktywnych Przez Skórę Factors Influencing the Percutaneous Penetration of Active Ingredients. *Wiadomości Chem.* **2011**, *65*, 3–4.
- Ghasemiyeh, P.; Mohammadi-Samani, S. Potential of nanoparticles as permeation enhancers and targeted delivery options for skin: Advantages and disadvantages. *Drug Des. Dev. Ther.* **2020**, *14*, 3271–3289. [CrossRef] [PubMed]
- Ferreira, R.; Napoli, J.; Enver, T.; Bernardino, L.; Ferreira, L. Advances and challenges in retinoid delivery systems in regenerative and therapeutic medicine. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4265. [CrossRef]
- Zasada, M.; Budzisz, E. Retinoids: Active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. *Adv. Dermatol. Allergol.* **2019**, *36*, 392–397. [CrossRef]
- Charoenputtakhun, P.; Opanasopit, P.; Rojanarata, T.; Ngawhirunpat, T. All-trans retinoic acid-loaded lipid nanoparticles as a transdermal drug delivery carrier. *Pharm. Dev. Technol.* **2014**, *19*, 164–172. [CrossRef]
- Zasada, M.; Adamczyk, A.; Witamina, A. Budowa i mechanizm działania. Vitamin A. Structure and mechanism of action. Kosmetologia estetyczna. *Kosmetol. Estet.* **2018**, *7*, 517–521.
- Ferreira, M.S.; Magalhães, M.C.; Sousa-Lobo, J.M.; Almeida, I.F. Trending Anti-Aging Peptides. *Cosmetics* **2020**, *7*, 91. [CrossRef]
- Resende, D.; Ferreira, M.S.; Sousa-Lobo, J.M.; Sousa, E.; Almeida, I.F. Usage of synthetic peptides in cosmetics for sensitive skin. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 702. [CrossRef] [PubMed]
- SCCS/1576/16; Scientific Committee on Consumer Safety SCCS. 2016. Available online: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_199.pdf (accessed on 16 September 2024).
- Aguilar-Toalá, J.E.; Hernández-Mendoza, A.; González-Córdova, A.F.; Vallejo-Córdoba, B.; Liceaga, A.M. Potential role of natural bioactive peptides for development of cosmeceutical skin products. *Peptides* **2019**, *122*, 13. [CrossRef] [PubMed]
- Limbert, G.; Masen, M.A.; Pond, D.; Graham, H.K.; Sherratt, M.J.; Jobanputra, R.; McBride, A. Biotribology of the ageing skin—Why we should care. *Biotribology* **2018**, *17*, 75–90. [CrossRef]
- Almeida, A.J.; Souto, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 478–490. [CrossRef]
- Errante, F.; Ledwoń, P.; Latajka, R.; Rovero, P.; Papini, A.M. Cosmeceutical Peptides in the Framework of Sustainable Wellness Economy. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 572923. [CrossRef] [PubMed]
- Information material from Lipotec®. Leuphasyl. 2020; pp. 1–15.
- Almeida, A.J.; Runge, S.; Müller, R.H. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of production parameters. *Int. J. Pharm.* **1997**, *149*, 255–265. [CrossRef]
- Wissing, S.A.; Müller, R.H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.* **2003**, *254*, 65–68. [CrossRef]
- Lasoń, E.; Ogonowski, J. Stałe Nanocząsteczki Lipidowe-charakterystyka, zastosowanie i otrzymywanie. *Chemik* **2011**, *65*, 960–967.
- Wosicka, J. Stałe nanocząsteczki lipidowe i nanostrukturalne nośniki lipidowe w nowoczesnych kosmetykach. *Pol. J. Cosmetol.* **2009**, *12*, 23–37.
- Yadav, N.; Khatak, S.; Vir, U.; Sara, S. Solid lipid nanoparticles—A review. *Int. J. Appl. Pharm.* **2013**, *5*, 8–18.
- Banerjee, J.; Pillai, S. Solid lipid matrix mediated nanoarchitectonics for improved oral bioavailability of drugs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2019**, *15*, 499–515. [CrossRef]

24. Abdelbary, G.; Fahmy, R.H. Diazepam-Loaded solid lipid nanoparticles: Design and characterization. *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10*, 211–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Müller, R.H.; Runge, S.A.; Ravelli, V.; Thünemann, A.F.; Mehnert, W.; Souto, E.B. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®): Drug-lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 535–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Jenning, V.; Schafer-Korting, M.; Gohla, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: Drug release properties. *J. Control. Release* **2022**, *66*, 115–126. [[CrossRef](#)]
27. Fangueiro, J.F.; Andreani, T.; Egea, M.A.; Garcia, M.L.; Souto, S.B.; Souto, E.B. Experimental factorial design applied to mucoadhesive lipid nanoparticles via multiple emulsion process. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2012**, *100*, 84–89. [[CrossRef](#)]
28. Molet-Rodríguez, A.; Martín-Belloso, O.; Salvia-Trujillo, L. Formation and Stabilization of W1/O/W2 Emulsions with Gelled Lipid Phases. *Molecules* **2021**, *26*, 312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Salvioni, L.; Morelli, L.; Ochoa, E.; Labra, M.; Fiandra, L.; Palugan, L.; Prosperi, D.; Colombo, M. The emerging role of nanotechnology in skincare. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2021**, *293*, 102437. [[CrossRef](#)]
30. Musielak, E.; Feliczak-Guzik, A.; Nowak, I. Synthesis and Potential Applications of Lipid Nanoparticles in Medicine. *Materials* **2022**, *15*, 682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Vanic, Z. Phospholipid vesicles for enhanced drug delivery in dermatology. *J. Drug Discov. Dev. Deliv.* **2015**, *2*, 8.
32. Sauepe, A.; Rades, T. *Nanocarrier Technologies*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2006.
33. Dąbrowska, M.; Souto, E.B.; Nowak, I. Lipid nanoparticles loaded with iridoid glycosides: Development and optimization using experimental factorial design. *Molecules* **2021**, *26*, 3161. [[CrossRef](#)]
34. Gonzalez-Rodríguez, M.L.; Rabasco, A.M. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. *Drug Deliv* **2011**, *8*, 857–871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Souto, E.B.; Müller, R.H. *Lipid Nanoparticles: Effect on Bioavailability and Pharmacokinetic Changes*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010. [[CrossRef](#)]
36. Guimarães, K.L.; Ré, M.I. *Lipid Nanoparticles as Carriers for Cosmetic Ingredients: The First (SLN) and the Second Generation (NLC)*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011. [[CrossRef](#)]
37. Boskabadi, M.; Saeedi, M.; Akbari, J.; Morteza-Semnani, K.; Hashemi, S.M.H.; Babaei, A. Topical Gel of Vitamin A Solid Lipid Nanoparticles: A Hopeful Promise as a Dermal Delivery System. *Adv. Pharm. Bull.* **2021**, *11*, 663–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Dąbrowska, M.A. Optymalizacja właściwości fizykochemicznych oraz aplikacyjnych formułacji kosmetycznych zawierających wybrane glikozydy irydoidowe. Ph.D. Thesis, AMU Poznań, Poznan, Poland, 2019; p. 167.
39. Hallan, S.S.; Sguizzato, M.; Esposito, E.; Cortesi, R. Challenges in the physical characterization of lipid nanoparticles. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Dąbrowska, M.; Nowak, I. Lipid nanoparticles loaded with selected iridoid glycosides as effective components of hydrogel formulations. *Materials* **2021**, *14*, 4090. [[CrossRef](#)]
41. Sauepe, A.; Wissing, S.A.; Lenk, A.; Schmidt, C.; Müller, R.H. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC)—Structural investigations on two different carrier systems. *Bio-Med. Mater. Eng.* **2005**, *15*, 393–402.
42. Averina, E.S.; Seewald, G.; Müller, R.H.; Radnaeva, L.D.; Popov, D.V. Nanostructured lipid carriers (NLC) based on Siberian pine (*Pinus sibirica*) seed oil. *Pharmazie* **2010**, *65*, 25–31.
43. Silva, A.; González-Mira, E.; García, M.; Egea, M.; Fonseca, J.; Silva, R.; Santos, D.; Souto, E.; Ferreira, D. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *86*, 158–165. [[CrossRef](#)]
44. Kilpatrick-Liverman, L.; Mattai, J.; Tinsley, R.; Wu, J. Mechanisms of Skin Hydration. In *Cosmetic Science and Technology*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2014; Chapter 7; pp. 81–92.
45. Adamski, Z.; Kaszuba, A. *Dermatologia dla kosmetologów*; Edra Urban & Partner: Wrocław, Poland, 2019; ISBN 9788376091471.
46. Noszczyk, M. *Kosmetologia pielęgnacyjna i lekarska*; PZWL Wydawnictwo Lekarskie: Warsaw, Poland, 2012; ISBN 9788320061062.
47. Machado, M.; Salgado, T.M.; Hadgraft, J.; Lane, M.E. The relationship between transepidermal water loss and skin permeability. *Int. J. Pharm.* **2010**, *384*, 73–77. [[CrossRef](#)]
48. Manual Instruction from Couriage+Khazaka®. Visioscan VC 98. 2017.
49. Bojarowicz, H.; Płowiec, A. Wpływ witaminy A na kondycję skóry. *Probl. Hig. Epidemiol.* **2010**, *91*, 352–356.
50. Czamoto, A. Retinoidy. Mechanizm działania, właściwości oraz zakres stosowania w dermatologii i kosmetologii. *Kosmetol. Estet.* **2018**, *7*, 371–376.
51. Suligowska, I. *Pielęgnowanie oczu i ich oprawy. Poradnik dla ucznia*; Instytut Technologii Eksploatacji-Państwowy Instytut Badawczy: Radom, Poland, 2006.
52. Carreira, A.C.; Santos, T.C.; Lone, M.A.; Zupančič, E.; Lloyd-Evans, E.; de Almeida, R.F.M.; Homemann, T.; Silva, L.C. Mammalian sphingoid bases: Biophysical, physiological and pathological properties. *Prog. Lipid Res.* **2018**, *75*, 100988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Zhang, B.; Zhou, X.; Miao, Y.; Wang, X.; Yang, Y.; Zhang, X.; Gan, Y. Effect of phosphatidylcholine on the stability and lipolysis of nanoemulsion drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* **2020**, *583*, 119354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Gao, S.; Tian, B.; Han, J.; Zhang, J.; Shi, Y.; Lv, Q.; Li, K. Enhanced transdermal delivery of lornoxicam by nanostructured lipid carrier gels modified with polyarginine peptide for the treatment of carrageenan-induced rat paw edema. *Int. J. Nanomed.* **2019**, *2*, 6135–6150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Marzec, M.; Dąbek, P.; Witkowski, A.; Monedeiro, F.; Pomastowski, P.; Buszewski, B.; Nowak, I. Lipid Constituents of Diatoms (Halamphora) as Components for Production of Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Article

Retinol and Oligopeptide-Loaded Lipid Nanocarriers as Effective Raw Material in Anti-Acne and Anti-Aging Therapies

Małgorzata Pawłowska ^{1,2}, Marta Marzec ^{1,*} , Waldemar Jankowiak ² and Izabela Nowak ^{1,*}

¹ Department of Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Poznań, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland; malgorzata.pawlowska@amu.edu.pl

² Dottore Polska Sp. z o.o., Margonińska 22, 60-425 Poznań, Poland

* Correspondence: marta.marzec@amu.edu.pl (M.M.); nowakiza@amu.edu.pl (I.N.); Tel.: +48-61-8291580 (I.N.)

Abstract: The use of lipid nanocarriers as components of cosmetic formulations may provide an opportunity to fully exploit the beneficial properties of pentapeptide-18 and retinol while reducing the undesirable effects that occur during retinoid therapy. This study aimed to evaluate the effectiveness of semi-solid formulations enriched with retinol and oligopeptide-loaded lipid nanocarriers. Solid lipid nanoparticles were produced using a high-shear homogenization method. The work included physicochemical characterization of the cosmetic products, and evaluation of their stability as well as their efficacy. The resulting semi-solid preparations were determined to be stable regardless of their storage temperature. No effect of the presence of lipid nanoparticles on the shelf-life stability of the cosmetic products was observed. A temperature of 25 °C was considered the recommended storage temperature for the tested semi-solid formulations. Beneficial effects of the cosmetic products were proven (in vivo study on volunteers), i.e., a significant reduction in the level of sebum secretion (anti-acne therapy) and a decrease in the number of facial wrinkles (anti-aging therapy). In addition, the protective properties of the lipid nanoparticles themselves against the skin were confirmed, reducing the irritating effect of retinol that is usually the case with classic retinoid therapies.

Keywords: solid lipid nanoparticles; retinol; oligopeptide; anti-aging therapy; anti-acne action



Citation: Pawłowska, M.; Marzec, M.; Jankowiak, W.; Nowak, I. Retinol and Oligopeptide-Loaded Lipid Nanocarriers as Effective Raw Material in Anti-Acne and Anti-Aging Therapies. *Life* **2024**, *14*, 1212. <https://doi.org/10.3390/life14101212>

Academic Editors: Marisa Colone and Vanessa F.C. Dartora

Received: 22 July 2024

Revised: 19 September 2024

Accepted: 23 September 2024

Published: 24 September 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Harnessing the therapeutic potential of retinol and peptides in line with the current trend of “skin minimalism” is possible through the use of solid lipid nanoparticles (SLNs), colloidal carriers of active substances for topical application [1]. Lipid nanoparticles provide a delivery system for active compounds, increasing their bioavailability while controlling permeation and distribution in target tissues [2]. The biocompatibility and lack of toxicity of the aforementioned lipid carriers are primarily related to the structure of the lipid matrix, which undergoes enzymatic degradation to compounds naturally found in the human body [2].

Peptides used in cosmetics have a low molecular weight and are hydrophilic in nature [3]. Based on their structure and chain length, these compounds can be divided into oligopeptides, polypeptides, and proteins [4,5]. The study of Olejnik et al. [5] showed that the group of peptides used in cosmetics is also divided in terms of action and function concerning the skin—signal peptides, so-called neuropeptides, and carrier peptides. The oligopeptide (pentapeptide-18) used in the study belongs to the group of neurotransmitter inhibitor peptides, which in its action resembles the natural enkephalin pathway by affecting the reduction in acetylcholine release at the synapse in the nervous system [6,7]. Clinical studies indicate its broad anti-aging effect on the skin, including by reducing the depth of facial wrinkles [6].

Retinol, a compound from the retinoid group, shows analogous properties and structure characteristics of vitamin A [8]. Retinol is the primary biologically inactive form and

must be converted to retinal and then to retinoic acid, which is the only biologically active form [9]. This process occurs in the cell and is associated with RBPs (retinoid binding proteins) [10,11]. The positive effects of retinol can be observed in all layers of the skin (collagen synthesis and regulation of sebaceous glands) [12].

The incorporation of retinol into a matrix of lipid nanoparticles may provide a solution to the problematic limitations of retinoids when they are used in cosmetic therapies. Wissing and Lasoń et al. [13,14] pointed out the contribution of solid lipid nanoparticles to the controlled release of active substances and to protecting them from chemical degradation; this includes retinol and peptides. Also emphasized are the occlusive properties of lipid nanoparticles, which increase skin hydration [15]. Ferreira et al. [16] further pointed out that retinoids delivered topically in the form of lipid nanoparticles are more stable and better tolerated by the skin. Anil and Kannan [17], on the other hand, stressed that the incorporation of peptides inside lipid nanoparticles provides better bioavailability, while Almeida et al. [18] pointed out the increased stability, prolonged release of peptides, and prevention of their degradation.

Nowadays, the cosmetic market offers many active substances dedicated to the care of aging skin, where ensuring an adequate level of hydration and effective antioxidant activity play an important role [19]. Among the most commonly used active compounds, in addition to the aforementioned retinol and peptides, are vitamin C [19,20] and glycolic acid [21]. These substances have an anti-aging effect through their antioxidant and exfoliating properties. On the other hand, in the case of acne-prone skin and skin with imperfections, chemical peels with the use of, among other components, mandelic and pyruvic acids, are considered to be the most effective. They have a beneficial effect on the regulation of the sebaceous glands, while also having an antibacterial effect, which are desired for the care of skin with acne problems [22,23].

The purpose of the study presented in this paper was to introduce the designed dispersion of lipid nanoparticles, i.e., solid lipid nanoparticles loaded with retinol and pentapeptide-18 (oligopeptide, Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu), into semi-solid cosmetic preparations in the form of night face creams. The work included physicochemical characterization of the cosmetic products, and evaluation of their stability as well as their efficacy (in vivo studies). The novelty of this research lies in the combination of retinol and oligopeptide in a lipid carrier, which is a new solution unprecedented in the cosmetic market. An attempt was also made to verify the effectiveness of the anti-aging oligopeptide and the reduction in the irritant potential of retinol introduced into lipid carriers and used in anti-aging and anti-acne therapies.

2. Materials and Methods

2.1. Production and Characterization of Lipid Nanoparticles

Lipid nanoparticles were produced by applying a high shear homogenization (HSH) method based on multiple emulsion (W/O/W) (Figure 1). The lipid phase (1.75 wt.%)—L-phosphatidylcholine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), Imwitor[®] 900 K (glyceryl monostearate; IOI Oleo GmbH, Hamburg, Germany), and hexadecyltrimethylammonium (CTAB; Chemat, Gdańsk, Poland)—was prepared first, and heated to the melting point of the lipid. The next step was to add 2.0 wt.% of retinol (DSM, Kaiseraugst, Switzerland) and then glycerol (Chempur, Piekary Śląskie, Poland). At the same time, an aqueous solution of Tween[®] 80 at a concentration of 3% *w/w* (polysorbate 80; Pol-Aura, Zawroty, Poland) was prepared with the addition of 0.1 wt.% sodium cholate (Acros Organics, Antwerp, Belgium). Leuphasyl[®] peptide (pentapeptide-18/Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu; Lipotec, Barcelona, Spain), which was the internal aqueous phase, was added to the lipid phase (high shear homogenization, 8000 rpm/15 min—Ultra-Turrax[®] DI 25 Basic, IKA-Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Germany). The final step was to add the resulting pre-emulsion to the previously prepared aqueous surfactant solution under continuous stirring.

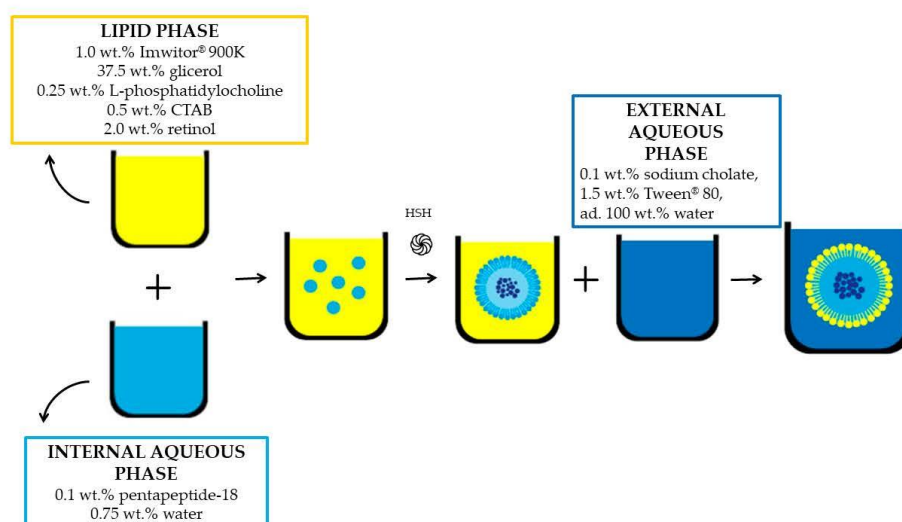


Figure 1. A step-by-step scheme for production of lipid nanoparticles.

A set of physicochemical parameters of lipid nanoparticle dispersions—mean particle size (*Z-Ave*), polydispersity index (*PDI*), and zeta potential (*ZP*)—was determined with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). These parameters were determined based on the scattering of the laser light beam generated by the device on the particles of the dispersion of lipid nanoparticles, with respect to the following phenomena: (i) dynamic light scattering (DLS)—*Z-Ave*&*PDI*: the method is based on measuring changes in the intensity of light scattered under the influence of the movement of dispersed particles; and (ii) electrophoretic light scattering (ELS)—*ZP*: a technique based on measuring the velocity of dispersion particles moving in an electric field generated during the electrophoresis process [24]. Before the measurements, aqueous solutions of the tested lipid nanoparticle dispersions were prepared, namely, 60 μL of the dispersion was dissolved in 15 mL of distilled water. The measurement procedure was repeated three times for each test sample, and the arithmetic mean and standard deviation were calculated from the obtained results.

2.2. Preparation of Semi-Solid Cosmetic Formulations

The study was performed on four night-type face creams produced by *Dottore Polska Sp. z o.o.*, Poznan, Poland, labeled as follows:

- AAN (anti-aging NANO)—anti-aging night face cream containing lipid nanoparticles loaded with retinol and pentapeptide-18 (10.0 wt.%);
- AAB (anti-aging BASE)—anti-aging night face cream without lipid nanoparticles;
- ACN (anti-acne NANO)—anti-acne night face cream containing lipid nanoparticles loaded with retinol and pentapeptide-18 (5.0 wt.%);
- ACB (anti-acne BASE)—anti-acne night face cream without lipid nanoparticles.

The technology of the production of the above cosmetic bases (AAB and ACB) remains the know-how of the manufacturer (*Dottore Polska Sp. z o.o.*). Briefly, the emulsions are of *o/w* type with 21.2 wt.% of lipid phase and were formed by using a homogenization process. The introduction of lipid nanoparticles into base products (AAB and ACB) consisted of combining the cosmetic base with an appropriate amount of lipid nanoparticle dispersion under continuous stirring. The process continued until the appropriate consistency of cosmetic formulations enriched with lipid carriers (AAN and ACN) was achieved. The

INCI compositions of night face creams investigated are shown below. The ingredients were grouped according to their content in the cosmetic formulation and assigned to one of the following ranges: (A) 50–100 wt.%; (B) 25–50 wt.%; (C) 10–25 wt.%; (D) 5–10 wt.%; (E) 1–5 wt.%; (F) 0.1–1 wt.%; (G) <0.1 wt.%; (H) traces.

AAN (anti-aging NANO)

Ingredients (INCI): Aqua (A), Tripelargonin (D), Glycerin (D), Isopropyl Palmitate (D), Polyglyceryl-3 Dicitrate/Stearate (E), Persea Gratissima Oil (E), Glyceryl Stearate (E), Retinol (F), Pentapeptide-18 (G), Tocopheryl Acetate (F), Xanthan Gum (F), Benzyl Alcohol (F), Benzoic Acid (F), Polysorbate 80 (F), Dehydroacetic Acid (G), Tocopherol (G), Phosphatidylcholine (G), Cetrimonium Bromide (G), Sodium Cholate (G), Sodium Hydroxide (H), Tetrasodium Glutamate Diacetate (G), Parfum (F)

AAB (anti-aging BASE)

Ingredients (INCI): Aqua (A), Tripelargonin (D), Glycerin (D), Isopropyl Palmitate (D), Polyglyceryl-3 Dicitrate/Stearate (E), Persea Gratissima Oil (E), Glyceryl Stearate (E), Tocopheryl Acetate (F), Xanthan Gum (F), Benzyl Alcohol (F), Benzoic Acid (F), Dehydroacetic Acid (G), Tocopherol (G), Sodium Hydroxide (H), Tetrasodium Glutamate Diacetate (G), Parfum (F)

ACN (anti-acne NANO)

Ingredients (INCI): Aqua (A), Citrullus Lanatus Seed Oil (D), Propanediol (E), Citrus Limon Fruit Extract (E), Isopropyl Palmitate (E), Glyceryl Stearate Citrate (E), Cetearyl Alcohol (E), Pentylene Glycol (E), Glyceryl Stearate (E), Squalane (E), Cannabis Sativa Seed Oil (E), Glycerin (E), Sodium PCA (E), Succinoglycan (F), Pentapeptide-18 (G), Retinol (F), Phosphatidylcholine (G), Cetrimonium Bromide (G), Sodium Cholate (G), Polysorbate 80 (F), Cannabidiol (G), Bioflavonoids (G), Raspberry Ketone (F), Tocopherol (G), Helianthus Annuus Seed Oil (F), Potassium Sorbate (G), Tetrasodium Glutamate Diacetate (G), Sodium Hydroxide (H), Trisodium NTA (H), Parfum (F)

ACB (anti-acne BASE)

Ingredients (INCI): Aqua (A), Citrullus Lanatus Seed Oil (D), Propanediol (E), Citrus Limon Fruit Extract (E), Isopropyl Palmitate (E), Glyceryl Stearate Citrate (E), Cetearyl Alcohol (E), Pentylene Glycol (E), Glyceryl Stearate (E), Squalane (E), Cannabis Sativa Seed Oil (E), Glycerin (E), Sodium PCA (E), Succinoglycan (F), Cannabidiol (G), Bioflavonoids (G), Raspberry Ketone (F), Tocopherol (G), Helianthus Annuus Seed Oil (F), Potassium Sorbate (G), Tetrasodium Glutamate Diacetate (G), Sodium Hydroxide (H), Trisodium NTA (H), Parfum (F)

The effectiveness of the production method for the semi-solid cosmetic formulations was verified on a production scale. The stability of both the key raw material (lipid nanoparticle dispersion) and the finished cosmetic products was confirmed. The production method was developed in accordance with all regulatory standards for the concentrations of raw materials used. In addition, the high-speed homogenizer used within the framework of the study is a device commonly found in cosmetic manufacturing companies, which does not generate additional difficulties at the various stages of production of the developed cosmetic products. Furthermore, the method for obtaining lipid nanoparticles was prepared in such a way as not to cause limitations in the production of SLNs with retinol and oligopeptide on a production scale. The effective transfer of production from laboratory scale to industrial scale was a strong point of the implementation PhD under which this research was conducted, and confirmed the translational significance of the study.

2.3. Physicochemical Characterization of Cosmetic Products

2.3.1. pH

The pH (EcoSense® pH 10 pH/Temperature Meter, Pen Style; VWR International, Radnor, PA, USA) of the cosmetic products was tested on the day of their production (week 0, denoted as W0) and after 2 months (week 8, denoted as W8) of storage. The pH test was conducted for samples stored at three temperatures (4, 25, and 45 °C). The measurement

procedure was repeated three times for each test sample, and the arithmetic mean and standard deviation were calculated from the obtained results.

2.3.2. Stability Test

The stability of the cosmetic products was evaluated by the method of multiple light scattering using a Turbiscan Lab Expert analyzer (Formulation, L'Union, France). Measurements were made on day 0 and then repeated on the 7th, 30th, and 60th days for the samples stored at three temperatures (4, 25, and 45 °C). The measurement procedure was repeated three times for each test sample. The results were obtained as the curves illustrating changes in the light backscattering (BS) and the Turbiscan Stability Index (TSI) calculated by the device software.

2.4. The Application Tests

The application tests lasted 8 weeks, and measurements of biophysical parameters of the skin were taken on the day of the start of the tests (W0) and at weeks 4 and 8 (W4 and W8). All volunteers were informed about the nature of the study, signed an informed consent form to participate in the tests, and received written informational materials about the use of the cosmetic products being tested. The participants completed a questionnaire on their health status, possible skin problems, and skin care habits. A detailed cosmetic interview was also conducted. Each measurement was taken after a 15 min acclimatization in the examination room; this was done to equalize skin temperature and regulate sweat secretion in the volunteers, which in turn translated into the accuracy and reliability of the measurement. In the 8th week of the study, all volunteers filled out a subjective questionnaire about the application sensations and effectiveness of the tested products. Any adverse effects were to be reported to the investigator at any stage of the application tests. The *in vivo* study was approved by the Bioethical Commission of Poznan University of Medical Sciences, Poland, on 12 October 2023 (768/23). The Wilcoxon test for pairs of observation results was used for statistical analysis. The level of significance was $p < 0.05$.

2.4.1. Testing Panel

The testing panel consisted of two groups of 20 female volunteers. The selection criteria for the first group (anti-aging, AA), in the 30–65 age range, were signs of skin aging, i.e., wrinkles and loss of skin elasticity and firmness. For the second group (anti-acne, AC), in the 18–65 age range, the criteria were imperfections and skin inflammation, with an emphasis on the acne substrate of the lesions. Each volunteer received two cosmetic products (night face creams) for testing: group AA—cream AAN (anti-aging NANO) and cream AAB (anti-aging BASE); group AC—cream ACN (anti-acne NANO) and cream ACB (anti-acne BASE). The volunteers undertook to apply the tested cosmetic products to cleanse facial skin for the entire duration of the study, once a day, exclusively at night. All participants were informed that they were prohibited from using products with similar or analogous ingredients or actions. Information was also given on the need to avoid sun exposure, including tanning beds, due to the nature of the active substances contained in the tested cosmetic product. The main contraindications to participation in the study, which were pregnancy and lactation, were also mentioned.

2.4.2. Skin Testing Equipment

Evaluation of selected biophysical parameters of the skin was carried out using a set of equipment from Courage + Khazaka electronic GmbH (Cologne, Germany). The equipment, using the technique of non-invasive evaluation of skin parameters, made it possible to observe changes appearing under the influence of active substances (retinol and oligopeptide contained in the lipid nanoparticles) present in the tested cosmetic products. The devices used in the study were:

- Tewameter[®] TM 300 (level of transepidermal water loss, TEWL)

The Tewameter[®] TM 300 allows assessment of the functioning of the epidermal barrier. Transepidermal water escape is a natural process occurring in the epidermis, but changes in the biophysical state of the skin and the application of cosmetic products can modify the parameters of this process. The probe works by measuring the density of water evaporation from the skin, based on the law of diffusion [25]. The lower the level of water evaporation, and thus the lower the measurement result, the better the tightness of the epidermal barrier. The measurement was performed by applying the probe vertically to the skin surface of the forehead and cheek, on the left and right sides of the face. Twenty measurements were taken on each area of the volunteers' facial skin. The arithmetic mean was calculated from the values obtained. Measurements were taken on the day of the start of the study (W0) and after 4 and 8 weeks of application of the tested cosmetic products (W4 and W8).

- Corneometer[®] CM 825 (skin hydration level)

The Corneometer[®] CM 825 is a probe that determines the moisture level of the skin. The measurement is based on the physical electrical conductivity of the tissues and the electrical resistance they generate. Due to the large amount of water in the epidermal cells, and thus due to proper skin hydration, the electrical resistance decreases, while the electrical conductivity increases. Thus, the higher the measurement, the better the hydration of the skin [26]. The results were collected in volunteers from the left and right facial areas of the forehead and cheek by vertically applying the probe to the skin surface. The test was conducted at W0, W4, and W8, where three measurements were taken each time, from which the arithmetic mean was calculated.

- Cutometer[®] MPA 580 (skin elasticity)

The Cutometer[®] MPA 580 is a device used to measure the viscoelastic properties of the skin. The probe measures the elasticity and firmness of the upper layer of the skin using negative pressure. The suction method causes mechanical deformation of the skin. Its resistance to vacuum determines firmness, while its ability to return to its original shape indicates elasticity. This method makes it possible to objectively assess the aging process of the skin and to generally characterize the elasticity and mechanical properties of the epidermal surface [27]. The general elasticity factor (R2) was determined before cosmetic product application (W0) and after 8 weeks (W8), using a Cutometer[®] that was applied to the facial surface without additional pressure. This allowed the skin to be sucked into the opening, where a vacuum was generated. During each measurement session, three measurements were taken on each test area of the skin. The arithmetic mean was calculated from the results obtained.

- Sebumeter[®] SM 815 (amount of sebum secreted by the skin's sebaceous glands)

Sebum secretion is a natural physiological process of the skin. The Sebumeter[®] SM 815 measures the amount of sebum secreted on the epidermal surface. Sebum from the surface of the skin is collected using a special tape that becomes transparent under the influence of sebum. The tape is placed in a designated hole in the base of the MPA device, where a beam of light, transmitted through the section of tape being tested, allows the level of its saturation to be read [28]. The study was conducted on a group of volunteers using anti-acne products (ACN and ACB). The tape was applied at four locations of skin: on the left and right cheek, and on the left and right sides of the forehead at a height of about 1 cm above the upper eyebrow arch. Sebumeter[®] measurements were taken on the day the study began (W0) and at W4 and W8.

- Visioline[®] VL 650 (skin macrorelief parameters: total wrinkle area [mm²]; percentage of wrinkle area [%]; mean length [mm] and maximum depth of wrinkles [μm])

Skin macrorelief parameters were determined on the basis of images of silicone replicas taken on the skin areas under study. The Visioline[®] VL 650 works on the principle of profilometry: a light beam falls on the replica at an angle of 35° and makes visible the

elevations of the replica, which represent the wrinkles of the skin. The measurable shadows are digitized by the camera and processed using software [29]. Silicone skin replicas were made on the skin of volunteers (forehead and cheeks on both sides of the face) using anti-aging creams (AAN and AAB) on the day the tests began (W0) and after 8 weeks (W).

3. Results and Discussion

3.1. Lipid Nanoparticles Loaded with Retinol and Pentapeptide-18—Physicochemical Characterization

The desire to introduce lipid nanoparticles as a cosmetic raw material in the production of cosmetic preparations on an industrial scale is an important aspect when planning and optimizing the composition of designed lipid nanocarriers. The stability of nanoparticle dispersion significantly affects the effectiveness of the incorporated active substances [18]. Moreover, the presence of the incorporated active compounds positively affects the stability of the dispersion itself. The selection of individual dispersion components depends on the nature of the incorporated active substance. On the other hand, the wrong concentration of lipids (both solid and liquid) and surfactants can affect the overall internal structure of the lipid nanoparticles [15]. Proper selection of physicochemical parameters for lipid nanoparticle dispersion can also help predict SLNs' behavior in *in vivo* studies [15]. When lipid nanocarriers are introduced into cosmetic formulations, it is necessary to maintain dispersion stability for a minimum of four weeks [30]. For the prepared dispersion of solid lipid nanoparticles containing oligopeptide and retinol, the following values of physicochemical parameters were obtained: Z-Ave = 156.5 ± 0.8 nm; PDI = 0.284 ± 0.002 ; and ZP = 45.6 ± 0.2 mV. The long-term stability of the lipid nanoparticles was tested by storing the dispersion samples at three temperatures (4 °C, 25 °C, and 45 °C) for one month. After four weeks, the following results were obtained: at 4 °C: Z-Ave = 248.3 ± 7.4 nm; PDI = 0.445 ± 0.022 ; ZP = 43.8 ± 0.3 mV; at 25 °C: Z-Ave = 134.7 ± 0.3 nm; PDI = 0.269 ± 0.017 ; ZP = 42.7 ± 1.2 mV; at 45 °C: Z-Ave = 231.1 ± 1.4 nm; PDI = 0.464 ± 0.006 ; and ZP = 44.5 ± 1.6 mV. The purpose of the stability study was to determine the recommended storage temperature for the tested lipid nanoparticles. The most favorable results, i.e., the smallest fluctuations in the values of the determined physicochemical parameters, were obtained for the dispersion stored at room temperature (25 °C). Thus, it was recommended for storing the investigated dispersions. Nevertheless, even at more demanding storage temperatures (4 and 45 °C), the Z-Ave value of 300 nm, indicative of stable dispersion, in this case was not exceeded. The presented results confirmed the stability of the investigated lipid nanoparticles over time, subjected to different temperature conditions, and thus the correct selection of the components of the designed dispersion of solid lipid nanoparticles intended for use as a cosmetic raw material.

3.2. Cosmetic Products Enriched with Lipid Nanoparticles—Physicochemical Characterization

3.2.1. pH Test

The initial pH values of the cosmetic products tested (W0) were 5.68 ± 0.03 and 5.92 ± 0.02 (for anti-aging formulations, AAN and AAB, respectively); 5.48 ± 0.03 and 5.50 ± 0.01 (for anti-acne formulations, ACN and ACB, respectively) (Figure 2). It can be concluded that the addition of lipid nanoparticle dispersion caused a decrease in the pH values of the tested face creams. This decrease was more noticeable in the case of anti-aging preparations. After 8 weeks of storage (W8), it was observed that for all samples stored at 4 °C, regardless of composition and the presence of SLNs, the pH value increased slightly. For AAN and AAB, the pH was 6.13 ± 0.01 and 5.95 ± 0.02 (an increase of 8% and 1%, respectively), while for ACN and ACB, it was 5.70 ± 0.02 and 5.65 ± 0.04 (an increase of 4% and 3%, respectively). At 25 °C, there were slight fluctuations in the value of the parameter, at an average level of 0.4%. In contrast, at 45 °C, the pH value decreased noticeably. For the AAN and AAB samples, the pH dropped by 0.32 to 5.36 ± 0.03 and 5.60 ± 0.04 (a decrease of 6% and 5%, respectively). As for ACN and ACB formulations, on the other hand, the pH value decreased by 0.27 and 0.21, or 5% and 3%, respectively.

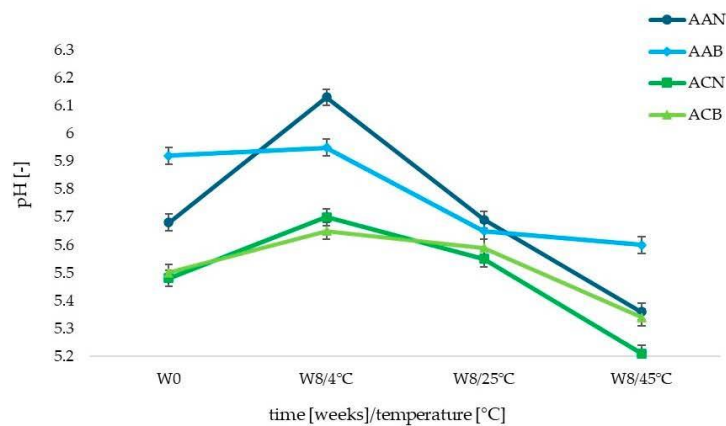


Figure 2. Changes in pH of the cosmetic formulations stored under various temperature conditions (4, 25, 45 °C) for 60 days.

Based on the analysis of the pH results and the trend of changes in the value of this parameter over time, it was concluded that the presence of lipid nanoparticles does not affect the nature of changes in the pH values of the tested cosmetic formulations. It is also important that active substances such as retinol [31] and peptides are not sensitive to such slight fluctuations in the pH of the cosmetic base, which do not affect the active action of these compounds. It was determined that changes in the pH values of the tested cosmetic formulations were not noticeable enough to affect the processes in the skin and on its surface.

3.2.2. Stability Study by Multiple Light Scattering

The stability of cosmetic products sustained over time and under varying storage temperatures was a basic requirement when testing designed cosmetics enriched with lipid nanoparticles containing retinol and oligopeptide. When evaluating the stability of the tested formulations, the focus was on assessing the level of backscattering (ΔBS) and the Turbiscan Stability Index, TSI, which expresses the total value of all instabilities in the sample [31–33]. The use of the multiple light scattering method made it possible to quickly and accurately detect destabilizing phenomena, which are invisible to the naked eye, in the non-transparent and undiluted dispersion system [34].

The study successfully used the TSI to characterize the instability of the samples. The lower the TSI, the more stable the cosmetic formulation [31,35]. The results of the analysis for two face creams from the AA group (Figure 3a,b) allowed us to conclude that both cosmetic products—both the cream containing lipid nanoparticles (AAN) and the base itself (AAB)—were stable after 60 days at reduced temperature (4 °C) and at 25 °C. The corresponding TSI values did not exceed 2. The TSI value increased only above day 30 for the AAN sample stored at elevated temperature, where an increase in the parameter value was observed from 1.75 (day 30) to 7.55 (day 60). Meanwhile, in the case of the pure cosmetic base (AAB), an increase in TSI value was noted as early as 7 days into the test; the TSI then reached 0.61, before rising to 5.61 after 30 days and to 9.09 after 60 days of the stability test.

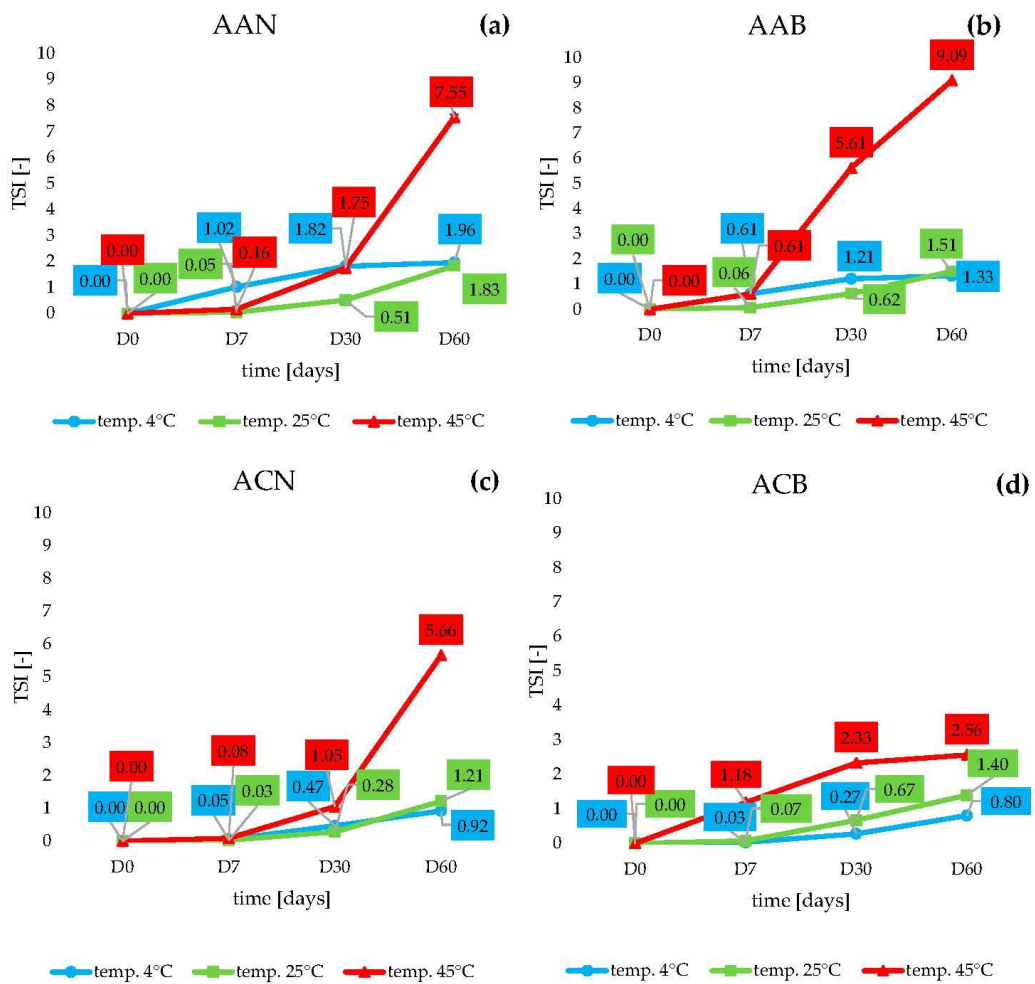


Figure 3. Changes in the Turbiscan Stability Index of the cosmetic formulations ((a) AAN; (b) AAB; (c) ACN; (d) ACB) stored under various temperature conditions (4, 25, 45 °C) for 60 days.

In the case of variants of the second tested cosmetic formulation (anti-acne)—ACN (Figure 3c) and ACB (Figure 3d)—the Turbiscan Stability Index did not exceed the value of 1.5 in samples stored for 60 days at 4 °C and 25 °C. A low and acceptable TSI value was also shown by the ACB sample stored at 45 °C; after 60 days, the parameter did not exceed the value of 3. This result testified to the absence of instability-like phenomena [36]. An increase in TSI value was noted only in the ACN formulation between the 30th and 60th days of storage at 45 °C, where an increase from 1.0 to 5.7 was achieved. Nevertheless, it should be remembered that 45 °C is an extreme temperature for cosmetic product samples, and despite the values obtained for the TSI, no instability, such as creaming or sedimentation, visible to the naked eye, appeared in the samples.

For each sample, the results were also obtained in the form of a stability profile, where the abscissa axis presents the height of the measurement cell, while the ordinate axis shows the intensity of the backscattering light (Δ BS) [14,31,32]. The least favorable Δ BS results were obtained for samples of cosmetic preparations stored at an elevated temperature of 45 °C. The obtained results undoubtedly corresponded to the TSI results described above. The profiles of intensity of the backscattering light indicated the instabilities presented in the upper part of the samples. Examples of Δ BS plots for ACN (Figure 4) and ACB (Figure 5) exposed to 45 °C are shown below. In the case of ACN, the decrease in light intensity at the top of the cell on day 30 may have been the result of changes occurring on the walls of the vessel, where the glass was soiled with the sample during meniscus equilibration on day 0. The thin layer of product that remained on the walls of the cell dried out under the increased temperature and, thus, became apparent on the graphs in the form of a significant decrease in Δ BS intensity. A similar situation was observed for the ACB sample (Figure 5), but the changes in the upper part of the sample were not as intense and noticeable (a decrease in intensity of about 4%).

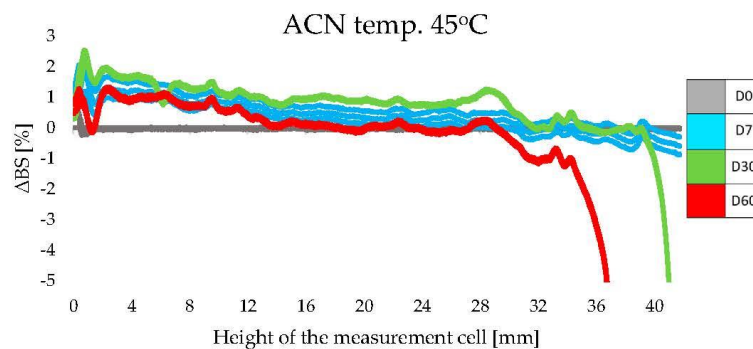


Figure 4. Changes in intensity of the backscattering light for ACN stored at 45 °C for 60 days.

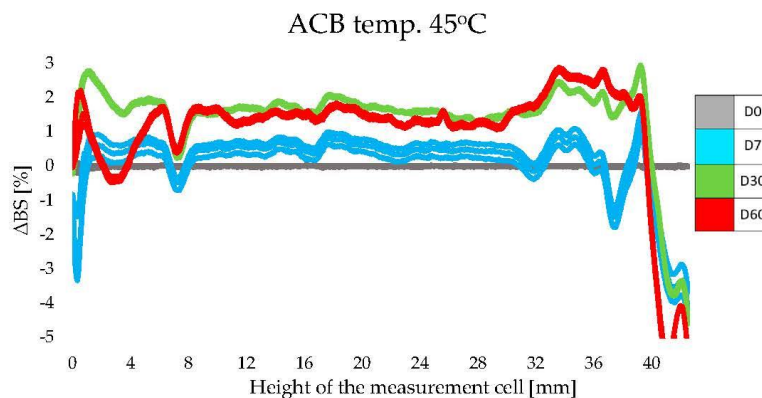


Figure 5. Changes in intensity of the backscattering light for ACB stored at 45 °C for 60 days.

Qi's research group claims that particle migration can destabilize the entire system [37]. It is noteworthy, however, that for both samples (ACN and ACB) there was a comparable change in the intensity of backscattered light throughout the sample volume. Significant differences appeared only on the higher parts of the measurement cell. Based on the Δ BS

profiles, one can infer the gradually appearing instability of the ACN and ACB formulations. Nevertheless, these values are within the acceptable limit of 10%, which is considered the limit for stable formulations [38].

Based on a comparison of the Δ BS plot for the AAN stored at 25 °C (Figure 6) and the Δ BS profile for AAB stored at 4 °C (Figure 7), the assumed storage temperature conditions were considered as recommended, and the mentioned cosmetic formulations were determined to be stable. In both cases, comparable changes in the intensity of backscattered light were observed throughout the sample volume. No changes related to the migration of sample particles toward the top or bottom of the measurement cell were noted. The maximum Δ BS values in the AAN and AAB samples were -2.2% and -1.0% , respectively. These results were compatible with TSI results for analogous samples. The data obtained confirm the stability of the formulations under varying temperature conditions over a period of 60 days. This allowed the tested cosmetic formulations to be approved for further testing.

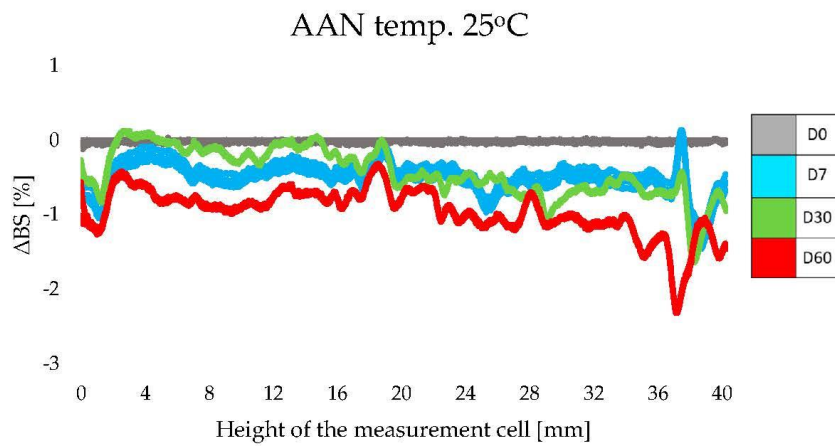


Figure 6. Changes in intensity of the backscattering light for AAN stored at 25 °C for 60 days.

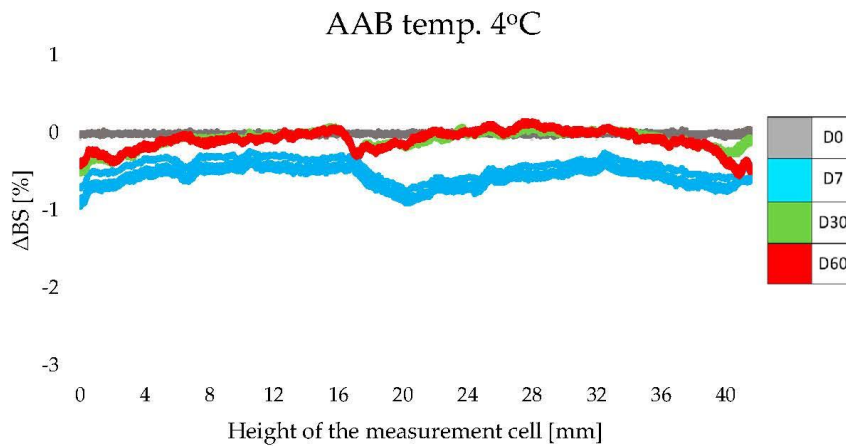


Figure 7. Changes in intensity of the backscattering light for AAB stored at 4 °C for 60 days.

3.3. Cosmetic Products Enriched with Lipid Nanoparticles—Efficacy Testing (In Vivo Tests)

The final stage in the evaluation of the effectiveness of the designed cosmetic formulations and their effect on skin parameters was an in vivo study conducted using non-invasive methods to confirm the claimed properties of the tested cosmetic products. Analysis of the results of the application tests allowed an objective assessment of changes in selected skin parameters, occurring under the influence of the applied cosmetic preparations.

3.3.1. Skin Hydration and Transepidermal Water Loss Measurement

One of the main functions of the epidermis is to maintain proper levels of skin hydration. Effectively ensuring the barrier properties of the epidermis is important because proper hydration affects the healthy appearance of the skin and determines the course of most of the biochemical processes occurring in it [39]. According to Adamski and Kaszuba [23], a too-low water content in the epidermis (less than 10%) causes cracking, roughness, and scaling of the skin. Transepidermal water loss is a natural process that occurs within the structures of the skin. Temperature and humidity can affect the rate at which water evaporates from deeper parts of the skin through the epidermal layer to the external environment [40]. According to Gardien, TEWL is the most relevant physiological parameter of the skin to assess the functionality of the epidermal barrier. It should be mentioned here that repeated and regular application of a cosmetic product containing appropriately selected active substances can have a significant impact on the functioning of the skin barrier [41].

The AAN cream (anti-aging group), containing 10% SLNs incorporated with retinol and oligopeptide, showed stronger moisturizing properties compared to the anti-aging base (AAB cream), which did not contain nanoparticles with active substances (Figure 8a). After 4 weeks (W4) of using the AAN formulation, skin hydration increased compared to the baseline result (W0), by 11% in the cheek area and by 9% in the forehead area ($p < 0.05$). After another 4 weeks of the study (W8), hydration levels decreased slightly, but the values were higher compared to week 0, at +9% for the cheek and +7%, considering the volunteers' forehead area ($p < 0.05$). In comparison, in the case of AAB cream, after 4 weeks (W4), there was a 3% decrease in hydration in the cheek area compared to baseline results and a 4% increase in the forehead area ($p < 0.05$). Results obtained at week 8 of the study (W8) indicated only a 3% increase in hydration for both tested application areas ($p < 0.05$). Turning to changes in the value of the TEWL parameter (Figure 8b), the 4-week application (W4) of the AAN cream did not cause statistically significant changes in the value of this parameter. However, significant changes were observed in the 8th week of the study (W8), when TEWL levels increased by 7% (cheek) and 3% (forehead) ($p < 0.05$). Meanwhile, application of the AAB formulation resulted in a reduction in TEWL values of 7% on the cheek and 2% on the forehead at week 4 of the study (W4), and 8% in the cheek area at 8 weeks after the start of application tests (W8) ($p < 0.05$). Changes in TEWL on the forehead skin area were considered statistically insignificant compared to the baseline.

The increase in epidermal hydration and constant TEWL levels in the first stage of the study, i.e., after 4 weeks, indicated the moisturizing properties of the AAN cream. The presence of lipid nanoparticles in the composition of the cosmetic product increased hydration in the lower layers of the epidermis while maintaining the skin's barrier function. This relationship is due to the ability of lipid nanoparticles to regenerate the outer layers of the skin by building lipid compounds into the intercellular matrix of the stratum corneum [30]. A difference was observed in the level of hydration resulting from the application of AAN and AAB formulation. The changes noted after 8 weeks, namely, a decrease in hydration and a slight increase in transepidermal water loss, were due to the presence of retinol in the AAN cream. Retinol acts as a keratolytic agent: it loosens the bonds between keratinocytes, causing accelerated desquamation of the epidermis and disruption of epidermal continuity [8]. The inclusion of retinol into the lipid matrix of SLNs influenced its prolonged release from the cosmetic base, and thus delayed active action on the skin; hence the conclusion that the decrease in hydration levels observed after a further four weeks of retinol contact

with the skin, along with a concomitant increase in TEWL values, may have been the result of the described process. Nevertheless, despite the increase in TEWL values, the skin's hydration level remained at an optimal level, and its value was even higher than before the start of the study.

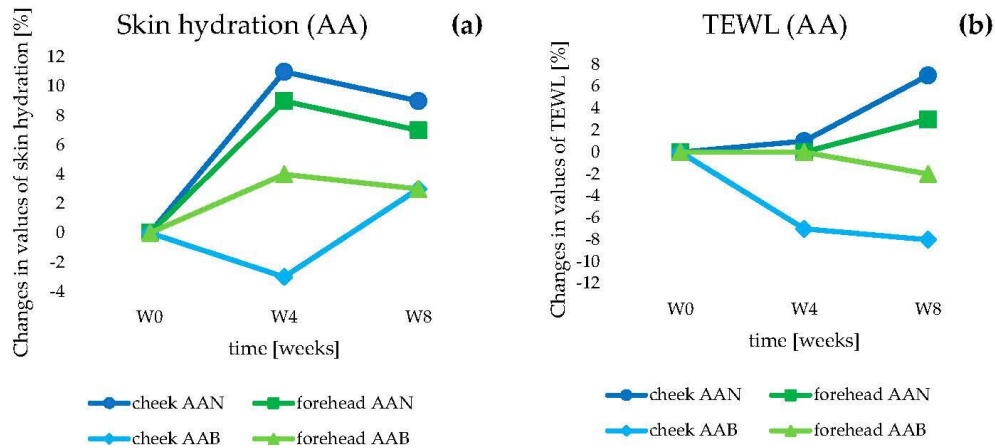


Figure 8. Changes in skin hydration (a) and transepidermal water loss (b) determined for the anti-aging (AA) cosmetic formulations during in vivo studies.

Using the second group of cosmetic products tested (anti-acne)—the ACN preparation with 5% SLNs containing retinol and oligopeptide—we observed an increase in skin hydration in the first 4 weeks of the study (W4), which amounted to 1% in the cheek area and 7% on the forehead (with respect to baseline values, W0) ($p < 0.05$) (Figure 9a). In contrast, after 8 weeks of application of the cream (W8), the values reached +3% for both tested areas ($p < 0.05$). In comparison, the results recorded for the ACB cream (base without SLNs) were a 3% increase in hydration on the cheek and a 6% increase on the forehead in the 4th week of testing (W4) ($p < 0.05$). After another 4 weeks of ACB application (W8), hydration levels returned almost to baseline values, and the changes were considered statistically insignificant. Considering the TEWL parameters (Figure 9b), for the ACN cream, a decrease in the values of the parameter on both the cheek and forehead was noted, by 8% and 6%, respectively (in week 4, W4) ($p < 0.05$), and a final 2% for both tested areas in the 8th week of application tests (W8) compared to the baseline parameters collected on the day of the start of the study (W0) ($p < 0.05$). In the case of the ACB formulation, we can observe a reduction in TEWL values compared to baseline parameters of 12% in the cheek area ($p < 0.05$), and in the case of the forehead, statistically insignificant changes were noted (W4). Continued use of ACB cream exacerbated the decline in TEWL values, eventually reaching 8% on the cheek at the study's closing date (W8) ($p < 0.05$), while changes in the forehead area remained insignificant.

Results obtained after 4 weeks of application of AC cosmetics showed an increase in hydration with a decrease in TEWL, which was due to the presence of SLNs and their previously mentioned occlusive properties. The deterioration in parameters noted at the end of the study was related, as with the AA group products, to the presence of retinol. Importantly, the concentration of retinol in ACN was half that of AAN, which had a significant impact on the keratolytic process and thus on skin hydration levels. Therefore, fluctuations in hydration caused by the desquamation process were much less noticeable, and, importantly, skin parameters did not deteriorate in any case.

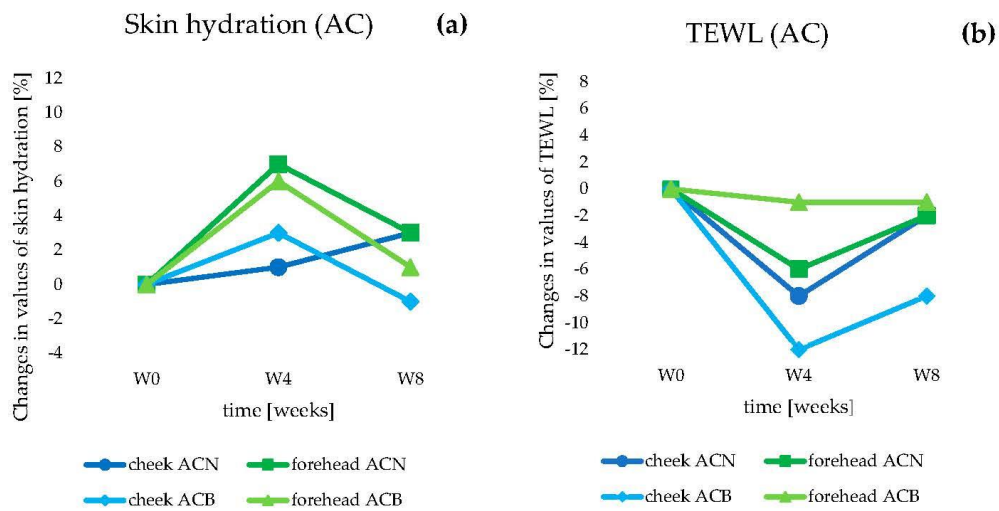


Figure 9. Changes in skin hydration (a) and transepidermal water loss (b) determined for the anti-acne (AC) cosmetic formulations during in vivo studies.

3.3.2. Skin Elasticity Measurement

Determination of biomechanical parameters of the skin, including the overall elasticity (dimensionless coefficient R2), made it possible to assess the “anti-aging” effectiveness of AA cosmetic products. In general, the higher the value of the R2 coefficient and the closer it approaches unity (1), the more elastic and firmer the skin. Turning to the results, the 8-week application of the AAN cream resulted in an increase in R2 from a value of 0.898 ± 0.032 (W0) to 0.915 ± 0.047 (W8) ($p < 0.05$); thus, an improvement in skin elasticity of about 2% was noted (Figure 10). In comparison, for the AAB preparation (without SLNs), the initial results (W0) averaged 0.904 ± 0.024 , while the reading on the final day of the study was 0.895 ± 0.038 (W8), making this change in skin elasticity statistically insignificant.

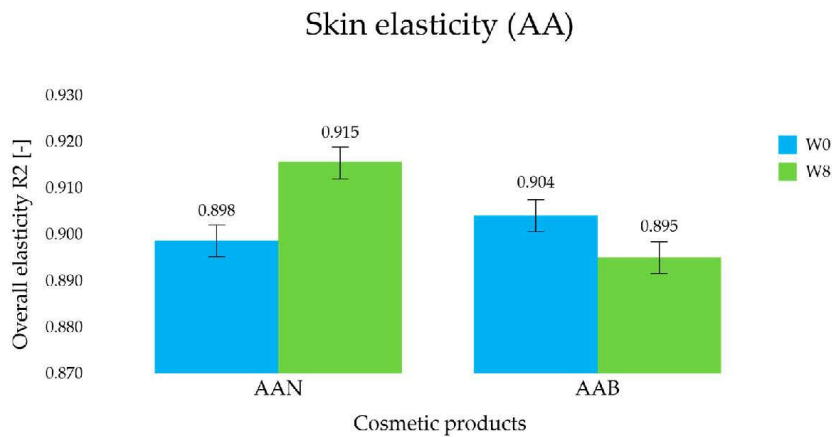


Figure 10. Changes in skin elasticity determined for the anti-aging (AA) cosmetic formulations during in vivo studies.

It was concluded that the use of the AAN cosmetic product for 8 weeks improved the elasticity and firmness of the treated skin. The additive effect of retinol and oligopeptide resulted in improved skin density and elasticity. This could be due to the action of these active substances on skin structures through beneficial effects on collagen and elastin synthesis [8].

3.3.3. Sebum Level Measurement

Cosmetic products from the AC group, due to the presence of active ingredients intended for oily and combination skins, were also tested with the Sebumeter®. Due to the nature of the physiological process of sebum secretion by the sebaceous glands, the subjects were required to clean their faces a minimum of one hour before the test and not to apply other emulsion products that could interfere with the reliability of the measurements. According to the principle of measuring the level of sebum secretion, the closer the result obtained is to 0, the greater the skin's seboregulatory activity [28].

During the 8-week use of the ACN and ACB preparation, a significant improvement in the reduction in sebum production was noted in all areas tested (cheek and forehead skin) (Figure 11). The decrease in sebum secretion was noticeable already after 4 weeks of study (W4), especially when the product containing lipid nanoparticles (ACN) was applied to the forehead area of the volunteers. The amount of sebum secreted was then 18% lower than at the start of the study (W0) ($p < 0.05$). This condition continued throughout the rest of the study period, as the final result (W8) was a 19% reduction in sebum in this area ($p < 0.05$). A significant improvement was also observed on the cheek: the use of ACN in the first 4 weeks (W4) reduced the value of the seboregulation-related parameter by 5%, and after 8 weeks (W8), by up to 14% ($p < 0.05$). This parameter was also improved slightly under the application of ACB cream. However, in this case, the reduction reached 9% and 6% in the cheek and forehead areas, respectively (W8) ($p < 0.05$).

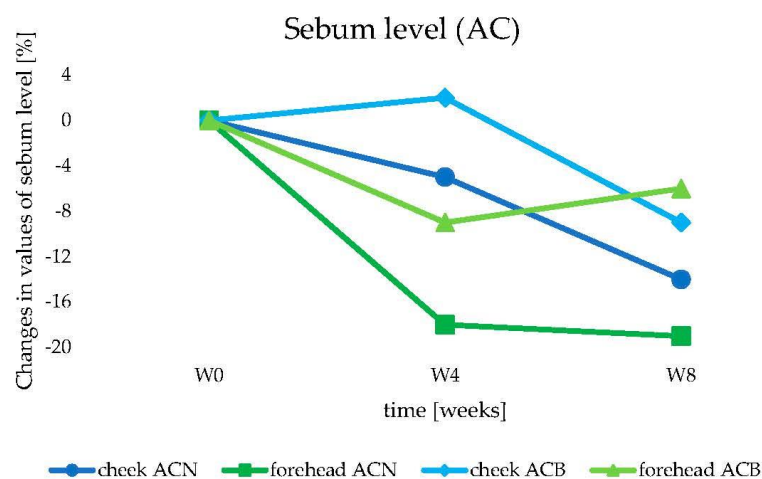


Figure 11. Changes in sebum level determined for the anti-acne (AC) cosmetic formulations during in vivo studies.

Analysis of the obtained results allowed us to conclude that the formulation of creams from the AC group was adapted to the care of skin with the need to regulate the sebaceous glands and thus the amount of sebum secretion. The choice of texture-forming raw materials additionally supported the action of the active substances retinol and peptide and thus caused an additive effect. After the 8-week study, the decrease in sebum production was more pronounced for the ACN preparation compared to ACB cream; however, the ACB

cosmetic also showed a noticeable sebostatic effect. Hence, the conclusion was that even the cosmetic base itself (ACB) devoid of lipid nanoparticles was properly selected for this type of skin with a wide range of problems. The difference in the results obtained for ACN and ACB creams indicated the importance and effectiveness of the active ingredients with which the designed lipid carriers were incorporated. For volunteers with oily and combination skin affected by acne lesions, excess sebum, or local inflammation, AC cosmetic products showed good efficacy. With long-term use, they brought real benefits, reducing both sebum overproduction and skin inflammation.

3.3.4. Skin Macrorelief Parameters

Analysis of the skin macrorelief using profilometric methods made it possible to assess the skin surface in terms of the presence, number, and depth of wrinkles. The study assumed that a decrease in the values of the aforementioned parameters would indicate a reduction in the number and size of wrinkles, thus confirming the anti-wrinkle effect of the tested cosmetic products (from the AA group).

The cosmetic product AAN, thanks to the content of retinol and oligopeptide, with which lipid nanoparticles were incorporated, caused a decrease in the number of wrinkles, by 29% in the forehead area and 18% in the eye area ($p < 0.05$), and thus in the percentage of wrinkles in the tested skin area (W8) (Figure 12). In comparison, the results obtained in this regard for the AAB preparation were -6% in the case of the forehead and -9% in the eye area ($p < 0.05$). The difference in the reduction in the average length and maximum depth of wrinkles was also significant. Over the course of 8 weeks (W8), the average length of lines in the tested area, compared to the baseline (W0), was reduced by AAN by 16% on the skin near the eyes and by 11% on the forehead ($p < 0.05$), while the AAB cream caused a reduction in wrinkles of 7% and 8%, respectively ($p < 0.05$). The anti-aging effectiveness of the tested cosmetics was also confirmed by the parameter of maximum wrinkle depth. Under the influence of AAN, its value over 8 weeks was reduced by 8% on the forehead and by 3% in the eye area ($p < 0.05$), while for the AAB product, the changes obtained were not statistically significant.

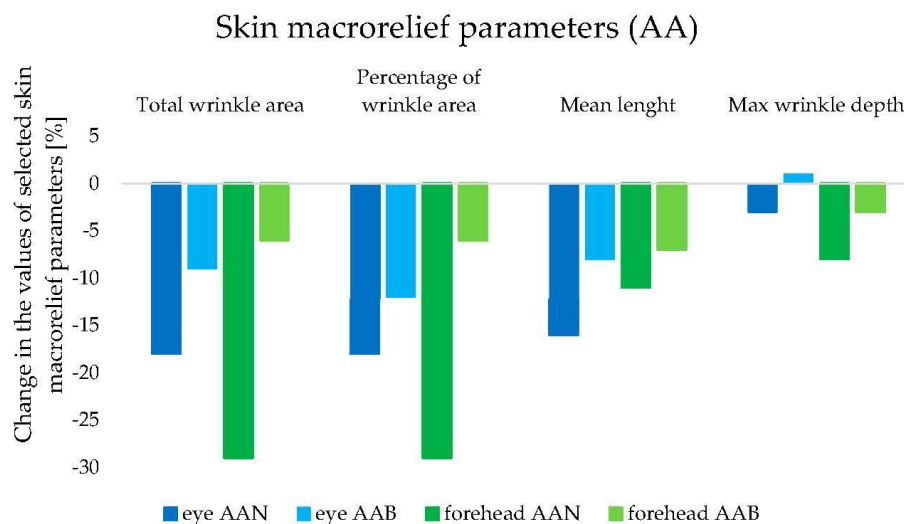


Figure 12. Changes in skin macrorelief parameters determined for the anti-aging (AA) cosmetic formulations (forehead and eye area) during in vivo studies (8 weeks).

Taking into account all parameters of the skin macrorelief, a significant improvement in the condition and overall appearance of the skin was undeniably noticeable, and thus the anti-wrinkle and anti-aging properties of the cosmetic product containing lipid nanoparticles were confirmed.

4. Conclusions

Retinol and an oligopeptide (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu) were tested to verify their effectiveness as active ingredients in cosmetic formulations. The introduction of these compounds in the form of lipid nanoparticles ensured the acquisition of stable semi-solid formulations characterized by a prolonged effect on the skin over time. It was proven that despite the keratolytic nature of retinol, the tested cosmetic preparations showed properties that maintained an adequate level of epidermal hydration. The presence of lipid nanoparticles positively influenced the barrier function of the skin, thanks to the occlusive properties of SLN, and reduced the undesirable effects of retinol, appearing during the use of retinol in its classic form. The anti-aging effect of a cosmetic product from the AA group was confirmed: the use of AAN cream resulted in a significant improvement in skin elasticity, improving the overall condition of the skin. These properties were attributed to the peptide content in the formulation. The anti-aging effect was also noted during the analysis of the results of the skin macrorelief parameters. The reduction in the number of wrinkles and the reduction in their length and depth over 8 weeks of application of the AAN formulation undoubtedly indicated the effective action of the cosmetic product. The synergistic effect of oligopeptide and retinol was proven for the anti-acne (AC) product; a significant seboregulatory function of the active substances contained in this formulation and their anti-acne effect were observed. The conducted research confirmed the effectiveness of the tested cosmetic products while adhering to the assumptions of the current trend of “skin minimalism”. Measurable effects (in vivo study) of the developed semi-solid preparation enriched with solid lipid nanoparticles were achieved while using the lowest effective concentrations of active ingredients (retinol and oligopeptide) in the cosmetic formulation.

Author Contributions: Conceptualization, M.P., M.M. and I.N.; methodology, M.P. and M.M.; validation, M.M.; formal analysis, M.P. and M.M.; investigation, M.P. and M.M.; resources, I.N.; writing—original draft preparation, M.P. and M.M.; writing—review and editing, M.P., M.M. and I.N.; supervision, W.J. and I.N.; funding acquisition, I.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partially funded by the Ministry of Science and Higher Education, the fourth edition of the Minister’s program entitled ‘Implementation PhD’, grant no. DWD/4/33/2020.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Bioethical Commission of Poznan University of Medical Sciences (768/23, 12 October 2023).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available by authors upon request. The general procedure of the emulsions’ formation is only available to non-professionals.

Acknowledgments: The authors would like to thank IOI Oleo GmbH (Hamburg, Germany) for providing free samples of the lipid (Imwitor® 900 K) used in the production of lipid nanoparticles.

Conflicts of Interest: Authors Małgorzata Pawłowska and Waldemar Jankowiak were employed by the company Dotore Polska Sp. z o.o. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Charoenputtakhun, P.; Opanasopit, P.; Rojanarata, T.; Ngawhirunpat, T. All-trans retinoic acid-loaded lipid nanoparticles as a transdermal drug delivery carrier. *Pharm. Dev. Technol.* **2014**, *19*, 164–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yadav, N.; Khatak, S.; Vir, U.; Sara, S. Solid lipid nanoparticles—A review. *Int. J. Appl. Pharm.* **2013**, *5*, 8–18.
- Resende, D.I.; Ferreira, M.S.; Sousa-Lobo, J.M.; Sousa, E.; Almeida, I.F. Usage of synthetic peptides in cosmetics for sensitive skin. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Janiszewska, J. Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe w zastosowaniach biomedycznych. *Polimery* **2014**, *59*, 699–707. [[CrossRef](#)]
- Olejnik, A.; Nowak, I.; Schroeder, G. Peptydy jako nowe syntetyczne składniki preparatów kosmetycznych. In *Receptory molekularne—Właściwości i Zastosowanie*; Cursiva: Kostrzyn, Poland, 2009; pp. 105–122.
- Lipotec®. 'Leuphasyl®'; Lipotec®: Barcelona, Spain, 2020; pp. 1–15.
- Errante, F.; Ledwoń, P.; Latajka, R.; Rovero, P.; Papini, A.M. Cosmeceutical Peptides in the Framework of Sustainable Wellness Economy. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 572923. [[CrossRef](#)]
- Pawłowska, M.; Marzec, M.; Nowak, I.; Jankowiak, W. Retinoids. Chemical diversity for health and beauty. *Przem. Chem.* **2023**, *1*, 78–88. [[CrossRef](#)]
- Bojarowicz, H.; Płowiec, A. Wpływ witaminy A na kondycję skóry. *Probl. Hig. Epidemiol.* **2010**, *91*, 352–356.
- Marona, H.; Gumia, A.; Pękala, E. Retinoidy—Rola w farmakoterapii w aspekcie komórkowego mechanizmu działania. *Farm. Pol.* **2010**, *66*, 187–192.
- Tratnjek, L.; Jeruc, J.; Romih, R.; Zupančič, D. Vitamin A and retinoids in bladder cancer chemoprevention and treatment: A narrative review of current evidence, challenges and future prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3510. [[CrossRef](#)]
- Baumann, L. *Cosmetic Dermatology*, 2nd ed.; McGraw-Hill Education/Medical: Chicago, IL, USA, 2009; pp. 256–262.
- Wissing, S.A.; Müller, R.H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.* **2003**, *254*, 65–68. [[CrossRef](#)]
- Lasoń, E.; Ogonowski, J. Stałe Nanocząsteczki Lipidowe—Charakterystyka, zastosowanie i otrzymywanie. *Chemik* **2011**, *65*, 960–967.
- Hallan, S.S.; Sguizzato, M.; Esposito, E.; Cortesi, R. Challenges in the physical characterization of lipid nanoparticles. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ferreira, R.; Napoli, J.; Enver, T.; Bernardino, L.; Ferreira, L. Advances and challenges in retinoid delivery systems in regenerative and therapeutic medicine. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Anil, L.; Kannan, K. Microemulsion as drug delivery system for peptides and proteins. *J. Pharm. Sci. Res.* **2018**, *10*, 16–25.
- Almeida, A.J.; Runge, S.; Müller, R.H. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of production parameters. *Int. J. Pharm.* **1997**, *149*, 255–265. [[CrossRef](#)]
- Kołaczek, A. Przegląd metod pielęgnacji skóry dojrzałej. *Kosmetol. Estet.* **2015**, *4*, 541–545.
- Marwicka, J.; Gałuszka, A. Use of vitamin preparations in the skin care process. *Aesthetic Cosmetol. Med.* **2021**, *10*, 181–187. [[CrossRef](#)]
- Bemat, M.; Matysek-Nawrocka, M.; Cioczek, W. Składniki aktywne w kosmetykach przeciwstarzeniowych. *Aesthetic Cosmetol. Med.* **2016**, *5*, 575–579.
- Noszczyk, M. *Kosmetologia Pielęgnacyjna i Lekarska*; PZWL Wydawnictwo Lekarskie: Warsaw, Poland, 2012.
- Adamski, Z.; Kaszuba, A. *Dermatologia dla Kosmetologów*; UM Poznan: Poznan, Poland, 2008.
- ZetaSizer Nano Series, Zetasizer Nano Series User Manual; Zeta Potential Theory; Malvern Instruments Ltd.: Worcestershire, UK, 2004.
- Courage+Khazaka. *Tewameter TM 300*; Manual instruction; Courage+Khazaka: Köln, Germany, 2017.
- Courage+Khazaka. *Corneometer CM 825*; Manual instruction; Courage+Khazaka: Köln, Germany, 2020.
- Courage+Khazaka. *Cutometer MPA 580*; Manual instruction; Courage+Khazaka: Köln, Germany, 2019.
- Courage+Khazaka. *Sebumeter® SM 815*; Manual instruction; Courage+Khazaka: Köln, Germany, 2016.
- Courage+Khazaka. *Visioline VL 650-Quantiride*; Manual instruction; Courage+Khazaka: Köln, Germany, 2016.
- Dąbrowska, M.; Nowak, I. Lipid nanoparticles loaded with selected iridoid glycosides as effective components of hydrogel formulations. *Materials* **2021**, *14*, 4090. [[CrossRef](#)]
- Lee, S.C.; Yuk, H.G.; Lee, D.H.; Lee, K.E.; Hwang, Y.I.; Ludescher, R.D. Stabilization of retinol through incorporation into liposomes. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *35*, 358–363. [[CrossRef](#)]
- Dąbrowska, M.A. *Optymalizacja Właściwości Fizykochemicznych Oraz Aplikacyjnych Formulacji Kosmetycznych Zawierających Wybrane Glikozydy Irydoidowe*; UAM: Poznan, Poland, 2019; p. 167.
- Lab Expert, Turbiscan®—Manual instruction. 2013.
- Gagliardi, A.; Paolino, D.; Costa, N.; Fresta, M.; Cosco, D. Zein- vs PLGA-based nanoparticles containing rutin: A comparative investigation. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *118*, 111538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Luo, M.; Qi, X.; Ren, T.; Huang, Y.; Keller, A.A.; Wang, H.; Wu, B.; Jin, H.; Li, F. Heteroaggregation of CeO₂ and TiO₂ engineered nanoparticles in the aqueous phase: Application of turbiscan stability index and fluorescence excitation-emission matrix (EEM) spectra. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, *533*, 9–19. [[CrossRef](#)]
- Gagliardi, A.; Paolino, D.; Iannone, M.; Palma, E. Sodium deoxycholate-decorated zein nanoparticles for a stable colloidal drug delivery system. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 601–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Qi, X.; Dong, Y.; Wang, H.; Wang, C.; Li, F. Application of Turbiscan in the homoaggregation and heteroaggregation of copper nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, *535*, 96–104. [[CrossRef](#)]
38. Celia, C.; Trapasso, E.; Cosco, D.; Paolino, D.; Fresta, M. Turbiscan Lab[®] Expert analysis of the stability of ethosomes[®] and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2009**, *72*, 155–160. [[CrossRef](#)]
39. Kilpatric-Liverman, L. Mechanisms of Skin Hydration. In *Cosmetic Science and Technology*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2014; pp. 81–92.
40. Machado, M.; Salgado, T.M.; Hadgraft, J.; Lane, M.E. The relationship between transepidermal water loss and skin permeability. *Int. J. Pharm.* **2010**, *384*, 73–77. [[CrossRef](#)]
41. Gardien, K.L.M.; Baas, D.C.; de Vet, H.C.W.; Middelkoop, E. Transepidermal water loss measured with the Tewameter TM300 in burn scars. *Burns* **2016**, *42*, 1455–1462. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



ZAŁĄCZNIKI

DOKUMENTY ZŁOŻONE DO KOMISJI BIOETYCZNEJ

Załącznik 1. Formularz świadomej zgody na udział w badaniu aplikacyjnym.

Załącznik 2. Materiały informacyjne dla probantów biorących udział w badaniu aplikacyjnym.

SPRAWOZDANIA Z BADAŃ APLIKACYJNYCH SUBIEKTYWNYCH

Załącznik 3. Krem z retinolem i peptydem do skóry starzejącej się [AA].

Załącznik 4. Krem z retinolem i peptydem do skóry z trądzikiem i niedoskonałościami [AC].

Załącznik 5. Krem z retinolem i peptydem do pielęgnacji starzejącej się skóry wokół oczu [EYE].

DOKUMENTY ZŁOŻONE DO KOMISJI BIOETYCZNEJ

Załącznik 1.

Załącznik 4

FORMULARZ ŚWIADOMEJ ZGODY NA UDZIAŁ W BADANIU APLIKACYJNYM

Ja, lat
(imię i nazwisko) (wiek)

wyrażam zgodę na udział w badaniu
związanym z testowaniem produktu kosmetycznego z retinolem i peptydem o działaniu
przeciwstarzeniowym i przeciwtrądzikowym.

Oświadczam, że:

- otrzymałam/em pisemną oraz ustną informację na temat celu powyższego badania, czasie trwania oraz sposobie jego przeprowadzenia (w tym moich obowiązków jako probanta),
- zostałam/em poinformowana/y o możliwości wystąpienia niepożądanych odczynów skórnych podczas testowania preparatów kosmetycznych,
- jestem świadoma/y 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/em 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.

.....
miejsowość, data

.....
czytelny podpis

**MATERIAŁY INFORMACYJNE DLA PROBANTÓW BIORĄCYCH UDZIAŁ W BADANIU
APLIKACYJNYM**

CEL BADANIA:

Celem przeprowadzonych testów jest udokumentowanie skuteczności działania i sprawdzenie stanu skóry po aplikacji następujących kosmetyków:

- Krem do twarzy dla skóry starzejącej się.
- Krem do twarzy z problemami trądzikowymi.
- Krem pod oczy dla skóry starzejącej się.

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: korneometrem, sebumetrem, tewametrem, kutometrem oraz Visioscanem i Visiolinem. Probant poproszony zostanie o wypełnienie kwestionariusza dotyczącego, m.in. jego nawyków pielęgnacyjnych, problemów skórnych oraz ogólnego stanu zdrowia.

INSTRUKCJA TESTOWANIA KREMU Z WITAMINĄ A

1. Krem należy stosować **tylko na noc**. Krem można stosować w okresie jesień - wiosna.
2. Aplikować **krem na twarz** na wcześniej oczyszczoną twarz, nakładając równomierną warstwę z pominięciem okolicy oczu. W przypadku **kremu pod oczy** aplikować na dolną i górną powiekę z zachowaniem odstępów aby krem nie dostał się do worka spojówkowego.
3. Krem należy stosować co wieczór przez 8 tygodni. W przypadku zakończenia testowania przed wyznaczonym terminem zanotować datę i przyczynę w odpowiednim punkcie ankiety.
4. U osób z wrażliwą skórą po aplikacji kremu możliwe jest delikatne podrażnienie. Jest to objaw charakterystyczny związany z aktywnym działaniem preparatu.
5. W przypadku wystąpienia dużego podrażnienia lub reakcji alergicznej należy zanotować ten fakt w odpowiednim punkcie ankiety, a także niezwłocznie zgłosić się do osoby prowadzącej badania.
6. W przypadku skór wrażliwych lub wystąpienia delikatnego podrażnienia powodującego dyskomfort stosować krem co drugi wieczór. Z chwilą przyzwyczajenia się skóry do aplikacji wrócić do systemu codziennego.
7. Nie należy stosować kosmetyków ani innych preparatów o podobnym działaniu.
8. W okresie stosowania kremu nie używać samoopalaczy oraz unikać ekspozycji słonecznej także solarium.
9. W trakcie trwania badań aplikacyjnych, przeprowadzona zostanie **ocena kondycji skóry** z użyciem ww. aparatury w dniu rozpoczęcia badania (0) oraz po 4 i 8 tygodniach. Spotkania odbywać się będą w terminach dogodnych dla probanta, ustalonych w porozumieniu z osobą przeprowadzającą badania.
10. Po zakończeniu badań, przeprowadzone zostanie badanie ankietowe (załącznik 3), dotyczące subiektywnej oceny testowanych kosmetyków oraz końcowa ocena stanu skóry z wykorzystaniem aparatury pomiarowej.
11. Podczas trwania badania probant zobowiązany jest do:

- a. regularnego stosowania badanych preparatów przez okres 8 tygodni (zgodnie z załączoną instrukcją stosowanie kremu);
- b. niestosowania w tym czasie w miejscu aplikacji testowanych kosmetyków (skóra twarzy) innych produktów o identycznym lub analogicznym przeznaczeniu;
- c. natychmiastowego przerwania stosowania preparatów, w przypadku wystąpienia jakichkolwiek objawów podrażnienia i zgłoszenia ich do osoby przeprowadzającej badania;
- d. obserwacji właściwości użytkowych testowanego produktu.

Sprawozdanie z badań właściwości aplikacyjno-użytkowych

KREM AA

Krem z retinolem i peptydem do skóry starzejącej się

1. CZAS PROWADZENIA BADAŃ

16 października 2023 r. – 15 grudnia 2023 r.

2. PODSTAWA WYKONANIA BADAŃ

- Badanie aplikacyjne *in vivo* zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w dniu 12 października 2023 r. uchwałą nr 768/23.
- Materiał do badań został dostarczony w opakowaniu handlowym.
- Skład jakościowy wyrobu przekazany przez zleceniodawcę*:

Ingredients (INCI)

Aqua , Tripelargonin, Glycerin, Isopropyl Palmitate, Polyglyceryl -3 Dicitrate/Stearate, Persea Gratissima Oil, Glyceryl Stearate, Retinol, Pentapeptide-18, Tocopheryl Acetate, Xanthan Gum, Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, Polysorbate 80, Dehydroacetic Acid, Tocopherol, Phosphatidylcholine, Cetrimonium Bromide, Sodium Cholate, Sodium Hydroxide, Tetrasodium Glutamate Diacetate, Parfum

* Za zgodność z deklarowanym składem jakościowym i ilościowym oraz za czystość mikrobiologiczną próbek przesłanych do badań odpowiada zleceniodawca – Dottore Polska sp z o.o.

3. METODY BADAŃ

Wszystkie badania kremu AA z retinolem i peptydem do skóry starzejącej się prowadzone przez kosmetologa odbywały się pod nadzorem lekarza medycyny estetycznej.

Badania wykonano zgodnie z art. 11, ust. 1, p. 6 Ustawy z dnia 30 marca 2001 r. o kosmetykach (Dz.U. 2001 nr 42, poz. 473): potwierdzenie deklarowanych przez Producenta rodzajów działań obejmujące badanie właściwości użytkowych zgłoszonego preparatu.

4. DOBÓR OCHOTNIKÓW

Dobór aplikantów został przeprowadzony przez kosmetologa na podstawie:

- Deklaracji helsińskiej z 1964 r. (z późniejszymi uzupełnieniami),
- aktualnie obowiązujących przepisów polskich i UE,
- wytycznych COLIPA z zastosowaniem kryteriów włączeń i wyłączeń,
- analizy stanu skóry badanych osób.

5. DZIAŁANIE PREPARATU DEKLAROWANE PRZEZ PRODUCENTA

Krem AA to produkt kosmetyczny zawierający 10% wag. dyspersji stałych nanocząstek lipidowych inkorporowanych retinolem i pentapeptydem-18. Krem służy do pielęgnacji cery starzejącej się. Zaleca się, by krem stosować na noc. Regularne używanie kremu sprawia, że

skóra jest młodsza i pozbawiona niedoskonałości, zmarszczki są wygładzone, a koloryt ulega ujednoliceniu i wyrównaniu.

WSKAZANIA DO STOSOWANIA KREMU:

- walka z oznakami starzenia się skóry (takimi jak zmarszczki, utrata gęstości i jędrności skóry, skóra zniszczona słońcem),
- zaburzenia poziomu nawilżenia skóry,
- skóra tłusta i mieszana z niedoskonałościami.

REZULTAT STOSOWANIA KREMU:

- ujednolicony koloryt skóry,
- zmarszczki wygładzone i spłyczone,
- skóra młodsza w wyglądzie i pozbawiona niedoskonałości.

6. BADANIA APLIKACYJNE

Badania przeprowadzono w warunkach kontrolowanych, pod nadzorem kosmetologa. Stosowanie kremu AA odbywało się w warunkach domowych przez 8 tygodni. Badane osoby używały produktu w ramach pielęgnacji domowej na noc.

Preparat stosowało 20 osób w wieku od 26 lat, zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta (zob. p. 6.1.). Grupę badawczą stanowiły: 3 kobiety w wieku 26–35 lat, 7 kobiet w wieku 36–45 lat, 5 kobiet w wieku 46–55 lat oraz 5 kobiet w wieku 55 lat i więcej.

Wszystkich ochotników poinformowano, że w czasie używania kremu nie należy stosować żadnych innych produktów kosmetycznych o podobnym przeznaczeniu.

Skóra aplikantów była oceniana przed wykonywaniem badań, natomiast odczucia subiektywne sprawdzano w trakcie stosowania produktu oraz po okresie jego stosowania. Ponadto ocenie podlegały także właściwości aplikacyjne produktu.

6.1. SPOSÓB PROWADZENIA BADAŃ

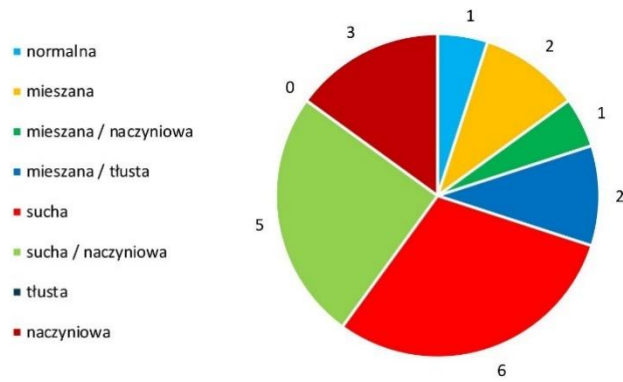
Ochotnicy zadeklarowali stosowanie produktu zgodnie z następującą instrukcją:

„Nałóż niewielką ilość kremu AA na oczyszczoną twarz – równomierną warstwą, z pominięciem okolicy oczu. Wklepuj kosmetyk opuszkami palców, aż do całkowitego wchłonięcia. Używaj codziennie na noc. Stosuj przez 8 tygodni.”

6.2. WYNIKI BADAŃ

Wykres 1.

TYP SKÓRY APLIKANTÓW.

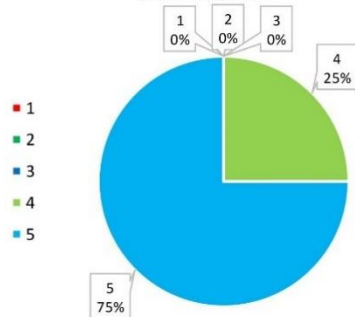


6.2.1. OCENA SUBIEKTYWNA W WYKONANIU OSÓB BIORĄCYCH UDZIAŁ W BADANIU

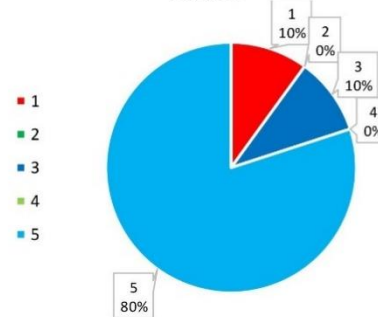
Ocenę formułowano:

- w skali od 1 do 5, gdzie 1 oznacza *niezadowolający*, a 5 – *bardzo dobry*;
- w skali od 0 do 5, gdzie 0 oznacza *brak*, 1 – *słabe*, a 5 – *silne*;
- poprzez odpowiedź *tak / nie / trudno powiedzieć / nie dotyczy*.

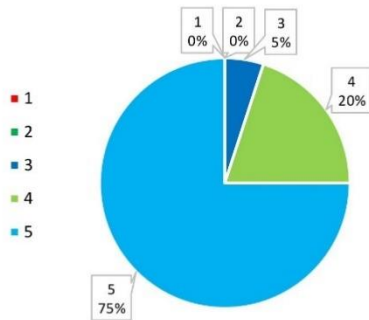
Wykres 2.
KONSYSTENCJA



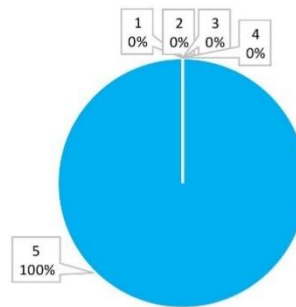
Wykres 3.
ZAPACH



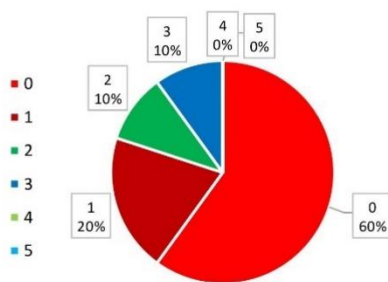
**Wykres 4.
WCHŁANIANIE**



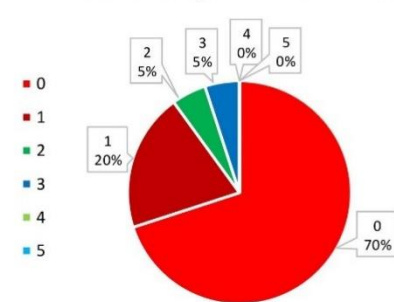
**Wykres 5.
WYDAJNOŚĆ**



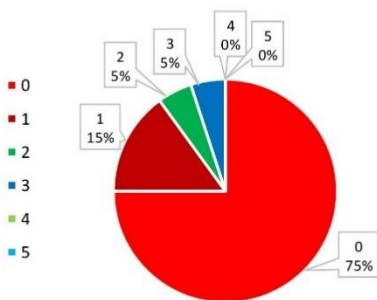
**Wykres 6.
UCZUCIE PIECZENIA PO APLIKACJI KREMU.**



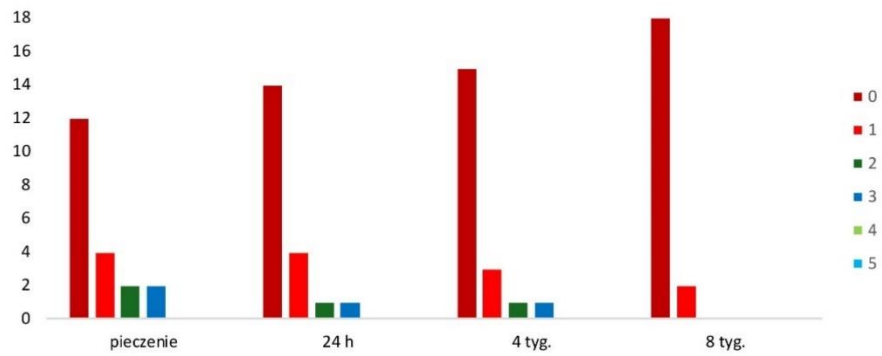
**Wykres 7.
PODRAŻNIENIE, TKLIWOŚĆ SKÓRY W PIERWSZEJ
DOBIE PO ROZPOCZĘCIU APLIKACJI KREMU.**



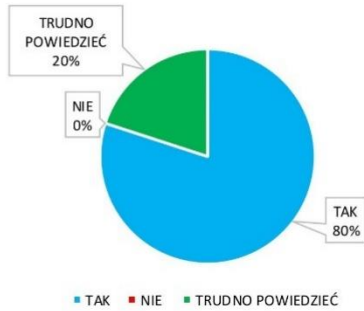
**Wykres 8.
PODRAŻNIENIE PO 4 TYGODNIACH STOSOWANIA KREMU.**



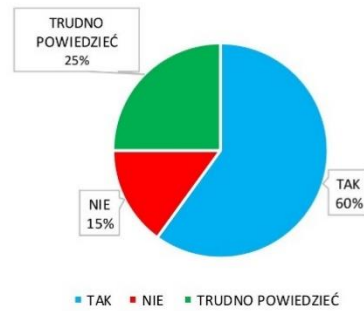
Wykres 9.
PODRAŻNIENIE, TKLIWOŚĆ SKÓRY W CZASIE STOSOWANIA KREMU (badane po 24 godzinach, po 4 tygodniach i po 8 tygodniach).



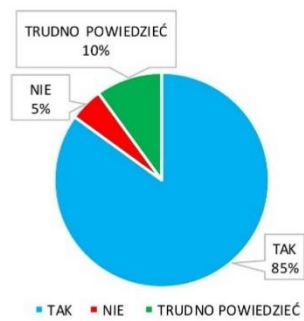
Wykres 10.
Czy skóra po aplikacji kremu jest wygładzona?



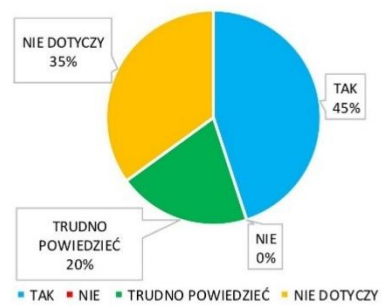
Wykres 11.
Czy koloryt skóry jest wyrównany?



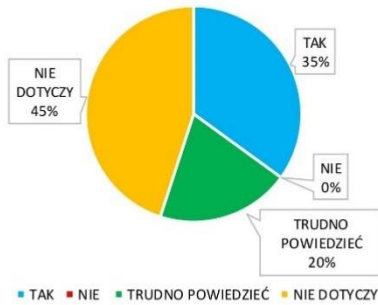
Wykres 12.
Czy skóra jest bardziej miękka i miła w dotyku?



Wykres 13.
Czy zmniejszyła się częstotliwość powstawania niedoskonałości skóry (wyprysków, zaskórników)?



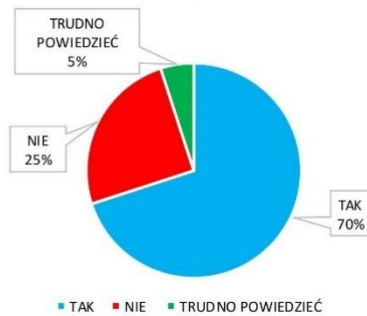
Wykres 14.
Czy wyregulowała się praca gruczołów łojowych skóry (czy zmniejszyło się wydzielanie sebum)?



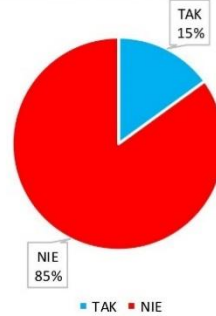
Wykres 15.
Czy zauważyła Pani/Pan ogólną poprawę kondycji skóry?



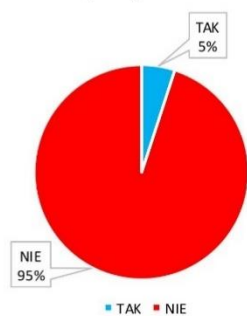
Wykres 16.
Czy po aplikacji uczucie nawilżenia jest odpowiednie?



Wykres 17.
Czy pojawia się uczucie dyskomfortu (tzn. swędzenie, pieczenie, podrażnienie)?

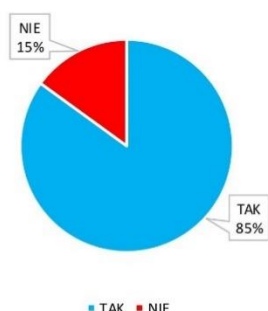


Wykres 18.
Czy występowało łuszczenie się naskórka po aplikacji kremu?

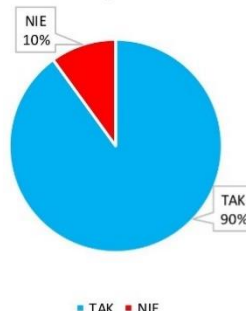


6.2.2. OCENA DEKLARACJI ZGODNOŚCI

Wykres 19.
Czy kuracja kremem AA sprostала Pani/Pana
oczekiwaniom?



Wykres 20.
Czy poleciliby Pani / poleciliby Pan ten produkt
bliskiej osobie?



7. WNIOSKI

- Na podstawie odpowiedzi ochotników biorących udział w badaniu, którzy dostarczyli istotnych informacji dotyczących działania preparatu, stwierdzono, że krem AA był dobrze tolerowany przez wszystkie badane osoby. Nie zaszła potrzeba przerwania testów produktu ani ich wcześniejszego zakończenia.
- Żadna z badanych osób nie zgłaszała jakichkolwiek dolegliwości podmiotowych innych niż charakterystyczne dla działania kremu, mogących świadczyć o ujemnym wpływie produktu na skórę.
- W badaniu kremu wzięło udział 20 osób o różnych typach skóry (wykres 1): 1 osoba ze skórą normalną, 2 osoby ze skórą mieszaną, 1 osoba ze skórą mieszaną/naczyniową, 2 osoby ze skórą mieszaną/tłustą, 6 osób ze skórą suchą, 5 osób ze skórą suchą/naczyniową i 3 osoby ze skórą naczyniową.
- Konsystencja kremu odpowiadała wszystkim badanym osobom: 75% badanych określiło konsystencję produktu jako bardzo dobrą, a 25% zadeklarowało, że jest dobra (wykres 2).
- Zapach odpowiadał zdecydowanej większości badanych osób: 80% badanych określiło go jako bardzo dobry. Tylko 10% badanych określiło zapach jako słaby (wykres 3).
- Wchłanianie produktu to cecha, która odpowiadała zdecydowanej większości badanych osób: 75% określiło wchłanianie jako bardzo dobre, 20% – jako dobre, a tylko 5% – jako średnie (wykres 4).
- Wszystkie badane osoby określiły produkt jako wydajny (wykres 5).
- Pieczenie skóry bezpośrednio po aplikacji kremu odczuwała niewielka część osób biorących udział w badaniu: tylko 10% osób określiło je jako średnie, a 20% – jako słabe (wykres 6).
- Podrażnienie i tkliwość skóry w pierwszej dobie po rozpoczęciu aplikacji kremu odczuwało zaledwie 30% badanych osób. 20% osób określiło podrażnienie jako słabe, 5% – jako niewielkie oraz 5% – jako średnie (wykres 7).

- Podrażnienie po 4 tygodniach stosowania kremu odczuwało zaledwie 25% badanych osób. 15% osób określiło podrażnienie jako słabe, 5% – jako niewielkie oraz 5% – jako średnie (wykres 8).
- Zauważalne wygładzenie skóry po aplikacji kremu zadeklarowało 80% badanych osób. Pozostałych 20% aplikantów stwierdziło, że trudno powiedzieć (wykres 10).
- Wyrównanie kolorytu skóry po kuracji kremem AA zauważyło 60% osób biorących udział w badaniu. 25% badanych stwierdziło, że trudno powiedzieć, a 15% osób nie zauważyło widocznego wyrównania kolorytu skóry (wykres 11).
- Większość osób biorących udział w badaniu zadeklarowała, że po kuracji skóra jest miękka i miła w dotyku. Pozytywny efekt zauważyło aż 85% aplikantów. Zaledwie 5% badanych nie potwierdziło zmiany w strukturze skóry, a 10% badanych stwierdziło, że trudno powiedzieć (wykres 12).
- Osoby, u których występował problem powstawania niedoskonałości (wyprysków, zaskórników), zadeklarowały, że po kuracji kremem AA zauważyły znaczącą poprawę (45% badanych), lub stwierdziły, że trudno powiedzieć (20% osób). Problem dotyczył 65% osób, a 35% badanych zadeklarowało, że problem powstawania niedoskonałości ich nie dotyczy (wykres 13).
- 35% osób biorących udział w badaniu zauważyło mniejsze wydzielanie sebum na twarzy. 20% badanych stwierdziło, że trudno im powiedzieć, czy wydzielanie sebum się zmniejszyło. 45% aplikantów zadeklarowało, że problem nadmiernej produkcji sebum ich nie dotyczy (wykres 14).
- Ogólną poprawę kondycji skóry zadeklarowało 80% badanych osób. 10% aplikantów nie zauważyło poprawy, a 10% zadeklarowało, że trudno powiedzieć, czy zmiana nastąpiła (wykres 15).
- Odczuwalną poprawę poziomu nawilżenia zadeklarowało aż 70% badanych osób. Tylko 25% aplikantów nie potwierdziło tej deklaracji marketingowej, a 5% zadeklarowało, że trudno powiedzieć (wykres 16).
- Uczucie dyskomfortu na skórze, tj. swędzenie, pieczenie, podrażnienie, wystąpiło u 15% badanych osób (wykres 17).
- Łuszczenie się naskórka po kuracji wystąpiło tylko u 5% badanych osób (wykres 18).
- Walory aplikacyjne badanego produktu oraz zgodność efektów kuracji z oczekiwaniami potwierdziło 85% badanych osób (wykres 19).
- 90% badanych osób poleciłoby ten produkt bliskiej osobie (wykres 20).

OPINIA UŻYTKOWA

Na podstawie przedstawionych wyników badań stwierdzono, że krem AA spełnia walory użytkowe założone przez producenta.

Podpis osoby wykonującej badania:



Sprawozdanie z badań właściwości aplikacyjno-użytkowych**KREM AC****Krem z retinolem i peptydem do skóry z trądzikiem i niedoskonałościami****1. CZAS PROWADZENIA BADAŃ**

16 października 2023 r. – 15 grudnia 2023 r.

2. PODSTAWA WYKONANIA BADAŃ

- Badanie aplikacyjne *in vivo* zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w dniu 12 października 2023 r. uchwałą nr 768/23.
- Materiał do badań został dostarczony w opakowaniu handlowym.
- Skład jakościowy wyrobu przekazany przez zleceniodawcę*:

Ingredients (INCI)

Aqua, Citrullus Lanatus Seed Oil, Propanediol, Citrus Limon Fruit Extract, Isopropyl Palmitate, Glyceryl Stearate Citrate, Cetearyl Alcohol, Pentylene Glycol, Glyceryl Stearate, Squalane, Cannabis Sativa Seed Oil, Glycerin, Sodium PCA, Succinoglycan, Pentapeptide-18, Retinol, Phosphatidylcholine, Cetrimonium Bromide, Sodium Cholate, Polysorbate 80, Cannabidiol, Bioflavonoids, Raspberry Ketone, Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil, Potassium Sorbate, Tetrasodium Glutamate Diacetate, Sodium Hydroxide, Trisodium NTA, Parfum

* Za zgodność z deklarowanym składem jakościowym i ilościowym oraz za czystość mikrobiologiczną próbek przesłanych do badań odpowiada zleceniodawca – Dottore Polska sp z o.o.

3. METODY BADAŃ:

Wszystkie badania kremu AC z retinolem i peptydem do skóry z niedoskonałościami prowadzone przez kosmetologa odbywały się pod nadzorem lekarza medycyny estetycznej.

Badania wykonano zgodnie z art. 11, ust. 1, p. 6 Ustawy z dnia 30 marca 2001 r. o kosmetykach (Dz.U. 2001 nr 42, poz. 473): potwierdzenie deklarowanych przez Producenta rodzajów działań obejmujące badanie właściwości użytkowych zgłoszonego preparatu.

4. DOBÓR OCHOTNIKÓW

Dobór aplikantów został przeprowadzony przez kosmetologa na podstawie:

- Deklaracji helsińskiej z 1964 r. (z późniejszymi uzupełnieniami),
- aktualnie obowiązujących przepisów polskich i UE,
- wytycznych COLIPA z zastosowaniem kryteriów włączeń i wyłączeń,
- analizy stanu skóry badanych osób.

5. DZIAŁANIE PREPARATU DEKLAROWANE PRZEZ PRODUCENTA

Krem AC to produkt kosmetyczny zawierający 5% wag. dyspersji stałych cząstek lipidowych inkorporowanych retinolem i pentapeptydem-18. Krem służy do pielęgnacji cery z niedoskonałościami. Zaleca się, by krem stosować na noc. Regularne używanie kremu sprawia, że skóra jest młodsza i pozbawiona niedoskonałości (wyprysków i zaskórników), praca gruczołów łojowych zostaje wyregulowana, a koloryt ulega ujednoczeniu i wyrównaniu.

WSKAZANIA DO STOSOWANIA KREMU:

- skóra z niedoskonałościami (zaskórnikami, wypryskami, zmianami trądzikowymi),
- zaburzona praca gruczołów łojowych,
- oznaki starzenia się skóry,
- nierównomierny koloryt skóry.

REZULTAT STOSOWANIA KREMU:

- wyregulowana praca gruczołów łojowych,
- skóra młodsza w wyglądzie i pozbawiona niedoskonałości,
- ujednoczony koloryt skóry.

6. BADANIA APLIKACYJNE

Badania przeprowadzono w warunkach kontrolowanych, pod nadzorem kosmetologa. Stosowanie kremu AC odbywało się w warunkach domowych przez 8 tygodni. Badane osoby używały produktu w ramach pielęgnacji domowej na noc.

Preparat stosowało 20 osób w różnych kategoriach wiekowych, zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta (zob. p. 6.1.). Grupę badawczą stanowiły: 4 kobiety w wieku do 25 lat, 5 kobiet w wieku 26–35 lat, 6 kobiety w wieku 36–45 lat, 4 kobiety w wieku 46–55 lat oraz 1 kobieta w wieku 55 lat lub więcej.

Wszystkich ochotników poinformowano, że w czasie używania kremu nie należy stosować żadnych innych produktów kosmetycznych o podobnym przeznaczeniu.

Skóra aplikantów była oceniana przed wykonywaniem badań, natomiast odczucia subiektywne sprawdzano w trakcie stosowania produktu oraz po okresie jego stosowania. Ponadto ocenie podlegały także właściwości aplikacyjne produktu.

6.1. SPOSÓB PROWADZENIA BADAŃ

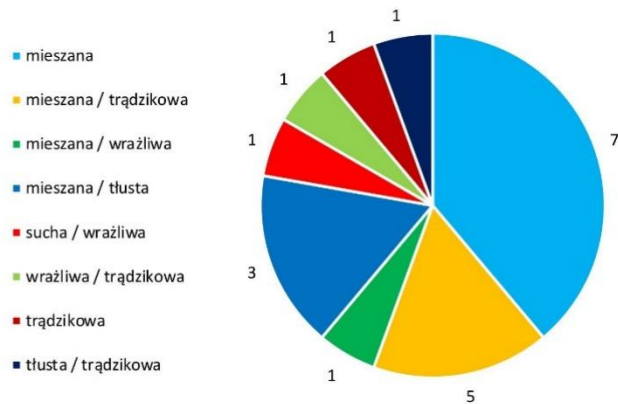
Ochotnicy zadeklarowali stosowanie produktu zgodnie z następującą instrukcją:

„Nałóż niewielką ilość kremu AC na oczyszczoną twarz – równomierną warstwą, z pominięciem okolicy oczu. Wklepuj kosmetyk opuszkami palców, aż do całkowitego wchłonięcia. Używaj codziennie na noc. Stosuj przez 8 tygodni.”

6.2. WYNIKI BADAŃ

Wykres 1.

TYP SKÓRY OCHOTNIKÓW

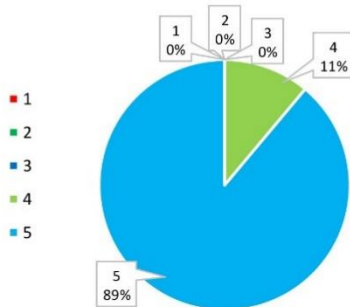


6.2.1. OCENA SUBIEKTYWNA W WYKONANIU OSÓB BIORĄCYCH UDZIAŁ W BADANIU

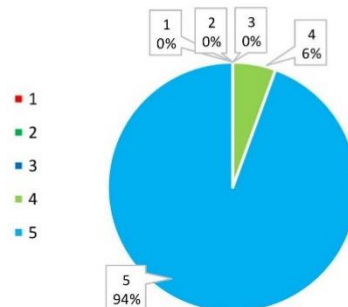
Ocenę formułowano:

- w skali od 1 do 5, gdzie 1 oznacza *niezadowolający*, a 5 – *bardzo dobry*;
- w skali od 0 do 5, gdzie 0 oznacza *brak*, 1 – *słabe*, a 5 – *silne*;
- poprzez odpowiedź *tak / nie / trudno powiedzieć / nie dotyczy*.

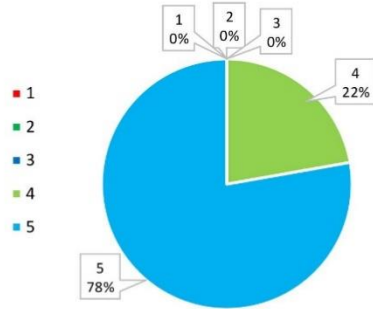
Wykres 2.
KONSYSTENCJA



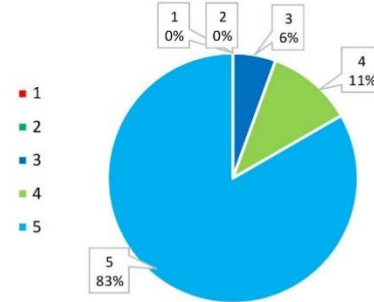
Wykres 3.
ZAPACH



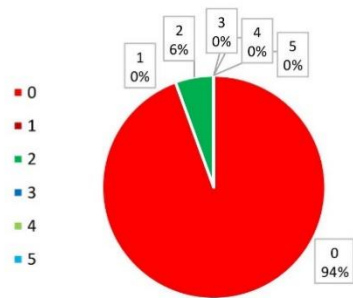
**Wykres 4.
WCHŁANIANIE**



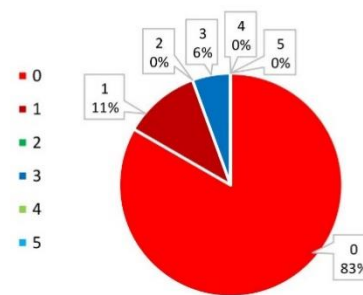
**Wykres 5.
WYDAJNOŚĆ**



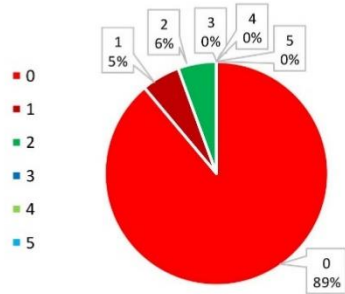
**Wykres 6.
UCZUCIE PIECZENIA PO APLIKACJI KREMU.**



**Wykres 7.
PODRAŻNIENIE, TKLIWOŚĆ SKÓRY W PIERWSZEJ
DOBIE PO ROZPOCZĘCIU APLIKACJI KREMU.**

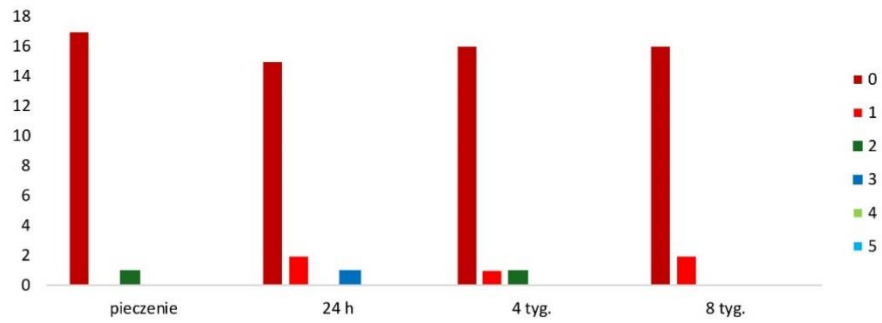


**Wykres 8.
PODRAŻNIENIE PO 4 TYGODNIACH STOSOWANIA
KREMU.**

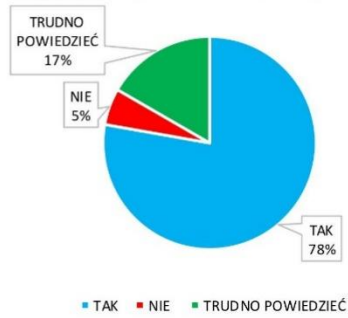


Wykres 9.

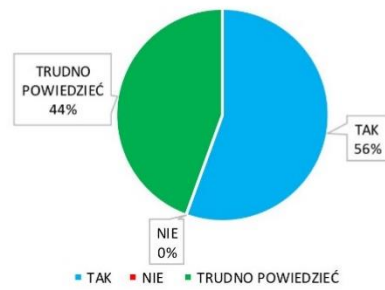
PODRAŻNIENIE, TKLIWOŚĆ SKÓRY W CZASIE STOSOWANIA KREMU (badane po 24 godzinach, po 4 tygodniach i po 8 tygodniach).



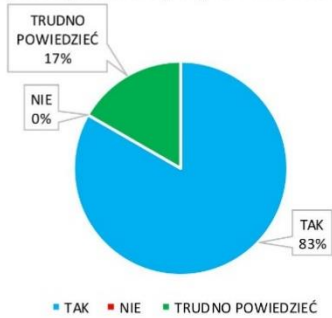
Wykres 10.
Czy skóra po aplikacji kremu jest wygładzona?



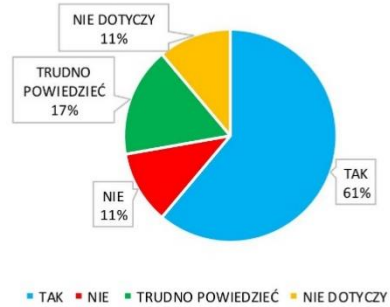
Wykres 11.
Czy kolor skóry jest wyrównany?



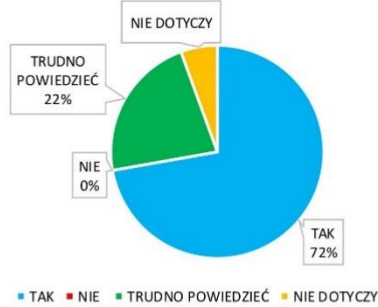
Wykres 12.
Czy skóra jest bardziej miękka i miła w dotyku?



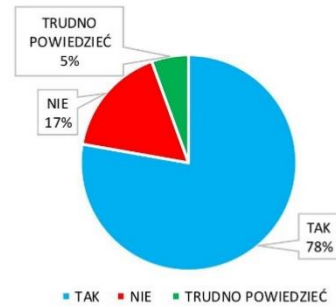
Wykres 13.
Czy zmniejszyła się częstotliwość powstawania niedoskonałości skóry (wyprysków, zaskórników)?



Wykres 14.
Czy wyregulowała się praca gruczołów łojowych skóry (czy zmniejszyło się wydzielanie sebum)?



Wykres 15.
Czy zauważyła Pani/Pan ogólną poprawę kondycji skóry?



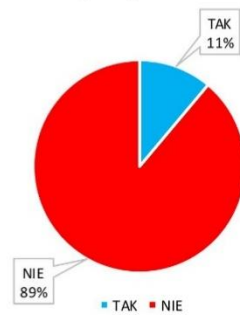
Wykres 16.
Czy po aplikacji uczucie nawilżenia jest odpowiednie?



Wykres 17.
Czy pojawia się uczucie dyskomfortu (tzn. swędzenie, pieczenie, podrażnienie)?

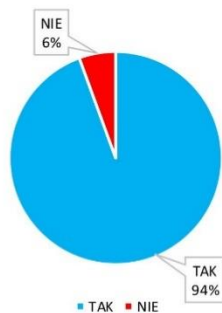


Wykres 18.
Czy występowało łuszczenie się naskórka po aplikacji kremu?

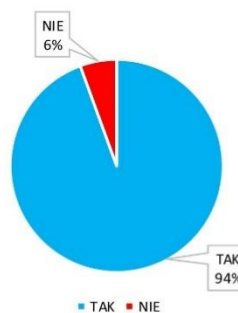


6.2.2. OCENA DEKLARACJI ZGODNOŚCI

Wykres 19.
Czy kuracja kremem AC sprostała Pani/Pana oczekiwaniom?



Wykres 20.
Czy poleciliby Pani / poleciliby Pan ten produkt bliskiej osobie?



7. WNIOSKI

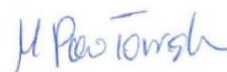
- Na podstawie odpowiedzi ochotników, którzy dostarczyli istotnych informacji dotyczących działania preparatu, stwierdzono, że krem AC był dobrze tolerowany przez wszystkie badane osoby. Nie zaszła potrzeba przerwania testów produktu ani ich wcześniejszego zakończenia.
- Żadna z badanych osób nie zgłaszała jakichkolwiek dolegliwości podmiotowych innych niż charakterystyczne dla działania kremu, mogących świadczyć o ujemnym wpływie produktu na skórę.
- W badaniu kremu wzięło udział 20 osób o różnych typach skóry (wykres 1): 1 osoba ze skórą tłustą/trądzikową, 7 osób ze skórą mieszaną, 1 osoba ze skórą mieszaną/wrażliwą, 3 osoby ze skórą mieszaną/tłustą, 5 osoby ze skórą mieszaną/trądzikową, 1 osoba ze skórą suchą/wrażliwą, 1 osoba ze skórą wrażliwą/trądzikową i 1 osoba ze skórą trądzikową.
- Konsystencja kremu odpowiadała wszystkim badanym osobom: 89% badanych określiło konsystencję produktu jako bardzo dobrą, a 11% zadeklarowało, że jest dobra (wykres 2).
- Zapach odpowiadał zdecydowanej większości badanych osób: 94% badanych określiło go jako bardzo dobry. Tylko 6% badanych określiło zapach jako dobry (wykres 3).
- Wchłanianie produktu odpowiadało zdecydowanej większości badanych osób: 78% określiło je jako bardzo dobre, a 22% – jako dobre (wykres 4).
- Prawie wszystkie badane osoby (83%) określiły produkt jako wydajny (wykres 5).
- Pieczenie skóry bezpośrednio po aplikacji kremu odczuwała niewielka część osób biorących udział w badaniu: tylko 6% osób określiło je jako słabe (wykres 6).
- Podrażnienie i tkliwość skóry w pierwszej dobie po rozpoczęciu aplikacji kremu odczuwało zaledwie 17% badanych osób. 11% określiło podrażnienie jako słabe, a 6% – jako średnie (wykres 7).

- Podrażnienie po 4 tygodniach stosowania kremu odczuwało zaledwie 11% badanych osób. 5% osób określiło podrażnienie jako słabe, a 6% – jako niewielkie (wykres 8).
- Zauważalne wygładzenie skóry po aplikacji kremu zadeklarowało 78% badanych osób. Pozostałych 17% aplikantów określiło, że trudno powiedzieć, a 5% nie zauważyło wygładzenia (wykres 10).
- Wyrównanie kolorytu skóry po kuracji kremem AC zauważyło 56% osób biorących udział w badaniu. 44% badanych stwierdziło, że trudno powiedzieć, czy koloryt uległ wyrównaniu (wykres 11).
- Większość osób biorących udział w badaniu zadeklarowała, że po kuracji skóra jest miękka i miła w dotyku. Pozytywny efekt zauważyło aż 83% aplikantów. Zaledwie 17% badanych stwierdziło, że trudno powiedzieć (wykres 12).
- Większość osób, u których występował problem powstawania niedoskonałości (wyprysków, zaskórników), zadeklarowała, że po kuracji kremem AC zauważyła znaczącą poprawę (61% badanych). 17% osób stwierdziło, że trudno powiedzieć, czy niedoskonałości jest mniej. Zaledwie 11% aplikantów nie zauważyło poprawy. 11% badanych zadeklarowało, że problem powstawania niedoskonałości ich nie dotyczy (wykres 13).
- 72% osób biorących udział w badaniu zauważyło mniejsze wydzielanie sebum na twarzy, a 22% stwierdziło, że trudno powiedzieć, czy wydzielanie sebum jest zmniejszone. 6% osób zadeklarowało, że problem nadmiernej produkcji sebum ich nie dotyczy (wykres 14).
- Ogólną poprawę kondycji skóry zadeklarowało 78% badanych osób. 17% aplikantów nie zauważyło poprawy, a 5% zadeklarowało, że trudno powiedzieć, czy kondycja skóry jest lepsza (wykres 15).
- Odczuwalną poprawę poziomu nawilżenia zadeklarowało aż 78% badanych osób. Tylko 22% aplikantów nie potwierdziło tej deklaracji marketingowej (wykres 16).
- Uczucie dyskomfortu na skórze, tj. swędzenie, pieczenie, podrażnienie, nie wystąpiło u 89% badanych osób. 11% aplikantów zadeklarowało, że trudno powiedzieć (wykres 17).
- Łuszczenie się naskórka po kuracji wystąpiło tylko u 11% badanych osób (wykres 18).
- Walory aplikacyjne badanego produktu oraz zgodność efektów kuracji z oczekiwaniami potwierdziło 94% badanych osób (wykres 19).
- 94% badanych osób poleciłoby ten produkt bliskiej osobie (wykres 20).

OPINIA UŻYTKOWA

Na podstawie przedstawionych wyników badań stwierdzono, że krem AC spełnia walory użytkowe założone przez producenta.

Podpis osoby wykonującej badania:



Sprawozdanie z badań właściwości aplikacyjno-użytkowych**KREM EYE****Krem z retinolem i peptydem do pielęgnacji starzejącej się skóry wokół oczu****1. CZAS PROWADZENIA BADAŃ**

16 października 2023 r. – 15 grudnia 2023 r.

2. PODSTAWA WYKONANIA BADAŃ

- Badanie aplikacyjne *in vivo* zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w dniu 12 października 2023 r. uchwałą nr 768/23.
- Materiał do badań został dostarczony w opakowaniu handlowym.
- Skład jakościowy wyrobu przekazany przez zleceniodawcę*:

Ingredients (INCI)

Aqua, Butylene Glycol, Coco-Caprylate/Caprates, Pentylene Glycol, Propanediol, Cetyl Alcohol, Glyceryl Stearate, Simmondsia Chinensis Seed Oil, Triisostearin, Glyceryl Stearate Citrate, Butyrospermum Parkii Butter, Theobroma Cacao Seed Butter, Glycerin, Cetyl Ricinoleate, Persea Gratissima Oil, retinol, Sodium Hyaluronate, Acetyl Tetrapeptide-5, Palmitoyl Tripeptide-5, Palmitoyl Dipeptide-5 Diaminobutyryl Hydroxythreonine, Tetradecyl Aminobutyrylvalylaminobutyric Urea Trifluoroacetate, Pentapeptide-18, Phosphatidylcholine, Cetrimonium Bromide, sodium cholate, Potassium Cocoyl Hydrolyzed Rice Protein, Sodium Cocoyl Amino Acids, Caprylic/Capric Triglyceride, Tocopheryl Acetate, Tocopherol, Helianthus Annuus Seed Oil, Raspberry Ketone, Stearyl Alcohol, Polysorbate 80, Xanthan Gum, Magnesium Chloride, Tetrasodium Glutamate Diacetate, Sodium Hydroxide, Trisodium NTA, and Parfum.

* Za zgodność z deklarowanym składem jakościowym i ilościowym oraz za czystość mikrobiologiczną próbek przesłanych do badań odpowiada zleceniodawca – Dottore Polska sp z o.o.

3. METODY BADAŃ

Wszystkie badania kremu EYE z retinolem i peptydem do starzejącej się skóry w okolicy oczu prowadzone były przez kosmetologa pod nadzorem lekarza medycyny estetycznej.

Badania wykonano zgodnie z art. 11, ust. 1, p. 6 Ustawy z dnia 30 marca 2001 r. o kosmetykach (Dz.U. 2001 nr 42, poz. 473): potwierdzenie deklarowanych przez Producenta rodzajów działań obejmujące badanie właściwości użytkowych zgłoszonego preparatu.

4. DOBÓR OCHOTNIKÓW

Dobór aplikantów ochotników został przeprowadzony przez kosmetologa na podstawie:

- Deklaracji helsińskiej z 1964 r. (z późniejszymi uzupełnieniami),
- aktualnie obowiązujących przepisów polskich i UE,

- wytycznych COLIPA z zastosowaniem kryteriów włączeń i wyłączeń,
- analizy stanu skóry badanych osób.

5. DZIAŁANIE PREPARATU DEKLAROWANE PRZEZ PRODUCENTA

Krem EYE to produkt kosmetyczny zawierający 1% wag. dyspersji stałych cząstek lipidowych inkorporowanych retinolem i pentapeptydem-18. Krem służy do pielęgnacji starzejącej się cery w okolicy oczu. Zaleca się, by krem stosować na noc. Regularne używanie kremu sprawia, że skóra jest młodsza i pozbawiona zmarszczek mimicznych, a koloryt ulega ujednoczeniu i wyrównaniu.

WSKAZANIA DO STOSOWANIA KREMU:

- walka z oznakami starzenia się skóry (takimi jak kurze łapki, cienie i obrzęki pod oczami),
- sucha i odwodniona skóra wokół oczu,
- brak jędrności i elastyczności cienkiej skóry pod oczami.

REZULTAT STOSOWANIA KREMU:

- redukcja cieni i obrzęków pod oczami,
- zmarszczki wygładzone i spłycone,
- skóra nawilżona,
- skóra młodsza w wyglądzie.

6. BADANIA APLIKACYJNE

Badania przeprowadzono w warunkach kontrolowanych, pod nadzorem kosmetologa. Stosowanie kremu EYE odbywało się w warunkach domowych przez 8 tygodni. Badane osoby używały produktu w ramach pielęgnacji domowej na noc.

Preparat stosowało 20 osób w wieku od 26 lat, zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta (zob. p. 6.1.). Grupę badawczą stanowiły: 3 kobiety w wieku 26–35 lat, 9 kobiet w wieku 36–45 lat, 5 kobiet w wieku 46–55 lat oraz 3 kobiety w wieku 55 lat i więcej.

Wszystkich ochotników poinformowano, że w czasie używania kremu nie należy stosować żadnych innych produktów kosmetycznych o podobnym przeznaczeniu.

Skóra aplikantów była oceniana przed wykonywaniem badań, natomiast odczucia subiektywne sprawdzano w trakcie stosowania produktu oraz po okresie jego stosowania. Ponadto ocenie podlegały także właściwości aplikacyjne produktu.

6.1. SPOSÓB PROWADZENIA BADAŃ

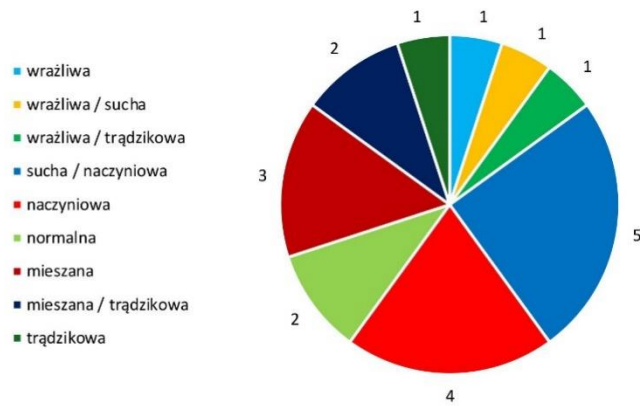
Ochotnicy zadeklarowali stosowanie produktu zgodnie z następującą instrukcją:

„Nałóż niewielką ilość kremu EYE na delikatną skórę wokół oczu. Wklepuj kosmetyk opuszkami palców, aż do całkowitego wchłonięcia. Używaj codziennie na noc. Stosuj przez 8 tygodni.”

6.2. WYNIKI BADAŃ

Wykres 1.

TYP SKÓRY APLIKANTÓW

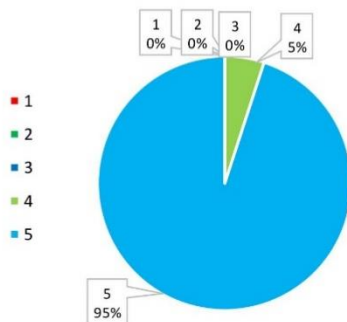


6.2.1. OCENA SUBIEKTYWNA W WYKONANIU OSÓB BIORĄCYCH UDZIAŁ W BADANIU

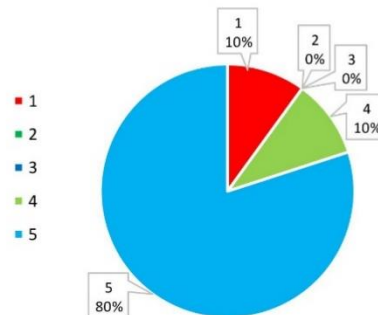
Ocenę formułowano:

- w skali od 1 do 5, gdzie 1 oznacza *niezadowolający*, a 5 – *bardzo dobry*;
- w skali od 0 do 5, gdzie 0 oznacza *brak*, 1 – *słabe*, a 5 – *silne*;
- poprzez odpowiedź *tak / nie / trudno powiedzieć*.

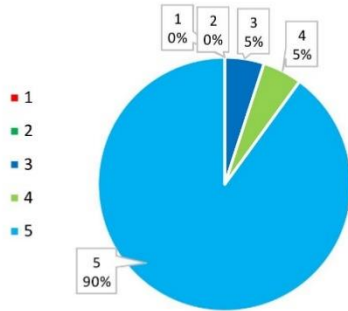
Wykres 2.
KONSYSTENCJA



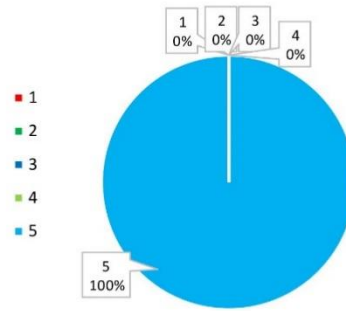
Wykres 3.
ZAPACH



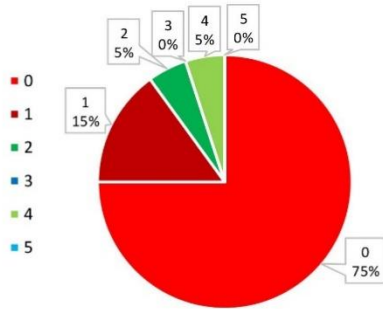
**Wykres 4.
WCHŁANIANIE**



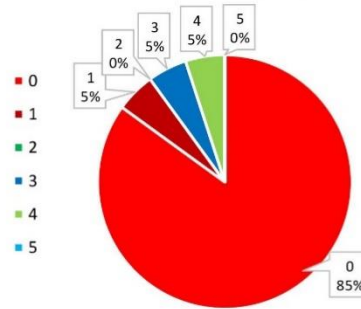
**Wykres 5.
WYDAJNOŚĆ**



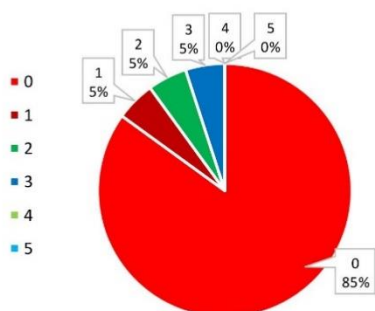
**Wykres 6.
UCZUCIE PIECZENIA PO APLIKACJI KREMU.**



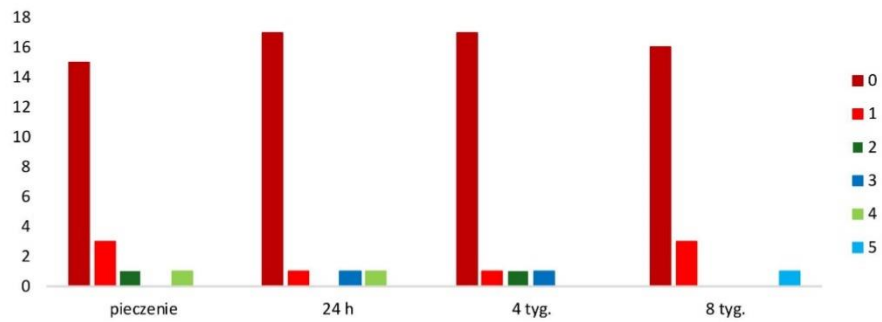
**Wykres 7.
PODRAŻNIENIE, TKLIWOŚĆ SKÓRY W PIERWSZEJ
DOBIE PO ROZPOCZĘCIU APLIKACJI KREMU.**



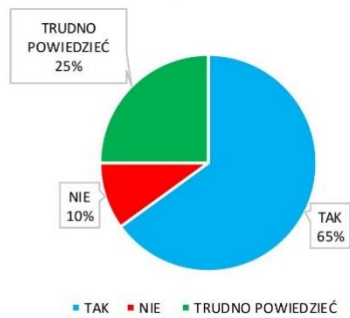
**Wykres 8.
PODRAŻNIENIE PO 4 TYGODNIACH STOSOWANIA
KREMU.**



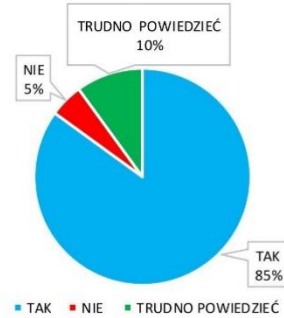
Wykres 9.
PODRAŻNIENIE, TKLIWOŚĆ SKÓRY W CZASIE STOSOWANIA KREMU (badane po 24 godzinach, po 4 tygodniach i po 8 tygodniach).



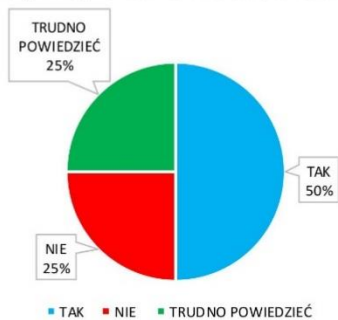
Wykres 10.
Czy skóra wokół oczu po aplikacji kremu jest wygładzona?



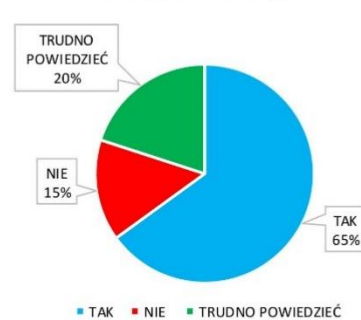
Wykres 11.
Czy skóra wokół oczu jest bardziej miękka i miła w dotyku?



Wykres 12.
Czy zauważalna jest poprawa kolorytu skóry wokół oczu (zmniejszenie sińców i cieni pod oczami)?



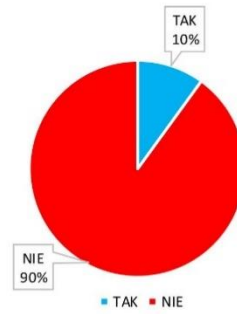
Wykres 13.
Czy zauważalne jest zmniejszenie widoczności zmarszczek mimicznych?



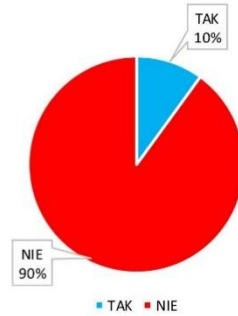
Wykres 14.
Czy zauważa Pani/Pan ogólną poprawę kondycji skóry wokół oczu?



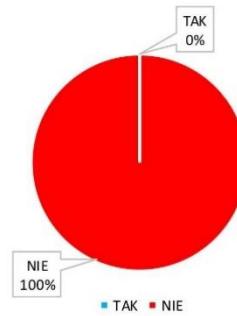
Wykres 15.
Czy po aplikacji pojawia się uczucie ściągnięcia?



Wykres 16.
Czy pojawia się uczucie dyskomfortu (tzn. swędzenie, pieczenie, podrażnienie)?

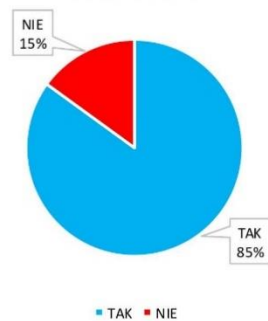


Wykres 17.
Czy występowało luszczenie się naskórka po aplikacji kremu?

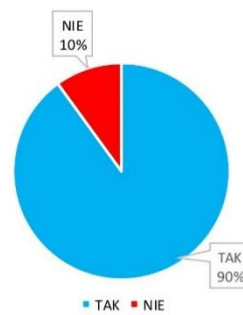


6.2.2. OCENA DEKLARACJI ZGODNOŚCI

Wykres 18.
Czy kuracja kremem pod oczy sprostaa Pani/Pana oczekiwaniom?



Wykres 19.
Czy poleciliby Pani / poleciliby Pan ten produkt bliskiej osobie?



7. WNIOSKI

- Na podstawie odpowiedzi ochotników biorących udział w badaniu, którzy dostarczyli istotnych informacji dotyczących działania preparatu, stwierdzono, że krem EYE był dobrze tolerowany przez wszystkie badane osoby. Nie zaszła potrzeba przerwania testów produktu ani ich wcześniejszego zakończenia.
- Żadna z badanych osób nie zgłaszała jakichkolwiek dolegliwości podmiotowych innych niż charakterystyczne dla działania kremu, mogących świadczyć o ujemnym wpływie produktu na skórę.
- W badaniu kremu wzięło udział 20 osób o różnych typach skóry (wykres 1): 1 osoba ze skórą wrażliwą, 1 osoba ze skórą wrażliwą/suchą, 1 osoba ze skórą wrażliwą/trądzikową, 5 osób ze skórą suchą/naczyniową, 2 osoby ze skórą normalną, 3 osoby ze skórą mieszaną, 2 osoby ze skórą mieszaną/trądzikową, 1 osoba ze skórą trądzikową i 4 osoby ze skórą naczyniową.
- Konsystencja kremu odpowiadała wszystkim badanym osobom: 95% badanych określiło konsystencję produktu jako bardzo dobrą, a 5% zadeklarowało, że jest dobra (wykres 2).
- Zapach odpowiadał zdecydowanej większości badanych osób: 90% badanych określiło go jako bardzo dobry i dobry. Tylko 10% badanych określiło zapach jako słaby (wykres 3).
- Wchłanianie produktu to cecha, która odpowiadała zdecydowanej większości badanych osób: 90% aplikantów określiło wchłanianie jako bardzo dobre, 5% – jako dobre, a tylko 5% – jako średnie (wykres 4).
- 100% badanych osób określiło produkt jako wydajny (wykres 5).
- Pieczenie skóry bezpośrednio po aplikacji kremu odczuwała niewielka część osób biorących udział w badaniu: tylko 15% badanych określiło pieczenie jako słabe, 5% – jako niewielkie i 5% – jako zauważalne (wykres 6).
- Podrażnienie i tkliwość skóry w pierwszej dobie po rozpoczęciu aplikacji kremu odczuwało zaledwie 15% badanych osób. W obrębie tej grupy 5% osób określiło podrażnienie jako słabe, 5% – jako średnie oraz 5% – jako zauważalne (wykres 7).
- Podrażnienie po 4 tygodniach stosowania kremu odczuwało zaledwie 15% badanych osób. 5% ochotników określiło podrażnienie jako słabe, 5% – jako niewielkie oraz 5% – jako średnie (wykres 8).
- Zauważalne wygładzenie skóry wokół oczu po aplikacji kremu zadeklarowało 65% badanych osób. 25% aplikantów stwierdziło, że trudno powiedzieć, a 10% osób nie zauważyło wygładzenia skóry (wykres 10).
- Większość osób biorących udział w badaniu zadeklarowała, że po kuracji skóra wokół oczu jest miękka i miła w dotyku. Pozytywny efekt zauważyło aż 85% aplikantów. Zaledwie 5% badanych nie potwierdziło zmiany w strukturze skóry, a 10% badanych stwierdziło, że trudno powiedzieć (wykres 11).

- Wyrównanie kolorytu skóry wokół oczu po kuracji kremem EYE zauważyło 60% osób biorących udział w badaniu. 25% badanych zadeklarowało, że trudno powiedzieć, a 25% osób nie zauważyło wyrównania kolorytu skóry (wykres 12).
- Zmniejszenie liczby zmarszczek mimicznych wokół oczu zauważyło aż 65% badanych osób. 20% aplikantów zadeklarowało, że trudno im powiedzieć, czy zauważyli zmianę. 15% nie zauważyło zmiany (wykres 13).
- Ogólną poprawę kondycji skóry wokół oczu zadeklarowało 75% badanych osób. Wśród badanych 15% nie zauważyło poprawy, a 10% zadeklarowało, że trudno powiedzieć (wykres 14).
- Brak uczucia ściągania na skórze po aplikacji kremu zadeklarowało aż 90% badanych. Tylko 10% osób odczuło ściąganie (wykres 15).
- Uczucie dyskomfortu na skórze, tj. swędzenie, pieczenie, podrażnienie, wystąpiło u 10% badanych osób (wykres 16).
- Łuszczenie się naskórka po kuracji nie wystąpiło u badanych osób (wykres 17).
- Walory aplikacyjne badanego produktu oraz zgodność efektów kuracji z oczekiwaniami potwierdziło 85% badanych osób (wykres 18).
- 90% aplikantów poleciłoby ten produkt bliskiej osobie (wykres 19).

OPINIA UŻYTKOWA

Na podstawie przedstawionych wyników badań stwierdzono, że krem EYE spełnia walory użytkowe założone przez producenta.

Podpis osoby wykonującej badania:

